

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas Químicas

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia



INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN ANACULTIVO A PARTIR DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENTEROTOXEMIA EN CRÍAS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*), SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IgG ESPECÍFICA EN EL CENTRO EXPERIMENTAL LA RAYA - CUSCO 2017

Tesis Presentada por el Bachiller:

Pezo Alencastre, Sergio Enrique

para optar el Título Profesional de:

Médico Veterinario y Zootecnista

Asesor:

Dr. Fernández Fernández, Fernando

**AREQUIPA - PERÚ
2018**



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

“IN SCIENTIA ET FIDE EST FORTITUDO NOSTRA”
(En la Ciencia y en la Fe está nuestra fuerza)

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN BORRADOR DE TESIS

Señor Magíster
CARLO SANZ LUDEÑA
Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Presente.-

Mediante el presente, comunicamos a usted que se ha procedido a revisar el Borrador de Tesis titulado:

“INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN ANACULTIVO A PARTIR DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENTEROTOXEMIA EN CRIAS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IgG ESPECÍFICA EN EL CENTRO EXPERIMENTAL LA RAYA – CUSCO, 2018”
presentado por:

PEZO ALENCASTRE, SERGIO ENRIQUE;

Asesorado (a) por el(la) DR. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ

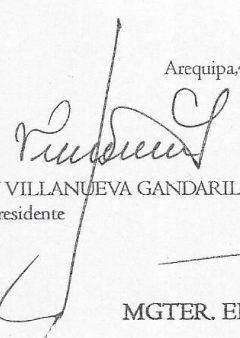
El jurado dictaminador presidido por el MGTER. GARY VILLANUEVA GANDARILLAS, e integrado por el vocal MGTER. VERONICA VALDEZ NUÑEZ y secretaria la MGTER. ELOISA ZUÑIGA VALENCIA;


DICTAMINA:

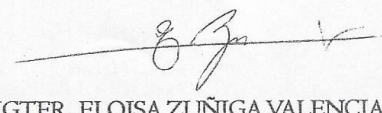
Apto su Sustentación en Acto Público

OBSERVACIONES

Arequipa, 24 de Septiembre del 2018


MGTER. GARY VILLANUEVA GANDARILLAS
Presidente


MGTER. VERÓNICA VALDEZ NUÑEZ
Vocal


MGTER. ELOISA ZUÑIGA VALENCIA
Secretaria

DEDICATORIA

Dedico mi tesis principalmente a Dios, por darme la vida y permitirme llegar hasta este momento tan trascendental de mi formación profesional.

Igualmente, dedico este trabajo a mis padres que han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, los cuales me han servido para afrontar los momentos más difíciles.

A mi Hermana que constantemente ha estado a mi lado brindándome su apoyo, poniéndose muchas veces en el rol de madre.

Gracias a todas las personas que ayudaron en la ejecución de este proyecto.

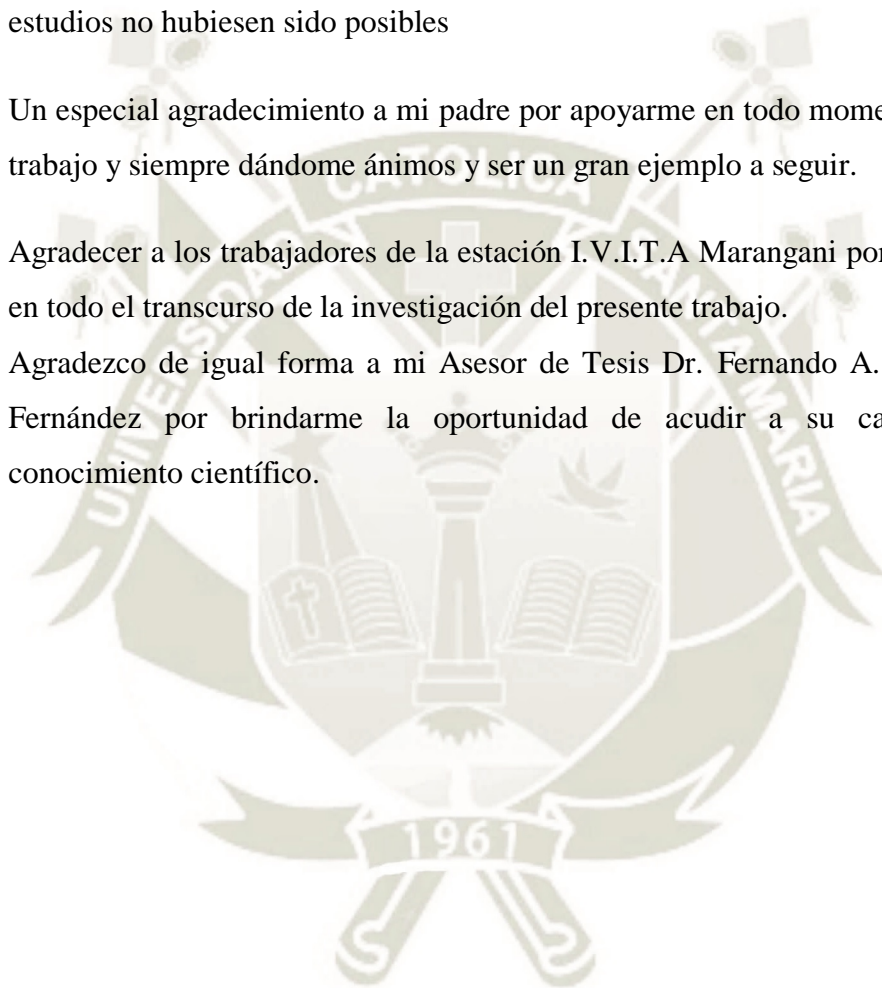
AGRADECIMIENTOS

Agradecer siempre a mi familia que siempre se preocuparon en mi formación académica y bienestar, que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios no hubiesen sido posibles

Un especial agradecimiento a mi padre por apoyarme en todo momento de este trabajo y siempre dándome ánimos y ser un gran ejemplo a seguir.

Agradecer a los trabajadores de la estación I.V.I.T.A Marangani por ayudarme en todo el transcurso de la investigación del presente trabajo.

Agradezco de igual forma a mi Asesor de Tesis Dr. Fernando A. Fernández Fernández por brindarme la oportunidad de acudir a su capacidad y conocimiento científico.



INTRODUCCIÓN

La agroindustria de los camélidos sudamericanos es una actividad única e ideal para las condiciones de producción en las zonas alto-andinas del Perú (Brenes et al., 2001). La enterotoxemia es la enfermedad infecciosa responsable de las mayores pérdidas económicas que afectan a los productores alpaqueros (Ameghino y DeMartini, 1991; Moro, 1987; Ramírez, 1987, 1998). La enterotoxemia, denominada también diarrea bacilar, es una infección aguda ocasionada por el *Clostridium perfringens*, que afecta principalmente a las crías entre la 2ª y 3ª semana de edad (Ramírez et al., 1985). Los camélidos nacen con un sistema inmune bastante inmaduro por lo que se encuentran incapacitados para responder adecuadamente a agentes patógenos. Las crías de alpacas nacen agamaglobulinémicas, es decir sin defensas inmunológicas, esto es consecuencia de la estructura física de la placenta, de tipo microcotiledonaria y epiteliocorial, que impide la transferencia de inmunoglobulinas (Igs) de la madre al feto, pero después de la ingesta de calostro se observan aumentos lineales de concentración de IgG de manera similar a lo que ocurre en otras especies domésticas. (Ameghino y DeMartini, 1991; Flodr et al., 2012).

Un anacultivo o anavacuna o vacuna integral, está constituido por las toxinas producidas por bacterias en medios de cultivo adecuados, con parte o la totalidad de las células o sus componentes particulados, obtenidos a partir del cultivo original o por combinación ulterior, que han sido destoxificadas e inactivadas sin perder antigenicidad, en cambio una vacuna es aquel microorganismo completo (vivo o muerto) que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora y duradera, frente al mismo microorganismo, sin producir efectos secundarios (Sánchez—Vizcaíno, 2006).

Es por eso que el objetivo de esta investigación es determinar la influencia de la administración de un anacultivo a partir del agente etiológico de la enterotoxemia, sobre la producción de IgG específica entre el periodo de vida de cinco a diez días de edad en crías de alpacas.

RESUMEN

El presente trabajo, tiene como objetivo Determinar la Influencia de la administración de un anacultivo a partir del agente etiológico de la enterotoxemia en alpacas, sobre la producción de IgG (inmunoglobulina G) específica en crías de alpaca inoculadas con el anacultivo a los 5 días y ver si existe un aumento de IgG a los 10 días de edad. Para este trabajo, se obtuvo muestras de intestino delgado de crías de alpacas muertas a causa de enterotoxemia, se sembró el contenido del intestino delgado en agar cerebro corazón y agar yema de huevo para el desarrollo de colonias de *Clostridium perfringens* para ser utilizadas en la preparación del anacultivo. Este anacultivo está hecho a base de caldo tioglicolato para el cual uso 40.5gr en 1000ml de agua destilada, una vez reconocida la bacteria de *Clostridium perfringens* se le coloca la bacteria al caldo tioglicolato, se esperó 24 horas y se le agregó formol al 0.1% (2.4ml para 400ml) para inactivar al *Clostridium perfringens*. Se inoculo el anacultivo al grupo control de 10 crías de alpaca con 5 días de edad y se midió los niveles de IgG mediante la prueba de inmunodifusión radial obteniendo una media de 812.169 IgG/DL y el grupo testigo 720.724 IgG/DL a los 5 días; luego de la administración del anacultivo al grupo control, la concentración de IgG/DL aumento a 1308.946 IgG/DL y el grupo testigo obtuvo una concentración de 452.113 IgG/DL 10 días después, lo cual con la prueba estadística de T muestra que el grupo control es significativo valor $p=0.002$ ($p<0.05$). Esto demuestra que el uso del anacultivo incrementa la concentración de IgG en sangre de las crías de alpacas a los 10 días. El uso de este anacultivo será muy beneficioso en las explotaciones ganaderas de alpacas ya que ayuda a incrementar los niveles de IgG y protege a las crías a una temprana edad, contra el *Clostridium perfringens*, siendo una de las principales causas de muerte de estos animales.

Palabras claves: Anacultivo, enterotoxemia, inmunoglobulina.

SUMMARY

The aim of this work is to define the influence of the administration of an anaculture, from the etiologi-cal agent of enterotoxemia in alpacas, on the production of IgG (immunoglobulin G) on alpaca's off-spring inoculated with the anaculture 5 days after birth and see if there is an increase of IgG at 10 days from birth. For this work, small intestine samples were obtained from dead alpaca's offsprings due to enterotoxaemia, the content of the small intestine was seeded in brain heart agar and egg yolk agar for the further development of *Clostridium perfringens* colonies to be used in the preparation of the anaculture. This anaculture is made of thioglycollate broth, of which 40.5gr were mixed in 1000ml of distilled water, once the bacterium of *Clostridium perfringens* is recognized, the bacteria is placed in the thioglyco-late broth. After 24 hours, it was added formaldehyde at 0.1%. (2.4ml for 400ml) to inactivate *Clostridi-um perfringens*. The anaculture was then inoculated in the control group, which consisted in 10 alpaca's offspring with 5 days old, then the IgG levels were measured by the radial immunodiffusion test, obtain-ing an average of 812,169 IgG / DL and the witness group 720,724 IgG / DL, 5 days later ; after the ad-ministration of the anaculture to the control group, the concentration of IgG / DL increased to 1308,946 IgG / DL and the witness group obtained a concentration of 452,113 IgG / DL 10 days later, which with the statistical test of T shows that the control group has a significant value $p = 0.002$ ($p < 0.05$). This re-veals that the use of the anaculture increases the concentration of IgG in the blood of alpaca's offspring after 10 days after birth. The use of this anaculture will be very beneficial in the alpaca's farms since it helps to increase the levels of IgG and protects the crias at an early age against the *clostridium perfringens*, which is one of the main causes of death in these animals.

Key words: Anaculture, enterotoxemia, immunoglobulin.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	iv
RESUMEN	v
ABSTRAC.....	vi

CAPITULO I

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	01
1.1 Enunciado del problema.....	01
1.2 Descripción del problema.....	01
1.3 Justificación del Problema.....	03
1.3.1 Aspecto general.....	03
1.3.2 Aspecto Tecnológico	03
1.3.3 Aspecto social.....	04
1.3.4 Aspecto económico.....	04
1.3.5 Importancia del trabajo.....	05
1.4 Objetivos.....	05
1.4.1 Objetivos generales	05
1.4.2 Objetivos específicos.....	05
1.5 Planteamiento de la hipótesis	06

CAPITULO II

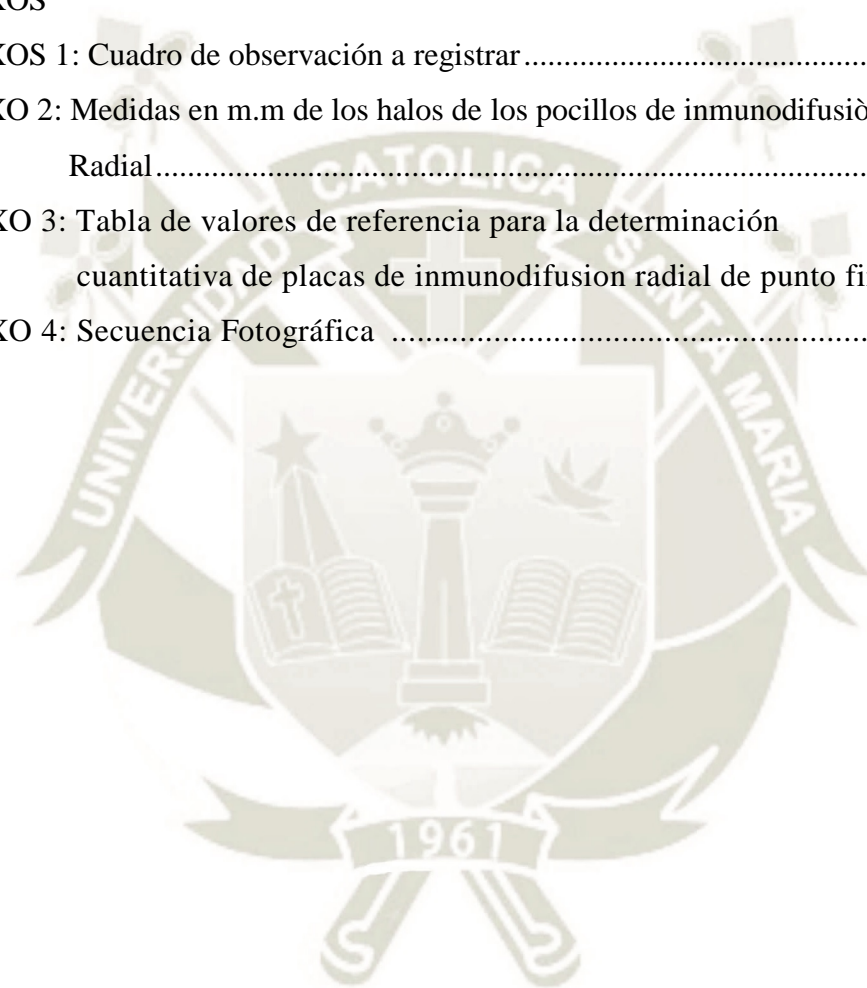
2. MARCO TEORICO O CONCEPTUAL.....	07
2.1. Análisis Bibliográfico.....	07
2.1.1 Bibliografía principal	07
2.2. Antecedentes de investigación.....	20
2.2.1. Revisiones de tesis universitarias	20
2.2.2 Otros trabajos de investigación.....	20

CAPITULO III

3. MATERIALES Y METODOS.....	24
3.1 Materiales	24
3.1.1. Localización del trabajo	24
a. Localización espacial	24
b. Localización temporal	24
3.1.2. Materiales biológicos	24
3.1.3 Materiales de laboratorio	23
3.1.4. Materiales de campo	23
3.1.5. Equipo y maquinaria	24
3.1.6 Otros materiales	25
3.2. Métodos	25
3.2.1. Muestreo	25
a. Universo	25
b. Tamaño de muestra	25
c. Procedimiento de muestreo	25
3.2.2 Métodos de evaluación	25
a. Metodología de la Experimentación	30
b.- Recopilación de Información.....	30
3.2.3. Variables de respuesta	30
A. Variables independientes	30
B. Variables dependientes.....	30
3.2.4. Análisis estadístico.....	30
a. Prueba paramétrica de T de Student.....	30
b. Análisis de significancia.....	30

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	43
RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFIA	45
ANEXOS	
ANEXOS 1: Cuadro de observación a registrar.....	52
ANEXO 2: Medidas en m.m de los halos de los pocillos de inmunodifusión Radial.....	53
ANEXO 3: Tabla de valores de referencia para la determinación cuantitativa de placas de inmunodifusión radial de punto final ..	54
ANEXO 4: Secuencia Fotográfica	55



INDICE DE CUADROS

CUADRO N°1

ANÁLISIS DE MUESTRA PAREADAS CON ANACULTIVO DE 5 Y 10 DÍAS 31

CUADRO N° 2

ANÁLISIS DE MUESTRA PAREADAS SIN ANACULTIVO DE 5 Y 10 DÍAS 33

CUADRO N° 3

ANÁLISIS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES CON ANACULTIVO DE 5 DÍAS Y SIN ANACULTIVO DE 5 DÍAS 35

CUADRO N° 4

ANÁLISIS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES CON ANACULTIVO DE 10 DÍAS Y SIN ANACULTIVO DE 10 DÍAS 37

CUADRO N° 5

ANÁLISIS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE GRUPO CON ANACULTIVO Y GRUPO SIN ANACULTIVO 39

INDICE DE GRAFICOS

GRÁFICO N° 1

ANÁLISIS DE MUESTRA PAREADAS CON ANACULTIVO DE 5 Y 10 DÍAS 32

GRÁFICO N° 2

ANÁLISIS DE MUESTRA PAREADAS SIN ANACULTIVO DE 5 Y 10 DÍAS 34

GRÁFICO N° 3

ANÁLISIS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES CON ANACULTIVO DE 5 DIAS Y SIN ANACULTIVO DE 5 DÍAS. 36

GRÁFICO N° 4

ANÁLISIS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES CON ANACULTIVO DE 10 DIAS Y SIN ANACULTIVO DE 10 DÍAS 38

GRÁFICO N° 5

ANÁLISIS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE GRUPO CON ANACULTIVO Y GRUPO SIN ANACULTIVO. 40

CAPITULO I

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.1 Enunciado del problema

Influencia de la administración de un anacultivo a partir del agente etiológico de la enterotoxemia en crías de alpacas (*Vicugna pacos*), sobre la producción de IgG específica

1.2 Descripción del problema

La alpaca y la llama han demostrado un elevado proceso de aclimatación, lo cual les permite ser especies domésticas de mayor rentabilidad económica y capaces de utilizar las pasturas alto-andinas para su eficiente conversión en fibra y carne constituyéndose el único medio de utilización productiva de las extensas áreas de pastos naturales donde no es posible la agricultura ni la crianza económica de otras especies domésticas (Bustinza, 2001).

La tenencia de los camélidos en el Perú se encuentra concentrada en pequeños propietarios de comunidades (85%) comprende un nivel tecnológico bajo y se encuentra en las comunidades y parcelas campesinas, mientras que la diferencia pertenece a empresas todavía existentes de tipo social, a cooperativas, pequeños y medianos criadores, así como empresas privadas. La crianza de alpacas por los productores comunales se caracteriza porque las condiciones de manejo, sanidad y nutricionales son muy precarias, y se dan severas condiciones de hacinamiento y subalimentación. Esto trae como resultado un alto índice de enfermedades infecciosas (enterotoxemia, colibacilosis, neumonías, necrobacilosis, entre otras) y parasitarias en sus animales, así como un rendimiento bajo de fibra y carne (Ameghino y DeMartini, 1991; Bustinza, 2001), siendo muchas familias campesinas las que tienen como principal fuente de ingreso económico el producto resultante de la comercialización de la fibra, carne, pieles y reproductores de estos camélidos. La fibra de alpaca posee un alto valor textil y es uno de los productos pecuarios de exportación más importante para el Perú (Franco *et al.*, 1998). La mortalidad en crías de alpacas constituye una de las mayores causas de pérdidas en la producción de esta especie y causa una seria limitación técnica y

económica, tanto para los trabajos de selección, así como para los reemplazos trayendo un retraso en el crecimiento de la población alpaquera. Las elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en las crías de las alpacas por el complejo diarreico producen entre el 20 y 70% de mortalidad y 75 % de morbilidad entre la primera a cuarta semana de edad son uno de los factores limitantes para el desarrollo económico de las actividades pecuarias en el mundo andino (Fernandez-Baca, *et al.*, 1970; Moro, 1971).

Elucidar las causas de muerte de las crías de alpacas ha sido tema de estudios por investigadores pioneros cuyos esfuerzos estuvieron concentrados en identificar los agentes causales, describir signos clínicos y alteraciones patológicas, así como recomendar posibles tratamientos y medidas de control (Moro y Guerrero, 1971; Ameghino y DeMartini, 1991; Ramírez, *et al.*, 1998). También significa pérdidas directas que inciden en la producción de fibra, carne y subproductos, así como también, pérdidas de divisas para el país por la fibra que se deja de producir. Es por eso que cada esfuerzo económico-práctico deberá ser dirigido para minimizar dichas pérdidas, y no cause una descapitalización y desaliento como para que la ganadería alpaquera deje de ser una actividad rentable (Ameghino y De Martini, 1991).

Para prevenir la enterotoxemia se emplean, con buen criterio, medidas de higiene y manejo que compromete asegurar, en la cría, la ingestión de calostro dentro de las primeras 12 horas de vida (Ameghino y De Martini, 1991). El uso de vacunas a partir de cepas aisladas de campo asociado a medidas de higiene y manejo es la medida de prevención más adecuada (Moro, 1971;). En un estudio realizado por Yaya y Rosadio (2005), usando un anacultivo en base a cepas de *C. perfringens* aisladas de casos clínicos, aplicando tanto a madres como a crías, lograron una disminución significativa de la mortalidad por enterotoxemia. El principal objetivo de la vacuna es proveer una inmunidad efectiva que se traduce en mantener niveles adecuados de anticuerpos específicos y linfocitos memorias para una posterior activación rápida ante un nuevo contacto antigénico (Tizard 2009); en crías de alpacas estos niveles de protección aún no han sido evaluados:

1.3 Justificación del Problema

1.3.1 Aspecto general

La crianza de alpacas se desarrolla en zonas altoandinas donde los factores climáticos favorecen el desarrollo de enfermedades diarreicas sobre todo en crías de alpacas causando una alta morbilidad y mortalidad; por lo tanto es necesario realizar investigaciones sobre mecanismos de defensa inmunológica en enfermedades infecciosas especialmente en neonatos, a fin de desarrollar medidas de prevención que incluyan agentes inmunoproliféricos (inmunización) y de manejo sanitario para su control.

La enterotoxemia en el Perú es la principal enfermedad infecciosa que afecta a las alpacas (*Vicugna pacos*) neonatas. Moro (1966) la describió por primera vez, mencionando al *Clostridium perfringens*, principalmente del tipo A, y en algunos casos al tipo C, como el agente causal. El cuadro clínico corresponde a una toxemia, generalmente de curso fatal (Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987), causando una severa enteritis hemorrágica o necrótica (Ameghino y DeMartini, 1991; Palacios, 2004).

1.3.2 Aspecto Tecnológico

Entre hatos de llamas y alpacas, las infecciones neonatales, especialmente diarrea, representa una causa importante de muertes neonatales; potenciales patógenos asociados con diarrea neonatal compleja entre llamas y alpacas incluyen *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium* spp, Giardia, coccidios y Salmonella (Cebra *et al.*, 2003). La eficiencia reproductiva de los camélidos, se considera generalmente baja en alpacas, la fertilidad anual promedio reportada es 50% (Fernandez-Baca *et al.*, 1970). Además de pobre fertilidad, la mortalidad neonatal ha sido reportada como una de las principales causas de la disminución del rendimiento de los rebaños de camélidos, la alta mortalidad de crías por problemas de inmunodeficiencias (Ramírez *et al.*, 1998).

La prevención de la enterotoxemia en el Perú, se basa en el uso de adecuadas medidas de higiene y manejo y, sobre todo, en asegurarse que el neonato ingiera el calostro dentro de las primeras 12 horas de vida (Moro, 1987); sin embargo,

estos programas preventivos raramente involucran el uso de vacunas (Ameghino y DeMartini, 1991). A pesar que inicialmente se ensayó una vacuna anticlostridial convencional para la prevención de la enfermedad en alpacas (Moro, 1987), el uso masivo de biológicos en el país fue dejado de lado debido, entre otras cosas, a la aseveración de que la presentación de la enfermedad estaba principalmente asociada a la producción de una endotoxina (enterotoxina) durante la fase de esporulación del *C. perfringens* (Ramírez, 1987). Estudios moleculares recientes indican que la mayoría de *C. perfringens* aislados de casos fatales de la enfermedad poseen mayoritariamente genes codificantes de exotoxinas (α , β y $\beta 2$) y escasamente el gen de la enterotoxina (Pérez, 2006; Rosadio *et al.*, 2008). Los estudios de genotipificación sugieren la posibilidad de desarrollar y ensayar una vacuna multivalente inactivada a base de cepas clostridiales conteniendo productos bacterianos y exotoxinas (anacultivo) para el control de la enterotoxemia (Yaya y Rosadio, 2005).

1.3.3 Aspecto social

La producción de alpacas es considerada el principal recurso económico para los habitantes de las zonas andinas a través del comercio de carne y fibra. Dependen de ella más de 150.000 familias en su mayoría de comunidades rurales en los departamentos considerados en extrema pobreza (MINAG, 2013).

La enfermedad es endémica en el Perú, y con ocurrencia de brotes o epizootias con altas mortalidades que pueden eliminar hasta el 50% de las crías nacidas en un hato (Ramírez *et al.*, 1985). La presentación de brotes estacionales o cíclicos, al parecer, es producto de las interacciones entre la capacidad inmunológica de la cría, dependiente de la presencia de anticuerpos maternos, y su habilidad de respuesta inmune al agente causal (Ortiz, 1988; Ramírez y Ellis, 1988); así como de las condiciones de manejo, factores climáticos (años lluviosos), y posibles interacciones patológicas con otros agentes infecciosos con capacidad de exacerbar o potenciar la infección clostridial (Rosadio *et al.*, 2010).

1.3.4 Aspecto económico

A pesar de la importancia de estos animales para la economía peruana, estudios sobre uso de biológicos (Vacunas) para la prevención de enfermedades entéricas

y reducir la morbilidad y mortalidad de crías de alpacas, son escasos en el país. Durante el período de nacimiento de las crías de alpacas en el Perú, los rebaños son criados extensivamente y casi el 90% de la población de la alpaca en esta región se encuentra en manos de pequeños productores, con la gerencia de salud inadecuada debido a la falta de saneamiento básico y la extrema pobreza, donde familias viven principalmente dependiendo del rebaño de alpacas para su subsistencia. La pérdida de las crías debido a una infección impone una carga económica considerable para estas personas.

1.3.5 Importancia del trabajo

Una mejor comprensión de la epidemiología de las infecciones entéricas es esencial para el desarrollo de medidas preventivas. Los datos producidos en este estudio deberían permitir una mejor comprensión del papel de las vacunas autógenas en estas infecciones en la especie en busca de manejar la respuesta inmune sistémica y prevenir las enfermedades entéricas y respiratorias en esta etapa crítica de su crianza, objeto de estudio, generando las subvenciones para la futura evaluación del potencial impacto económico de estas infecciones en la productividad de la industria de alpaca.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivos generales

Determinar la influencia de la administración de un anacultivo a partir del agente etiológico de la enterotoxemia en alpacas, sobre la producción de IgG específica

1.4.2 Objetivos específicos:

- ✓ Determinar la influencia del uso de anacultivo a base de *Clostridium perfringens* sobre la producción de IgG en crías de alpacas entre el periodo de vida de cinco a diez días de edad.
- ✓ Comparar la influencia del uso de anacultivo a base de *Clostridium perfringens* sobre la producción de IgG en crías de alpacas entre los cinco y diez días de edad.

1.5 Planteamiento de la hipótesis

Dado que la aplicación de antígenos administrado vía parenteral promueve la producción de anticuerpos.

Es posible que aplicando un anacultivo de *Clostridium perfringens* induzca la producción de IgG en crías de alpaca y es posible que estas puedan ser medidas por medio de la prueba de inmunodifusión radial simple.



CAPITULO II

2. MARCO TEORICO O CONCEPTUAL

2.1. Análisis Bibliográfico

2.1.1 Bibliografía principal

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens es una bacteria ubicua que secreta numerosas enzimas y toxinas. Pertenece al phylum *Firmicutes*, Clase *Clostridia*, Orden *Clostridiales*, Familia *Clostridiaceae*, Genero *Clostridium*, Especie *C. perfringens* (Hurtado, 2011). Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y parecen tener dos hábitats principales; el suelo y el tracto intestinal, donde forma parte de la flora microbiana normal de animales de sangre caliente (en especial el tipo A); mientras que otros (tipos B, C, D y E) son menos comunes en el tracto intestinal y pueden ser ocasionalmente encontrados en el ambiente (Murray *et al.*, 2009).

Se caracteriza por ser un bacilo Gram positivo rectangular con un tamaño de 0.6 a 2.4 μm de ancho y de 1.3 a 19 μm de largo, que se puede encontrar aislado o en parejas, rara vez en cadena; pudiendo tener una forma cocoide o cúbica en cultivos jóvenes o elongados en cultivos viejos; es inmóvil y presenta una cápsula de péptidoglicano. Rara vez forma esporas, y es variable según la cepa; los esporos son de gran tamaño, ovales, centrales o subterminales, deformando ligeramente la bacteria. Esta bacteria es anaerobia estricta relativamente aerotolerante, y se puede cultivar en presencia de un 5% de oxígeno. Crece entre 20 y 50°C, en un intervalo de pH de 5.5 a 8; la temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 37 y 45°C. Este microorganismo crece rápidamente en los tejidos y en los cultivos. En medio líquido, el crecimiento se acompaña de una producción abundante de gas, estimulada por la presencia de azúcares fermentables. En medio sólido con sangre, las colonias son circulares, regulares, lisas, de color grisáceo y aparecen dos zonas de hemólisis (Murray *et al.*, 2009).

Las características bioquímicas más importantes para su identificación son que producen proteasa, gelatinasa y fosfolipasa C; no producen lipasa; acidifica la glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa con producción de gas, y como productos terminales de la fermentación de la glucosa se obtienen ácido acético, butírico, láctico, H₂ y CO₂, lo que le confiere un ambiente anaeróbico de crecimiento (Hurtado, 2011).

La virulencia de esta especie está dada por su gran número y diversidad de exotoxinas y enzimas sintetizadas relacionadas con su potencial patógeno, las cuales son la base de su clasificación. Así, el tipo A posee sólo la toxina α ; el tipo B las toxinas α , β y ϵ ; el tipo C las toxinas α y β ; el tipo D las toxinas α y ϵ ; y el tipo E las toxinas α y τ (Petit *et al.*, 1999; Vadillo *et al.*, 2002). La toxina α , la toxina más importante y la que producen los cinco tipos, es una lecitinasa (fosfolipasa) capaz de lisar eritrocitos, plaquetas, leucocitos y células endoteliales. Esta toxina provoca una hemólisis masiva junto a un incremento de la permeabilidad vascular y de la hemorragia (la cual se ve potenciada por la destrucción de las plaquetas), destrucción tisular, toxicidad hepática y disfunción miocárdica (bradicardia, hipotensión). Las mayores cantidades de toxina α se producen por el tipo A. La toxina β es la responsable de la estasis intestinal, destrucción de la mucosa con formación de lesiones necróticas y evolución a una enteritis necrosante. La toxina ϵ , una protoxina, se activa por la tripsina y aumenta la permeabilidad vascular de la pared del tubo digestivo. La toxina τ , la cuarta toxina letal que produce el tipo E, tiene una actividad necrosante y aumenta la permeabilidad vascular (Murray *et al.*, 2009).

Además de las exotoxinas existen otros factores de virulencia presentes, los cuales se han asociado a problemas entéricos. Uno de ellos es la enterotoxina (CPE) que es sintetizada principalmente por el tipo A. La toxina es termolábil y sensible a la pronasa. La exposición a la tripsina triplica la actividad tóxica. La enterotoxina se produce durante la fase de transición desde las células vegetativas hasta las esporas, y se libera junto a las nuevas esporas cuando las células están sometidas a las fases finales de la formación de estas (esporulación). Las condiciones alcalinas del intestino delgado estimulan la esporulación. La enterotoxina liberada se une a los receptores de la membrana con borde en cepillo del epitelio del

intestino delgado en el íleon (fundamentalmente) y en el yeyuno, pero no en el duodeno. La inserción de la toxina en la membrana celular modifica su estructura y conlleva una alteración de la permeabilidad de membrana la cual provoca pérdida de fluidos y electrolitos en la mucosa intestinal. Por otra parte, la enterotoxina actúa como un súper antígeno que estimula la actividad de los linfocitos T (Murray *et al.*, 2009). Otro factor de virulencia es la toxina β_2 , la cual posee una actividad biológica similar a la toxina β , pero no presenta homología en la secuencia de aminoácidos de la toxinas (Smedley *et al.*, 2004).

CALOSTRO

El calostro se forma durante la gestación por el pasaje selectivo de inmunoglobulinas (Igs) de la circulación general a la glándula mamaria. Si bien ésta no posee gran capacidad para sintetizar Igs calostrales, puede lograr una máxima concentración a las dos semanas preparto en el equino y 3-9 días en el bovino. El pasaje del isotopo G1 del plasma a la mama, se produce por la existencia de un receptor para su fragmento Fc situado sobre las membranas celulares del acino mamario. (Fernandez, *et al.*, 1994)

En condiciones fisiológicas, el origen de la IgG e IgM es exclusivamente sérico, contrariamente a la IgA que se sintetiza localmente. La transferencia transmamaria de Igs es favorecida por la concentración de estrógenos y progesterona presentes en los últimos meses de gestación. La concentración de Ig en el calostro desciende abruptamente luego del nacimiento, llegando al 50 % entre las 9-12 hs y al 85 % a las 48 hs siguientes. Descenso ligado a la importancia de la absorción de las Igs por parte del neonato y al aumento de la actividad funcional de la glándula mamaria, que al elevar su nivel de secreción, produce una dilución de las mismas. (Fernandez, *et al.*, 1994)

Los dosajes de diversos constituyentes muestran variaciones evidentes, durante las tres últimas semanas de la gestación; las concentraciones de sodio y cloruro disminuyen, mientras que las de potasio y lactosa aumentan, al igual que las concentraciones de citrato, fosfato inorgánico, calcio total, magnesio total y proteínas totales. Estas modificaciones bioquímicas corresponden a la

transformación progresiva de pre calostro en calostro, el cual al cabo de algunos días se transformará en leche. (Fernandez, *et al.*, 1994)

SISTEMA INMUNE EN CAMELIDOS

A pesar de la importancia económica de estas especies en sus países de origen, su sistema inmunológico recién ha ocupado el interés de los investigadores en los últimos 15 años. Hamers-Casterman *et al.*, (1993) demostraron por primera vez que el suero de los camélidos contenía un único tipo de anticuerpo carente de cadenas livianas. La escasa información publicada referente al sistema inmunológico de los camélidos hace difícil describir las características únicas que las diferencian de otras especies. Sin embargo, algunos estudios han sugerido la existencia de dos distintos linajes de linfocitos B en camélidos, un linaje sintetizará los clásicos anticuerpos de cuatro cadenas y el otro linaje expresaría los anticuerpos carentes de las cadenas livianas (De Genst *et al.*, 2006).

Las inmunoglobulinas son moléculas proteínicas que desempeñan actividad de anticuerpos y son producidas por células B y células plasmáticas sensibilizadas por los patrones moleculares específicos de antígenos externos y mediante estas interacciones neutralizan y eliminan patógenos específicos del hospedero (Su *et al.*, 2002). En todos los mamíferos las inmunoglobulinas son divididas en clases o isotipos (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) y adicionalmente son divididos en subclases. Muchos estudios en inmunología animal han sido llevados a cabo con IgG, IgM o IgA (Wernery, 2001). Por ejemplo, la IgA en la leche de los camélidos se encuentra en forma S-IgA. Sin embargo, los niveles de ésta inmunoglobulina en la leche de camélidos es mucho más baja que la IgG total (Medina *et al.*, 2004).

Los camélidos nacen con un sistema inmune bastante inmaduro por lo que se encuentran incapacitados para responder adecuadamente a agentes patógenos. Las crías de alpacas nacen agamaglobulinémicas, es decir sin defensas inmunológicas, esto es consecuencia de la estructura física de la placenta, de tipo microcotiledonaria y epiteliocorial, que impide la transferencia de inmunoglobulinas (Igs) de la madre al feto, pero después de la ingesta de calostro se observan aumentos lineales de concentración de IgG de manera similar a lo que

ocurre en otras especies domésticas. (Ameghino y DeMartini, 1991; Flodr *et al.*, 2012).

INMUNOGLOBULINA G EN CAMÉLIDOS

La IgG, componente del 85% de las proteínas del suero transferidas pasivamente a las crías, es la principal inmunoglobulina absorbida por el neonato. También se transfiere, aunque en menores cantidades, la IgM. Se desconoce, sin embargo, los isotipos de IgG preferentemente absorbidos, ya que las inmunoglobulinas de los camélidos son únicas y difieren dramáticamente en relación a otras especies de animales. En los camélidos, se conoce que más del 75% de las proteínas séricas son moléculas de IgG carentes de cadena ligera y referidas como IgG2 e IgG3, y característicamente mucho más pequeñas (90 kDa) que los anticuerpos convencionales (150 kDa), con capacidades de mejor penetración tisular y una mejor biodistribución. Estos anticuerpos, denominados microglobulinas, serían mucho más eficientes, por ejemplo, para neutralizar enzimas, que los anticuerpos convencionales (Flodr *et al.*, 2012; Wernery, 2001).

De las tres subclases de IgG en camélidos denominados: IgG1, IgG2 e IgG3, la IgG1 corresponde a los anticuerpos convencionales y la IgG2 e IgG3 son los que carecen de las cadenas livianas (Wernery, 2001); éstas dos últimas son conocidas como los anticuerpos de cadena pesada (HCAbs) (Daley *et al.*, 2005). La pérdida de las cadenas livianas resulta de una alteración de la escisión que impide su transcripción al ARN mensajero y no de una supresión en el gen correspondiente (Medina *et al.*, 2004). Algunos estudios han determinado que las principales inmunoglobulinas en el calostro de los camélidos son las IgG (Weaver *et al.*, 2000), y que sus concentraciones en el calostro son más altas en los bovinos y caballos (Kamber *et al.*, 2001).

Las IgG1 son los anticuerpos clásicos o convencionales y están presentes en 25% de la IgG sérica; en cambio, la IgG2 y la IgG3 poseen dímeros de cadenas pesadas cortas, las cuales se caracterizan por poseer un fragmento cristalizante (Fc) normal sin un dominio CH1, y están presentes en 75% de la IgG sérica. Los HCAbs junto con sus VHHs tienen muchas ventajas comparados con los anticuerpos convencionales, debido a su pequeño tamaño lo que mejora su biodistribución y

permite una mejor penetración tisular (Wernery, 2001). Los HCABs son capaces de unirse a los antígenos blanco con propiedades de unión que parece equivalente a las IgG convencionales; a pesar del hecho que estos anticuerpos carecen de puntos adicionales de contacto al antígeno que es normalmente realizado por las cadenas livianas. Además, sus VHHs les confieren otras propiedades especiales como mayor especificidad a epítopes inusuales, mejorando su habilidad de unión con el sitio activo (Maass *et al.*, 2007).

La estructura básica de las inmunoglobulinas consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), unidas generalmente por puentes disulfuro. Además, se ha establecido que todas las inmunoglobulinas presentan un cierto grado de glicosilación (Medina *et al.*, 2004). Ambas cadenas contienen un Nolíposacárido unido al segundo dominio constante de la cadena pesada (CH₂) (Harmsen y De Haard, 2007).

La comparación estructural entre la IgG1, IgG2 e IgG3. Tanto la IgG2 como la IgG3 de los camélidos poseen estructuras únicas que consisten de un dominio variable simple (VHH), una región bisagra y dos dominios constantes (CH₂ y CH₃). Los dos dominios constantes son altamente homólogos a los dominios de la fracción cristalizante de los anticuerpos convencionales (Álvarez-Rueda *et al.*, 2007; Deffar *et al.*, 2009). Las IgG1 de los camélidos poseen una región de bisagra corta, tienen un peso de 170 KDa, sus cadenas livianas tienen un peso entre 28 a 32 KDa y sus cadenas pesadas pesan entre 50 a 55 KDa. Mientras que las IgG2 con sólo dos cadenas poseen una región bisagra grande, tiene un peso de 100 KDa y sus cadenas pesadas pesan 46KDa; y finalmente, las IgG3 que también poseen 2 cadenas posee una región bisagra más corta, también pesa alrededor de 100 KDa y sus cadenas pesadas pesan 43KDa (Wernery, 2001).

TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD DE LA MADRE A LA CRÍA:

Las inmunoglobulinas se transfieren de manera post natal vía calostro (equinos, vacunos, ovinos, cerdos y camélidos). En corderos que nacen generalmente con IgM y adquieren IgG durante las primeras 48 horas después del parto, resulta esencial para el rumiante neonatal ingerir IgG calostrado en las 48 horas, para recibir su complemento de anticuerpos protectores maternos frente a patógenos

potenciales. La interrupción de esta transmisión es una causa de enfermedad y muerte bien conocida en los animales recién nacidos. (Outteridge, 1985). Los sistemas de transferencia de la inmunidad materna son diferentes en cada una de las especies y están relacionados con el tipo de placenta. En aquellas especies en la que hay muchas capas de tejido entre la sangre fetal y la materna no poseen transferencia de inmunidad *in útero*. Cuando el recién nacido abandona el útero estéril de la madre se expone a numerosos agentes patógenos; Entonces el recién nacido en casi todos los casos sucumbirá a ese desafío si la madre no transfiere de forma pasiva su inmunidad a la descendencia. (Halliwell y Gurman, 1989).

Las crías de alpaca nacen sin IgG, este fenómeno se debe al tipo de placenta de la alpaca; la alpaca presenta un tipo de placenta difusa epiteliocorial, por esto no hay transferencia pasiva de IgG de la madre preñada al feto en el útero, Más bien la transferencia de IgG es pasiva a través del calostro. Las concentraciones de IgG se incrementan rápidamente después de la toma del calostro; valores elevados de IgG se evidenciaron en alpacas a las 12 horas después de nacidos, un futuro incremento se determinó a las 24 horas de vida. Así mismo las alpacas preñadas pueden producir en las glándulas mamarias y almacenar IgG proveniente del suero sanguíneo de manera gradual en un periodo cercano al parto. Los niveles séricos de IgG de alpacas periparturientas se mantuvieron constantes antes durante y después de la parición, lo que sugiere que la transferencia de IgG en alpacas no resulta del pasaje del flujo de sangre hacia las glándulas mamarias justo antes del momento de la parición, lo que si ocurre en otras especies como vacunos, ovinos equinos. (Bravo, *et al.*, 1997).

TIEMPO DE ABSORCIÓN Y NIVELES DE IgG EN SUERO DE CRÍAS:

El paso transplacentaria de inmunoglobulinas no ocurre normalmente en los temeros, corderos, lechones y potrillas, por lo que se obtienen a través del calostro. Después que el recién nacido ingiere el calostro el intestino delgado absorbe inmunoglobulinas calostrales mediante un proceso de micropinocitosis. En temeros la absorción continúa hasta 24 horas después, pero alcanza su máximo durante sus primeras 6 a 8 horas después del nacimiento; la concentración pasiva de anticuerpos desciende rápidamente después del nacimiento, en el potrilla desciende a menos del 50% del nivel máximo en el primer mes de edad. En la

ternera el nivel de IgG decrece lentamente y llega a valores mínimos hacia los 60 días. (Blood, et al, 1986).

Recientemente se demostró que en alpacas el periodo de absorción de IgG calostrual depende exclusivamente de los tiempos de lactancia realizados por la cría en las primeras 24 horas de vida (Garmendia A. Aedo R. y León C. 1990) Un estudio de 250 llamas recién nacidos a las 20 a 24 horas de edad presentó un título de IgG con una media de 1650 mg/dl. Con un rango de 0 a 3400 mg/dl. Las transfusiones de plasma intraperitoneal a los dos días de edad tuvieron una absorción de plasma que va de 18% a 61%. El cambio de título IgG en la sangre fue monitorizada mediante la utilización de placas de la compañía Triple J Farm Plate inmunodifusión radial (RID). (Jorgensen D. 1991)

Otro estudio demostró que las concentraciones promedio de IgG en crías de llama de un grupo de 20 animales después de la ingestión del calostro a las 24 horas de vida fueron de 1360 ± 597 mg/dl. (Jorgensen D. 1992) Los resultados de un trabajo con 40 crías durante los primeros 5 días de vida donde se analizó las concentraciones de IgG en el suero sanguíneo, muestran que las crías nacen agamaglobulínicas, Cinco horas después del nacimiento y tras la ingestión del calostro la concentración de IgG es de 2257,95 mg/dl, hasta 3 001mg/dl ($DS \pm 8,09 = 1$) en el primer día, al segundo día de vida la concentración es de 3377,78 mg/dl. Luego se mantiene en 2494,82 mg/dl hasta el quinto día de vida, en este estudio el 15 % de las crías sufrieron alteraciones en la transferencia pasiva de IgG, donde las concentraciones alcanzan valores bajos (375 mg/dl) a las cinco horas después del nacimiento e ingestión de calostro. (Garnica, 1992).

Se ha determinado que la IgG representa el 40 a 60% del total de proteínas en el suero sanguíneo de las crías en la vida perinatal y que las crías de alpacas nacen agammaglobulenémicas, incrementándose en sus máximas concentración el primer días después de la toma de calostro con valores de 3 065,78 para machos y 2 996,80 mg/dl para hembras, y con un promedio de 2 996,80 mg/dl en los seis días de vida. (Quispe, 1999).

Las concentraciones de IgG Las concentraciones de IgG en crías fueron diferentes por días ($P < 0,05$) con 0 mg/dl, 2342,9 mg/dl, 2329,2 mg/dl, 3201,2 mg/dl, 2738,1

mg/dl y 2638,8 mg/dl a las 12 h, 1, 2, 3, y 4 días después del nacimiento. Con una concentración de IgG 2347,1 mg/dl en crías. (Bravo, *et al.*, 1997). Se reportan concentraciones de inmunoglobulinas G en alpacas crías a los seis días de vida de $2996 \pm 0,41$ mg/dl. Así mismo se reportan concentraciones de IgG de 0,00 y $625,34 \pm 0,345$ mg/dl para machos; 0,00 y $810,67 \pm 0,60$ mg/dl para hembras antes y después de la ingestión del calostro respectivamente. (Quispe, *et al.*, 1999).

Inmediatamente después del nacimiento, la absorción de anticuerpos promedia 20%, pero ésta puede variar de 6 a 45%. Existe una rápida reducción de la eficiencia en la absorción de anticuerpos dentro de las primeras horas después del nacimiento. La digestión de anticuerpos se incrementa y las células intestinales se vuelven impermeables a los anticuerpos. Alrededor de las 24 horas después del nacimiento, las terneras pierden su habilidad para absorber anticuerpos intactos (el tracto se cierra). Las terneras que no reciben calostro dentro de las primeras 12 horas después del nacimiento raramente absorben suficientes anticuerpos para proveer una inmunidad adecuada. La mayoría de los anticuerpos que se encuentran en la sangre provienen del primer alimento. Proporcionalmente, menos IgG es absorbida en el alimento que se da a las 12 horas y muy poco es absorbido en el alimento que se da 24 horas después del nacimiento. Por tanto un retraso en la alimentación con calostro compromete la cantidad de anticuerpos absorbidos sin importar la cantidad de alimento. (Wattiaux M.A. 2003)

CONCENTRACIÓN DE IgG DEL CALOSTRO Y SUERO EN CRÍAS.

Las inmunoglobulinas calostrales dependen directamente de la absorción y cantidad de calostro en el recién nacido (Lecce J.G. y Margan D.O. 1962) Existe interrelación positiva entre la concentración de Igs calostrales de la madre y el suero de las crías en la que la concentración de Igs totales en el suero del recién nacido depende de la cantidad de Igs disponible para la absorción (Kruse V. 1970) En varios trabajos realizados se ha observado que la concentración de Igs calostrales en terneros alimentados a diferentes periodos de tiempo se identificó 3 tipos de Ig; IgG, IgA e IgM, mostrando las dos primeras una correlación lineal positiva, y la tercera una respuesta cuadrática, cuya influencia negativa no depende de su concentración en el calostro (Lecce J.G. y Margan D.O. 1962).

El efecto de interrelación positiva también fue observado en ovejas, donde la ganancia de peso del recién nacido depende de la absorción adecuada de Ig calostrales (Domínguez, 2015) El paso de los anticuerpos ocurre en forma no selectiva, mediante un sistema apical en las células intestinales de absorción, células columnares de la mucosa de tipo fetal que tienen un tiempo limitado de absorción después del nacimiento, observándose que la proporción de IgG en el suero del recién nacido refleja la cantidad de calostro absorbido. (Stott y Fellan, 1993)

Las concentraciones de IgG en suero de hembras periparturientas de: 3462 ± 111 mg/dl (antes de la parición) 3001 ± 112 mg/dl (durante de la parición) 2988 ± 155 mg/dl (después de la parición) no diferentes ($P > 0,05$) con un promedio de $3126,1$ mg/dl. Indicando que sus concentraciones fueron mantenidas inalteradas; sin embargo, los cambios realmente ocurrieron después de la parición este fenómeno es importante pues sugiere que la transferencia de IgG en alpacas no resulta del pasaje del flujo de sangre hacia las glándulas mamarias justo antes del momento de la parición, lo que es único en alpacas y llamas y que las crías nacen agammaglobulinémicas con concentraciones IgG que aumentan rápidamente después de lactación (Bravo, *et al*, 1997).

FALLA EN LA TRANSFERENCIA PASIVA

La insuficiencia parcial de la transferencia pasiva se define como una desviación estándar por debajo de la media normal de las concentraciones de inmunoglobulinas, y la falta de transferencia pasiva como dos desviaciones estándar por debajo de la media normal de las concentraciones de inmunoglobulinas, a las 24 horas después del nacimiento. La falta de transferencia pasiva se asocia con aumento de mortalidad a la edad de 1 a 5 semanas, y la inanición secundaria es una causa frecuente de muerte. (Blood, *et al*, 1986).

A mayor nivel de Ig presentes en suero, menor presentación de enfermedades y viceversa. Los siguientes factores y sus interrelaciones establecen el nivel de anticuerpos que el animal tendrá durante las tres primeras semanas de vida: 1. El volumen de calostro producido por la madre, 2. La cantidad de calostro ingerido, 3. Concentración de inmunoglobulinas en el calostro (calidad), 4. El tiempo

transcurrido entre el nacimiento y la ingestión del calostro, 5. La adsorción de anticuerpos (Transferencia Pasiva), 6. El estrés ambiental (condiciones del clima, presencia o ausencia de la madre, grado de confinamiento, exposición a patógenos, 7. Higiene y habilidad del “becerrero” para recibir y atender a la cría. (Domínguez, 2015)

Una vez combinados estos factores, el nivel de anticuerpos séricos queda establecido, la determinación de Ig es útil como un método para estimar la condición de las becerras que llegan al área de crianza o para las adquiridas por los centros de recría, así como para diagnosticar una hipogamaglobulinemia en la becerro enferma, también para investigar un problema de morbilidad y mortalidad en una población de neonatos. La determinación de inmunoglobulinas es útil para diagnosticar el éxito o la falla en la transferencia pasiva de Ig en el becerro. (Domínguez, 2015).

Ha sido, demostrado que la falla en transferencia pasiva de inmunoglobulinas es un determinante importante en mortalidad causada por enfermedades infecciosas en crías de alpaca en las tres primeras semanas de vida. En crías hasta los 3 días de nacidas concentraciones de Ig G en el suero de 9 mg/ml son consideradas como falla en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas y concentraciones de 10-15 mg/ml como falla parcial. Y valores superiores a 15 mg/ml fueron considerados como normales (Garmendia, *et al.*, 1990). En crías de 4 a 20 días de nacidas, concentraciones de 2 DS por debajo del promedio normal son falla de transferencia pasiva (FTP) y 1 DS Falla de transferencia pasiva parcial. (Garmendia y McGuire, 1987).

Existe una clara correlación inversa entre la cantidad de Ig que absorbe el ternero y la mortalidad de los mismos. La falla en transmisión pasiva en terneros se puede deber a dos factores: la edad del ternero en el momento del encalostamiento y la cantidad de Ig absorbida, otros factores pueden ser comportamiento de la madre, estrés raza, y la época del año. (Halliwell y Gurman, 1989).

La absorción inicial de calostro y la ingesta continua de IgA o IgG. A través de la leche es importante para la protección contra la enfermedad entérica. La falla de estos procesos predispone al animal a la infección. Existen tres factores para la

falta de transferencia adecuada del calostro: falla en la producción, falla en la ingesta y falla en la absorción. Las alpacas también parecen sufrir una frecuencia desproporcionada de falta de transferencia pasiva. (Tizard, 2009).

VACUNAS

Vacuna es aquel microorganismo completo (vivo o muerto) que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora y duradera, frente al mismo microorganismo, sin producir efectos secundarios (Sánchez—Vizcaíno, 2006).

La vacunación sistémica frente a estas infecciones superficiales aporta cierto grado de inmunidad, ya que permite transferir pequeñas cantidades de IgG desde el suero hasta la superficie mucosa. De hecho, muchas vacunas disponibles actualmente simplemente estimulan niveles elevados de anticuerpos de la clase IgG en la sangre. Estos son efectivos porque una vez que los microorganismos invasores producen daño tisular e inician una respuesta inflamatoria, el lugar de invasión se inunda por IgG. No obstante, está claro que esta no es una manera efectiva de aportar inmunidad. Sin embargo, la formación de IgA constituye el mecanismo efector principal de la respuesta inmune a nivel local, por lo que obtener una buena respuesta de IgA representa el primer objetivo de las vacunas de mucosas que puede impedir la colonización del agente y la consiguiente progresión hacia la enfermedad (Gómez-Lucía *et al.*, 2007, Tizard, 2009). La ruta más simple para destruir la habilidad patógena de los microorganismos, consiste en mantener su constitución antigénica y a la vez prevenir su replicación con métodos adecuados (Peter J. Delves 2006).

El objetivo de la vacunación es proveer inmunidad efectiva estableciendo niveles adecuados de anticuerpos y una población importante de células memoria que puedan activarse rápidamente ante un nuevo contacto con el antígeno y por lo tanto proveer protección contra la infección; las condiciones que deben ser satisfechas por una vacuna para que pueda ser considerada exitosa son: Efectividad (producción de niveles protectivos e inmunidad); Disponibilidad (fuentes accesibles); Estabilidad (bajo condiciones climáticas extremas); Economía (teniendo en cuenta el sitio de aplicación); y Seguridad (eliminando cualquier tipo de patogenicidad) (Peter J. Delves 2006)

Desde el punto de vista tecnológico, las vacunas convencionales pueden ser vivas atenuadas o muertas inactivadas. Las vacunas anticlostridiales son ampliamente usadas en crianza de ovinos; y ellas han sido usualmente administradas como vacunas combinadas conteniendo la bacteria y sus toxinas formalizadas (vacunas muertas inactivadas) (Outteridge, 1985).

Los resultados del aislamiento y análisis molecular de las cepas de *C. perfringens* corroboran que la patogenicidad clostridial involucra principalmente a la acción de exotoxinas mayores (α y β_2), descartando indirectamente el rol principal atribuido a la endotoxina (enterotoxina) en la patogenia de la enterotoxemia. (Yaya *et al.*, 2005)

Una vacuna multivalente convencional (anacultivo) redujo las frecuencias de mortalidad neonatal total y específica a enterotoxemia. Si bien estos niveles de mortalidad no son ideales para una explotación comercial de países industrializados, la vacuna logró reducir la mortalidad total hasta 9.3% (2003) y la pérdidas por enterotoxemia hasta 0.3 % (2004), indicando que tasas de mortalidad menores del 10% y específicas por enterotoxemia menores del 1% podrían ser objetivos razonablemente alcanzables. Las frecuencias de mortalidad obtenidas en ese estudio fueron históricamente menores para la unidad de producción y para la región geográfica colindante, según los reportes internos de la empresa. (Rosadio *et al.*, 2012).

Efectos beneficiosos de la vacuna con exotoxinas mayores en el control de la enterotoxemia se ah observando en animales de comunidades campesinas y en algunas empresas privadas después de 4-5 años de introducida la vacuna (Desco [Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo], comunicación personal). El verdadero efecto positivo de dicha vacuna en el control de la enfermedad se asocia con la presencia de un elevado porcentaje de animales vacunados, que en condiciones prácticas de manejo, se logra después de 2-3 años de iniciado el programa de vacunación. (Yaya *et al.*, 2005).

2.2. Antecedentes de investigación

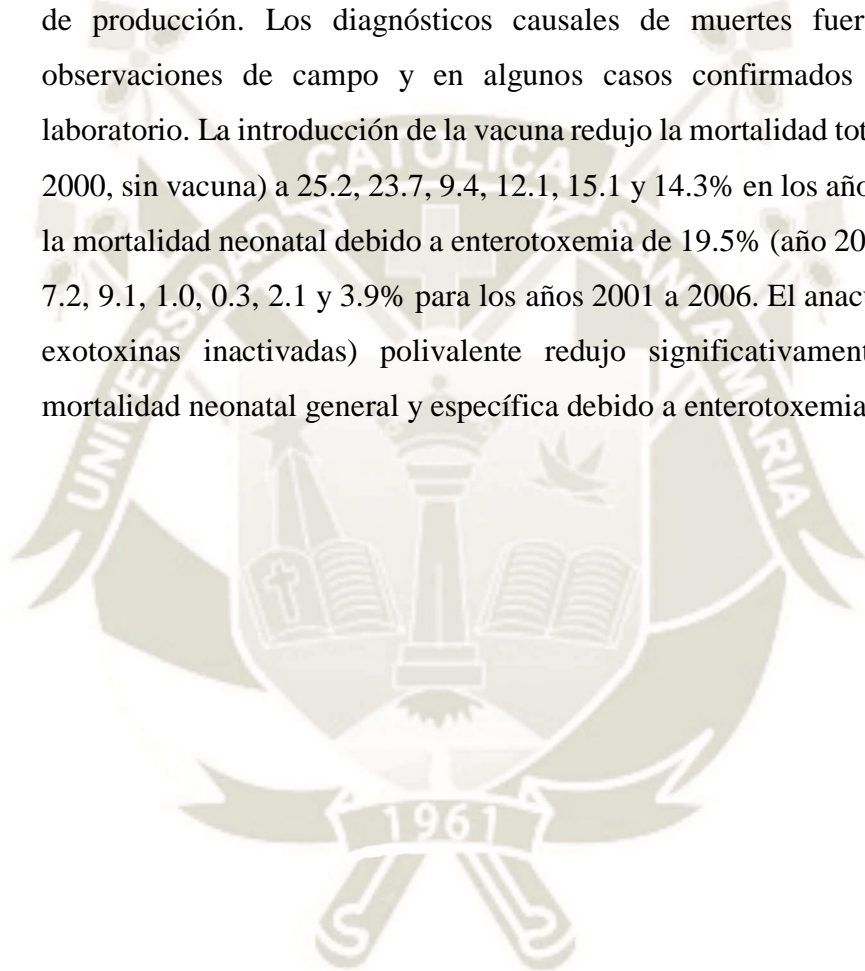
2.2.1. Revisiones de tesis universitarias

Quispe W. 2009: Determinó la edad de producción de concentraciones adecuadas de IgG de camélido (> 1000 mg/dl) en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS "La Raya" durante los meses de marzo a julio del 2009, utilizaron 20 animales recién nacidos, 10 con acceso libre al calostro de su madre (grupo 1) y 10 alimentados con calostro de bovino (grupo 2), el monitoreo fue desde el día de nacimiento hasta los cuatro meses de edad. Mediante la técnica de inmunodifusión radial simple, encontró concentraciones promedio de IgG en suero de 397,284 mg/dl, 360,878 mg/dl, 431,008 mg/dl, 379,153 mg/dl, 497,865 mg/dl, 889,014 mg/dl, 1444,935 mg/dl, 1863,717 mg/dl y 2086,633 mg/dl a los 2, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 días respectivamente, para el grupo 2; mientras que 3165,237 mg/dl, 1483,118 mg/dl, 1240,814 mg/dl, 1035,778 mg/dl, 717,639 mg/dl, 527,523 mg/dl, 932,568 mg/dl, 1195,951 mg/dl y 1368,578 mg/dl, para los mismos días respectivamente, en el grupo 1. Evaluó además la influencia del peso al nacimiento sobre el inicio de producción de niveles adecuados de IgG, resultando esta no significativa ($p \leq 0,05$), pero existe una clara interacción ($p \leq 0,01$) entre ambos factores (peso al nacimiento y edad de la cría). En conclusión determinó que las crías de alpaca inician la producción de IgG en niveles de concentración adecuados (> 1000 mg/dl) a partir de los 79 días de vida, ajustándose esta producción a una tendencia lineal polinómica cuadrática ($p \leq 0,01$), considerándose entonces desde esta edad altamente reactiva a la exposición de antígenos.

2.2.2 Otros trabajos de investigación

Rosadio R, Yaya K, Veliz A, Quispe T. Realizaron un estudio el cual analiza el efecto beneficioso de una vacuna multivalente a base de componentes bacterianos y toxinas inactivadas (anacultivo) para la prevención de la enterotoxemia en alpacas. La vacuna múltiple, conteniendo mayoritariamente (60%) cepas de *Clostridium perfringens* tipos A y A β 2, fue introducida en el año 2001 en una unidad de producción alpaquera en el distrito de Ñuñoa (Melgar, Puno) y utilizada durante seis años consecutivos. El efecto de la vacuna fue analizado comparando

las tasas de mortalidad neonatal total y específica por enterotoxemia en el año 2000 con las mortalidades presentadas durante los seis años de vacunación (2001-2006). El estudio contempló vacunar a todas las hembras preñadas y a todas las crías en el primer año (2001) y solamente a las crías en los años siguientes; sin embargo, en el 2003 se vacunó solamente a las madres gestantes. La mortalidad fue calculada en base a los reportes administrativos mensuales de mortalidad de crías preparados por el personal sanitario y veterinario responsable de la unidad de producción. Los diagnósticos causales de muertes fueron basados por observaciones de campo y en algunos casos confirmados por análisis de laboratorio. La introducción de la vacuna redujo la mortalidad total de 37.4% (año 2000, sin vacuna) a 25.2, 23.7, 9.4, 12.1, 15.1 y 14.3% en los años 2001 a 2006, y la mortalidad neonatal debido a enterotoxemia de 19.5% (año 2000, sin vacuna) a 7.2, 9.1, 1.0, 0.3, 2.1 y 3.9% para los años 2001 a 2006. El anacultivo (bacteria y exotoxinas inactivadas) polivalente redujo significativamente las tasas de mortalidad neonatal general y específica debido a enterotoxemia.



CAPITULO III

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3.1.1. Localización del trabajo

a. Localización espacial

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. CICAS La Raya y en el IVITA Marangani de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ubicado a $14^{\circ} 47' 43,45''$ de latitud sur y $71^{\circ} 04' 55,21''$ de longitud oeste, a una altura que varía de 4 000 a 5 000 msnm. La Raya, está clasificada como una zona de vida sub alpina muy húmeda con precipitaciones cíclicas con niveles máximos en enero y mínimos en los meses de junio a agosto con un promedio anual de 765 mm y la temperatura promedio anual es de 6.52°C .

b. Localización temporal

El presente trabajo se realizó entre los meses de diciembre del 2017 y enero del 2018.

3.1.2. Materiales biológicos

- 20 Crías de alpacas huacayas de 5 días de nacidas
- Sueros de crías de alpacas de 5 y 10 días de edad.
- Cepa de *Clostridium perfringens*.

3.1.3 Materiales de laboratorio

Reactivos

- Caldo Tioglicolato
- Agar tripticasa soya
- Sangre desfibrinada de ovino
- Bateria de Gram
- Reactivos para pruebas bioquímicas
- Agar Yema De Huevo
- Formalina
- Alcohol yodado

Materiales

- Micropipeta de 5 μ l
- Viales de 6 ml.
- Placas de inmunodifusión radial simple con anticuerpos para IgG,
- Regla milimetrada calibrada en O, 1 mm,
- Medio De Transporte Cary Blair
- Placas Petri

3.1.4. Materiales de campo

- Botas de hule.
- Mameluco.
- Mandil

- Soga.
- Coouler,
- Refrigerantes
- Guantes descartables,
- Vacutainer de 10 ml
- Jeringas de 10 ml
- Agujas hipodérmicas (21 G x 1"),
- Algodón.
- Bolsitas plásticas de 50 ml,
- Plumón marcador indeleble
- Pintura

3.1.5. Equipo y maquinaria

- Centrífuga
- Congeladora marca LG.
- Estufa
- Microscopio óptico a 100, 400 y 1000 aumentos.
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Balanza
- Mechero

3.1.6 Otros materiales

- Materiales de escritorio
- Materiales de impresión

3.2. Métodos

3.2.1. Muestreo

a. Universo

El universo estuvo constituido por el total de la población de 100 alpacas preñadas del hato del IVITA Marangani (Fuente: Registro de diagnóstico de preñez 2017)

b. Tamaño de muestra

Se muestreo el 20 % de la población de crías nacidas desde el inicio de la parición

c. Procedimiento de muestreo

Mediante un muestreo aleatorio simple, se asignaron las repeticiones según tratamiento.

3.2.2 Métodos de evaluación

a. Metodología de la Experimentación

Se seleccionaron 20 alpacas preñadas al azar y se las identificó hasta el momento del parto, se verificó que cada cría tome el calostro de sus madres y fueron identificadas; todas las crías tuvieron el mismo manejo que se realiza en la punta de parición del hato y se distribuyó en dos grupos de 10 Crías cada uno en forma aleatoria.

Al primer grupo se le administró 2 ml por vía subcutánea un anacultivo a base de cepas de *Clostridium perfringens* obtenido de casos de enterotoxemia de crías de alpacas y al 2do grupo se le administró un placebo por vía subcutánea.

Preparación de anacultivo de *Clostridium perfringens*

- El *Clostridium perfringens* se obtuvo a partir de cepas de campo aisladas, procedentes de crías de alpacas muertas por enterotoxemia, obteniendo así el contenido intestinal.
- Luego fueron conservadas en medio de transporte Cary Blair (Eurotubo, Deltalab España) hasta su procesamiento en el laboratorio.
- Las cepas fueron cultivadas en caldo tioglicolato e incubadas a 37°C por 24 h en ambiente de anaerobiosis.
- Luego se tomaron alícuotas del medio para sembrarlas en Placas Petri con agar sangre.
- Posterior a eso, fueron incubadas a 37 °C por 24 h en ambiente de anaerobiosis.
- Las colonias de *C. perfringens* fueron identificadas en base a características morfológicas de la colonia, patrón hemolítico, coloración Gram, reacción negativa a la catalasa y pruebas bioquímicas para la identificación.
- Estas colonias de *C. perfringens* se sembraron en Placas Petri con agar yema de huevo para hacer la prueba de lecitinasas, que es una prueba específica para poder identificar la toxina A del *C. perfringens* indicándonos así, que toxoide usamos para el anacultivo.
- Posteriormente incubamos a 37 °C durante 18-24 h bajo anaerobiosis.
- Finalmente reactivamos en el caldo tioglicolato las cepas de *C. perfringens* a 37°C por 24 horas.
- Posteriormente el cultivo fue inactivado con formalina a una concentración de 1% por 24 horas y se obtuvo una suspensión de cepas de *Clostridium perfringens* inactivadas.
- Se administró 2ml del anacultivo preparado por vía subcutánea a cada cría de alpaca para ver el efecto que causa en las crías, esperando que el nivel de IgG aumente después de la aplicación de este anacultivo.

Obtención del suero sanguíneo de las crías.

- Conforme fueron naciendo las crías, se les tomó muestras de sangre a los 5 y 10 días después del parto, por venopunción yugular, para lo cual se utilizó agujas hipodérmicas de 21 G x 1" y Vacutainer de colección de sangre en tubos con separador de plasma debidamente rotulados con el número de arete de la cría y la fecha de nacimiento.
- Las muestras se trasladaron en un cooler con refrigerantes para mantener la muestra entre 2 – 4 °C hasta llegar al laboratorio para su análisis
- Mediante centrifugación se obtuvo el suero de la sangre de cada muestra y fueron almacenados en viales estériles debidamente rotulados
- Las muestras fueron llevadas a congelación a -20 °C hasta su posterior análisis.
- Luego de haber obtenido las 20 muestras y habiéndolas conservado debidamente, procedimos a descongeladas 2 horas antes, para poder hacer la lectura a temperatura ambiente.
- Se realizó los respectivos análisis de las concentraciones mediante el “Test de inmunodifusión radial para cuantificación de IgG de camélidos en suero o plasma” de Triple Farms Bellingham, WA”. Este test esta valorizado en \$ 98 dólares cada disco que contiene 24 pocillos, el cual está hecho con un antígeno de IgG de camélido

Técnica de análisis:

Para la determinación de las concentraciones de IgG se utilizó el método de inmunodifusión radial desarrollado por Fahey y Mckelvey (1965) y Mancini (1965).

Principio de la inmunodifusion radial:

La inmunodifusión radial está basada en la difusión radial del antígeno (inmunoglobulina G) desde un pocillo circular dentro de un gel homogéneo conteniendo un antisuero específico para IgG, formándose un anillo de precipitado de antígeno y anticuerpo que continua creciendo hasta llegar a un equilibrio

denominado punto de cese que ocurre a las 24 horas. Los diámetros formados son directamente proporcionales a las concentraciones del antígeno. La cuantificación se realiza por la medida del diámetro del anillo que posteriormente se lleva a una curva de calibración de regresión lineal simple.

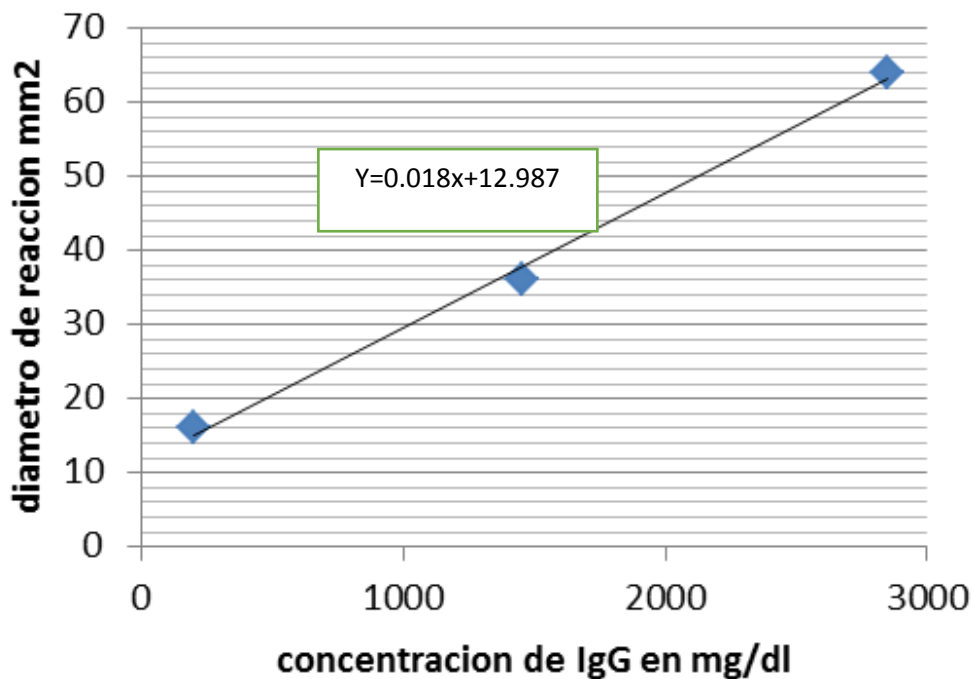
Procedimiento:

Para la determinación de las concentraciones de IgG se siguió los siguientes pasos:

- Se descongelaron 3 sueros estándares de referencia los cuales hacen la curva de calibración de IgG, estos sueros vinieron con los discos del “Test de inmunodifusión radial para cuantificación de IgG de camélidos en suero o plasma” de Triple Farms Bellingham, WA”. Al mismo tiempo también se descongelaron los viales con muestras de suero de las 20 crías.
- Se retiraron los discos de IgG del refrigerador 30 minutos antes de depositar los tres sueros estándares de referencia y las muestras de suero de las 20 crías en los pocillos, para así eliminar la excesiva humedad, abriendo el disco para que por evaporación seque la superficie y los pocillos.
- Se depositó en los pocillos de la placa 5 μ l de cada uno de los sueros de referencia.
- Luego se depositaron 5 μ l de cada suero de cría de alpaca en los pocillos del disco de inmunodifusión radial.
- Se registró la hora y fecha al terminar el llenado y se tapó el disco.
- El registro para cada disco, fue en el orden que se colocó los sueros estándares y las muestras en cada pocillo.
- Los discos con su cubierta de plástico se colocaron en una superficie plana para que fueran incubados a temperatura ambiente, para poder así esperar la reacción antígeno-anticuerpo durante 24 horas
- La lectura se realizó midiendo los diámetros de los anillos de precipitación antígeno-anticuerpo utilizando una regla milimetrada calibrada en O, 1mm. 24 horas después.

Curva de calibración

De los sueros de referencia estándar con concentraciones de IgG conocidas de: 2851mg/dl, 1452mg/dl y 203 mg/dl se obtuvieron los promedios de los diámetros correspondientes que fueron: 8; 6 y 4 mm estos valores fueron elevados al cuadrado, datos que corresponden al eje de las ordenadas, mientras que en el eje de las abscisas se tiene las concentraciones de los sueros estándar de referencia para IgG específicos para camélidos. Donde los diámetros de las muestras desconocidas se reemplazan en la ecuación de la recta para hallar sus concentraciones respectivas de IgG en mg/dl.



Fuente: Elaboración propia.

En la figura se observa los valores de la concentración de IgG de los sueros estándares que sirve para la determinación de la concentración de IgG en suero de alpacas

b.- Recopilación de Información

- **En el campo:** las muestras se obtuvieron mediante veno punción de las crías para luego centrifugar la sangre y analizar el plasma sanguíneo.
- **En el laboratorio:** se realizó la medición de las concentraciones de IgG en el plasma sanguíneo mediante la prueba de inmunodifusión radial simple
- **En la biblioteca:** se realizó una revisión bibliográfica de libros, revistas y tratados del tema en mención.
- **En otros ambientes generadores de la información científica:** se consultó con expertos en el tema, revisión de páginas web, revistas indexadas y otros.

3.2.3. Variables de respuesta

A. Variables independientes

- Crías de alpacas con y sin anacultivo.
- Crías de alpacas de 5 y 10 días de edad

B. Variables dependientes

Concentración de IgG en suero de crías de alpaca.

3.2.4. Análisis estadísticos

A. Prueba paramétrica de T de Student: para los grupos A y B se utilizará la T de Student de independencia y para las muestras obtenidas a los 5 y 10 de días de nacidas se utilizará la prueba de T de Student para muestras pareadas

B. Análisis de significancia: Se utilizará la tabla de T de Student.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

CUADRO N°1

NIVELES PROMEDIOS DE IgG mg/DL EN CRÍAS DE ALPACA CON ANACULTIVO (CA) A BASE DE *Clostridium perfringens* A LOS 5 Y 10 DÍAS DE NACIDAS

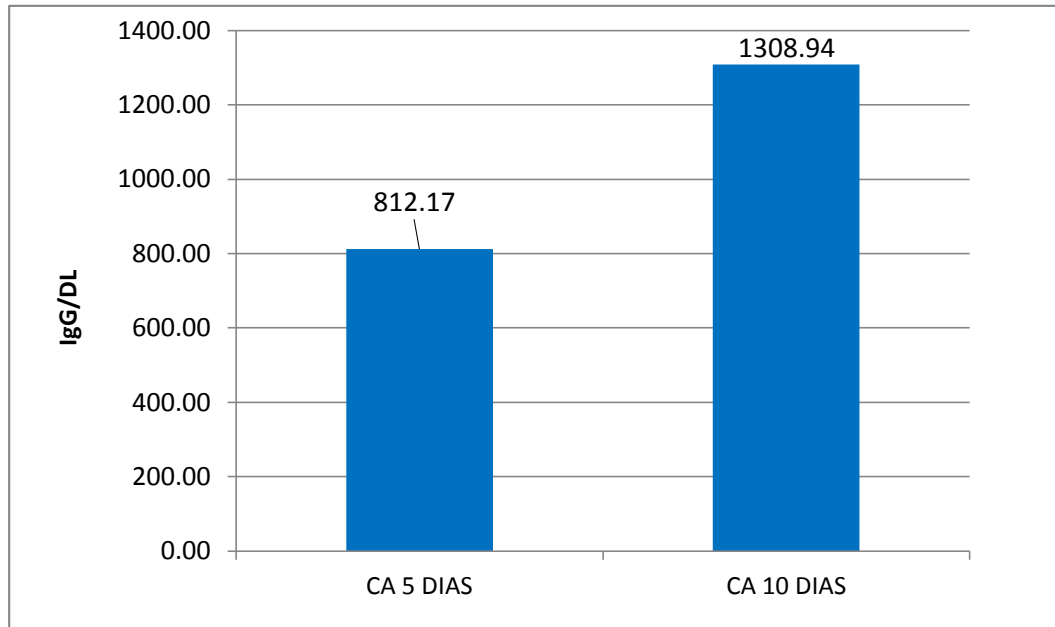
Numero de muestra	Con anacultivo 5 días (IgG mg/DL)	Con anacultivo 10 días (IgG mg/DL)	Diferencia de medias (IgG mg/DL)	Significancia
10	812.169	1308.946	496.777	P<0.05

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro N° 1 se observa el promedio del grupo de animales que fueron tratados con el anacultivo a los 5 días y su efecto a los 10 días. Resultando $P < 0.05$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula con un 95.0% de confianza, lo cual indica que si hay diferencia significativa entre los días evaluados.

GRÁFICO N° 1

NIVELES PROMDIOS DE IgG mg/DL EN CRÍAS DE ALPACA CON ANACULTIVO (CA) A BASE DE *Clostridium perfringens* A LOS 5 Y 10 DÍAS DE NACIDAS



Fuente: Elaboración propia.

Los datos del cuadro N° 1 se pueden ver expresados en el gráfico N° 1 donde se observa un incremento de 496.777 IgG mg/DL a los diez días de edad en las crías de alpaca administradas con el anacultivo.

CUADRO N° 2

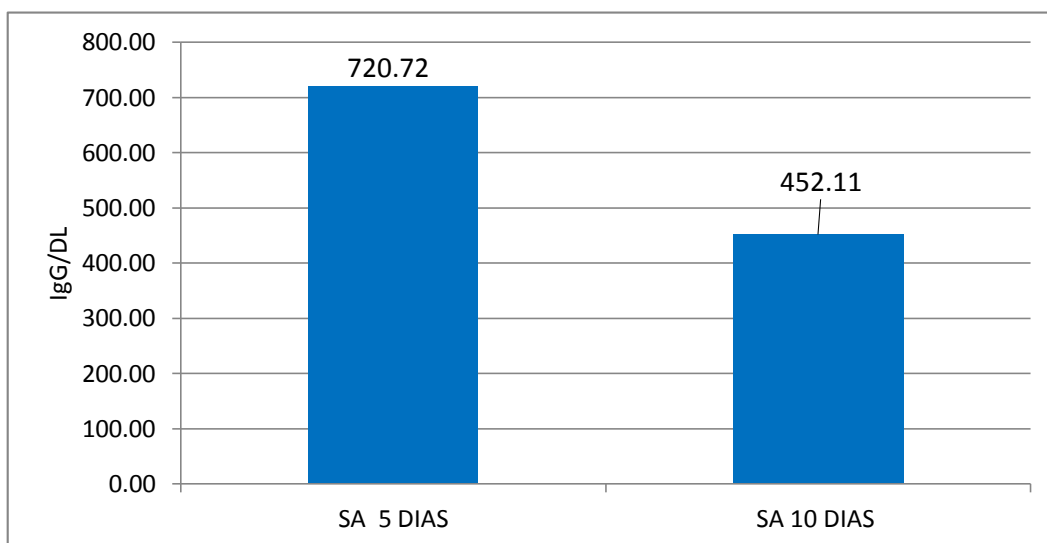
**NIVELES PROMEDIO DE IgG mg /DL EN CRÍAS DE ALPACA SIN
ANACULTIVO (SA) A LOS 5 Y 10 DÍAS DE NACIDAS**

Numero de muestra	Sin anacultivo 5 días (IgG mg/DL)	Sin anacultivo 10 días (IgG mg/DL)	Diferencia de medias (IgGmg/DL)	Significancia
10	720.72	452.11	268.611	P<0.05

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro N° 2 se observa el promedio de los animales del grupo control sin anacultivo a los 5 y 10 días, resultando $P < 0.05$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula al 95.0% de confianza, lo cual indica que si hay diferencia significativa entre los días evaluados.

GRÁFICO N° 2

NIVELES PROMEDIO DE IgG mg /DL EN CRÍAS DE ALPACA SIN
ANACULTIVO (SA) A LOS 5 Y 10 DÍAS DE NACIDAS

Fuente: Elaboración propia.

Los datos del cuadro N° 2 se pueden ver expresados en el gráfico N° 2 donde se observa que hay una disminución de 268.611 IgG mg/DL a los 10 días frente a los 5 días de edad en las crías de alpaca sin la administración de anacultivo.

CUADRO N° 3

NIVELES PROMEDIO DE IgG mg/DL EN CRÍAS DE ALPACA CON ANACULTIVO (CA) A BASE DE *Clostridium perfringens* Y SIN ANACULTIVO (SA) A LOS 5 DÍAS DE NACIDAS

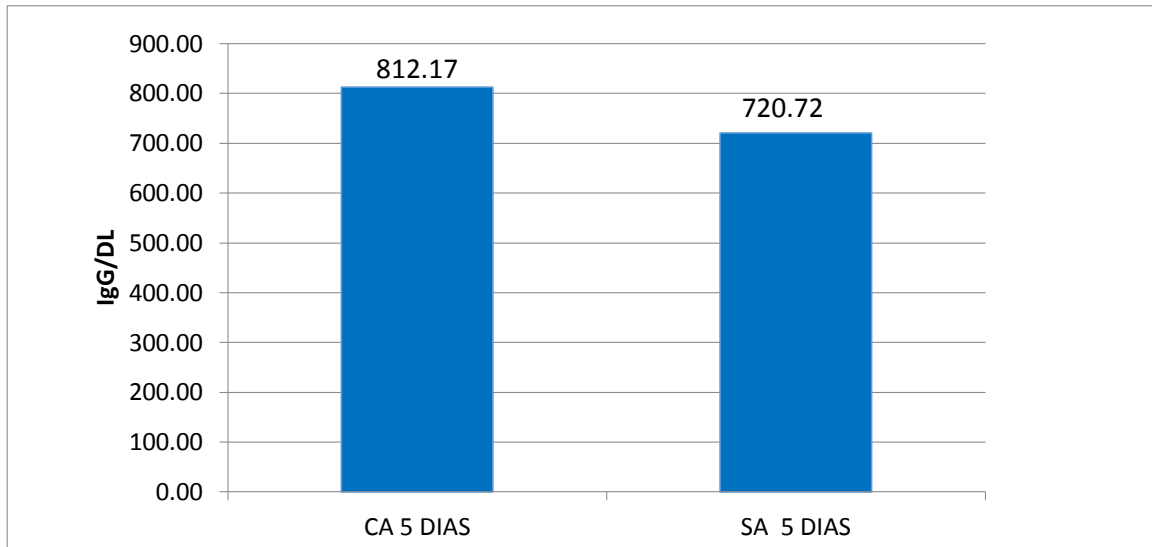
	5 días con anacultivo	5 días sin anacultivo
Número de muestra	10	10
Promedio (IgGmg/DL)	812.17	720.72
Diferencia de medias (IgGmg/DL)	91.45	
Nivel de Significancia	P>0.05	

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro N° 3 se observa el promedio de los grupos de los animales que fueron tratados con anacultivo y sin anacultivo a los 5 días de nacidas, resultando $P > 0.05$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, lo cual indica que no hay diferencia significativa entre grupos.

GRÁFICO N° 3

NIVELES PROMEDIO DE IgG mg/DL EN CRÍAS DE ALPACA CON ANACULTIVO (CA) A BASE DE *Clostridium perfringens* Y SIN ANACULTIVO (SA) A LOS 5 DÍAS DE NACIDAS



Fuente: Elaboración propia.

Los datos del cuadro N° 3 se pueden ver expresados en el gráfico N° 3, donde se observa que hay una diferencia de 91.45 IgG mg/DL entre el grupo de crías con anacultivo y sin anacultivo a los 5 días de nacidas.

CUADRO N° 4

NIVELES PROMEDIO DE IgG mg/DL EN CRÍAS DE ALPACA CON ANACULTIVO (CA) A BASE DE *Clostridium perfringens* Y SIN ANACULTIVO (SA) A LOS 10 DÍAS DE NACIDAS.

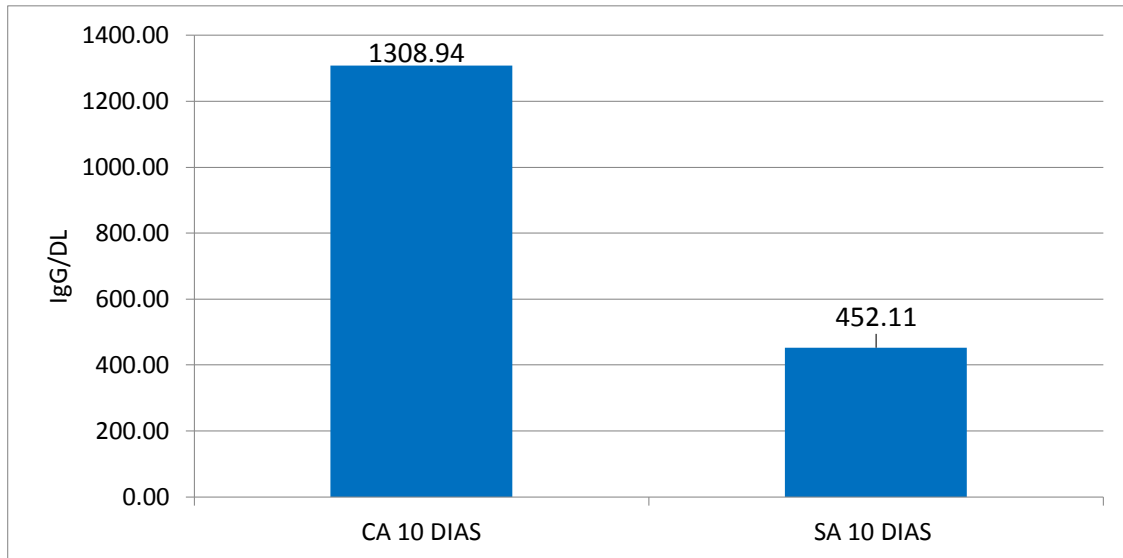
	10 días Con anacultivo	10 días Sin anacultivo
Número de muestra	10	10
Promedio (IgGmg/DL)	1308.94	452.11
Diferencia de medias (IgGmg/DL)	856.83	
Nivel de Significancia	P<0.05	

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro N° 4 se observa el promedio de los grupos de las crías que fueron tratadas con anacultivo y sin anacultivo a los 10 días de nacidas, resultando $P < 0.05$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula con un 95% de confianza, lo cual indica que existe diferencia significativa entre grupos.

GRÁFICO N° 4

NIVELES PROMEDIO DE IgG mg/DL EN CRÍAS DE ALPACA CON ANACULTIVO (CA) A BASE DE *Clostridium perfringens* Y SIN ANACULTIVO (SA) A LOS 10 DÍAS DE NACIDAS.



Fuente: Elaboración propia.

Los datos del cuadro N° 4 se pueden ver expresados en el gráfico N° 4, en el cual se observa que hay una disminución de 856.83 IgG mg/DL en el grupo de crías sin anacultivo frente al grupo de crías con anacultivo a los 10 días de nacidas.

CUADRO N° 5

**NIVELES PROMEDIO DE IgG mg/DL EN CRÍAS DE ALPACA DE LA
DIFERENCIA DE MEDIAS DE GRUPO CON ANACULTIVO (CA) A BASE DE
Clostridium perfringens Y GRUPO SIN ANACULTIVO (SA).**

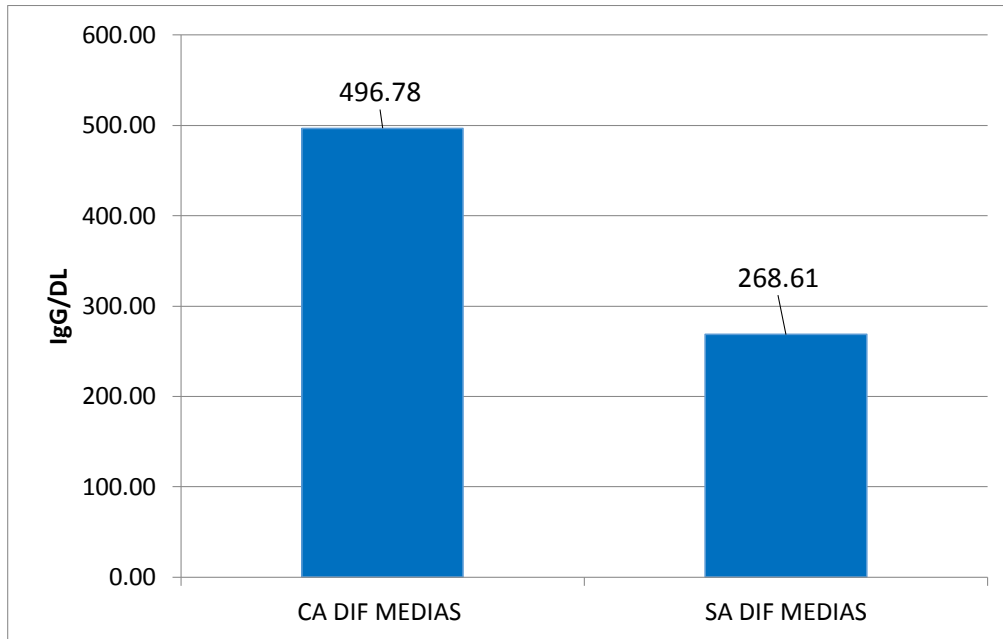
	Con anacultivo	Sin anacultivo
Número de muestra	10	10
Promedio (IgGmg/DL)	496.78	268.61
Diferencia de medias (IgGmg/DL)	228.17	
Nivel de Significancia	P<0.05	

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro N° 5 se observa los promedios de la diferencias de medias del grupo con anacultivo y sin anacultivo, siendo $P < 0.05$, rechazando la hipótesis nula con un 95.0% de confianza, lo cual indica que si hay diferencia significativa entre grupos.

GRÁFICO N° 5

NIVELES PROMEDIO DE IgG mg/DL EN CRÍAS DE ALPACA DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE GRUPO CON ANACULTIVO (CA) A BASE DE *Clostridium perfringens* Y GRUPO SIN ANACULTIVO (SA).



Fuente: Elaboración propia.

Los datos del cuadro N° 5 se pueden ver expresados en el gráfico N° 5, donde se observa que hay una disminución de 228.17 IgG mg/dl del grupo de crías sin anacultivo respecto al grupo de crías con anacultivo.

DISCUSIÓN

La placentación epiteliocorial de los camélidos evita el pasaje de las inmunoglobulinas al feto como sucede en los demás ruminantes (Weaver *et al.*, 2000), por ende las crías de alpacas y llamas, nacen hipogammaglobulinémicas, esto quiere decir que la cría tiene que consumir un adecuado nivel de calostro y todas las inmunoglobulinas de la leche de la madre; Además, algunos estudios han determinado que las principales inmunoglobulinas en el calostro de los camélidos son las IgG (Weaver *et al.*, 2000) y que sus concentraciones en el calostro son más altas en los bovinos y caballos (Kamber *et al.*, 2001).

El anacultivo elaborado a base de *Clostridium perfringens* incrementa los niveles de IgG después de su aplicación mostrándonos que hay una influencia positiva entre el anacultivo y los niveles normales de IgG a los 10 días de edad de la cría, Linares et al 2009 analizo el efecto del plasma sanguíneo de alpacas adultas en crías de alpacas a los dos días de nacidas, siendo administrado por vía oral, sus resultados muestran niveles de 2670.74 mg/DL; comparando ese valor a los dos días de nacida con los 1308.94 mg/dl a los 10 días de edad en crías a las que se le administro el anacultivo a base de *Clostridium perfringens*, observamos una influencia positiva por parte del anacultivo.

Mientras la cría va ingiriendo el calostro, sus concentraciones de IgG aumentan rápidamente, Quispe et al 2009 nombra que a los 15 días de edad de una cría de alpaca tiene un valor medio de 1483.118 IgG/DL y en este trabajo se obtuvo una media de 452.11 mg/DL en crías a los 10 días de edad y sin la administración del anacultivo, como nombra Quispe et al 2009 las crías empiezan a producir sus propias IgG a partir de los 75 días de edad, por lo tanto, siguen con la reserva de IgG calostrual que le dio la madre en los primeros días, los valores comparados con este trabajo, pueden variar debido al diferente manejo de las crías y pudo a ver una Falla de Transferencia Pasiva (FTP) en ciertos animales. También el hecho de que pueda a ver madres primerizas podría significar que algunas crías no hayan recibido los cuidados respectivos por la madre y un mayor porcentaje de FTP según Riquelme et al 2017.

En los resultados de esta tesis, podemos observar que a crías que se les administro el anacultivo, tienen una diferencia de medias de 1308.94 mg/dl a los diez días de edad y el grupo al que no se le administro anacultivo una diferencia de medias de 452.11 mg/dl a los diez días de edad, lo cual muestra una amplia diferencia en las concentraciones a los diez

días de edad entre las crías que se les administro el anacultivo y las crías que no se les administro el anacultivo.

Pachari et al., 2008, analizo los valores de Concentración de IgG (mg/dl) en calostro de alpacas madres después del parto, encontrando valores con media de $3\ 770 \pm 246,6$ IgG mg/dl en 30 alpacas madres lo cual indica que los resultados obtenidos para el presente estudio demuestran que hay una clara influencia entre la concentración de IgG en calostro y suero de las crías de alpacas. Para la determinación del tiempo de absorción, evaluó los valores de concentración de IgG en crías, con respecto al tiempo de retraso en la alimentación con calostro a las 2, 4, 6, 8, 10, 24 horas, se registró los niveles ajustados de absorción de IgG en suero de crías de 2760,35 IgG mg/DL; 2190,55 IgG mg/DL; 2804,35 IgG mg/DL; 2702,27 IgG mg/DL; 2681,55 IgG mg/DL; 1583,75 IgG mg/DL, para cada tiempo antes mencionado, no habiendo encontrado diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) lo que indica que la absorción continúa hasta las 24 horas con una tendencia a mayor concentración de IgG en suero de crías a las 6 horas. Estos resultados indican que mientras van pasando las horas, las crías de alpaca, van perdiendo sus niveles de IgG ya que aún no son capaces de generar sus propios anticuerpos.

En nuestro trabajo, observamos que en el grupo testigo, hay una disminución de 268.611 mg/dl a los diez días frente a 5 días de edad en las crías de alpaca sin la administración de anacultivo, lo cual nos podría llevar a entender que es muy recomendable inmunizar a las crías de alpaca desde sus primeros días de edad, ayudando a prevenir enfermedades infecciosas, especialmente la enterotoxemia, ya que el anacultivo, está hecho a partir de una cepa de *Clostridium perfringens*, lo cual induce a la producción de IgG en las crías de alpaca.

Observando la diferencia de medias de los dos grupos de animales que usamos en el trabajo, se puede apreciar que en el grupo de los animales a los cuales se les administro el anacultivo, vemos que hay una diferencia de medias entre las concentraciones de las 10 crías con una concentración de 496.777 mg/dl, mientras tanto, en el grupo de los animales testigo, a los cuales no se les administro el anacultivo, observamos una diferencia de medias de 268.61 IgG/DL, mostrando una clara diferencia entre estos dos grupos.

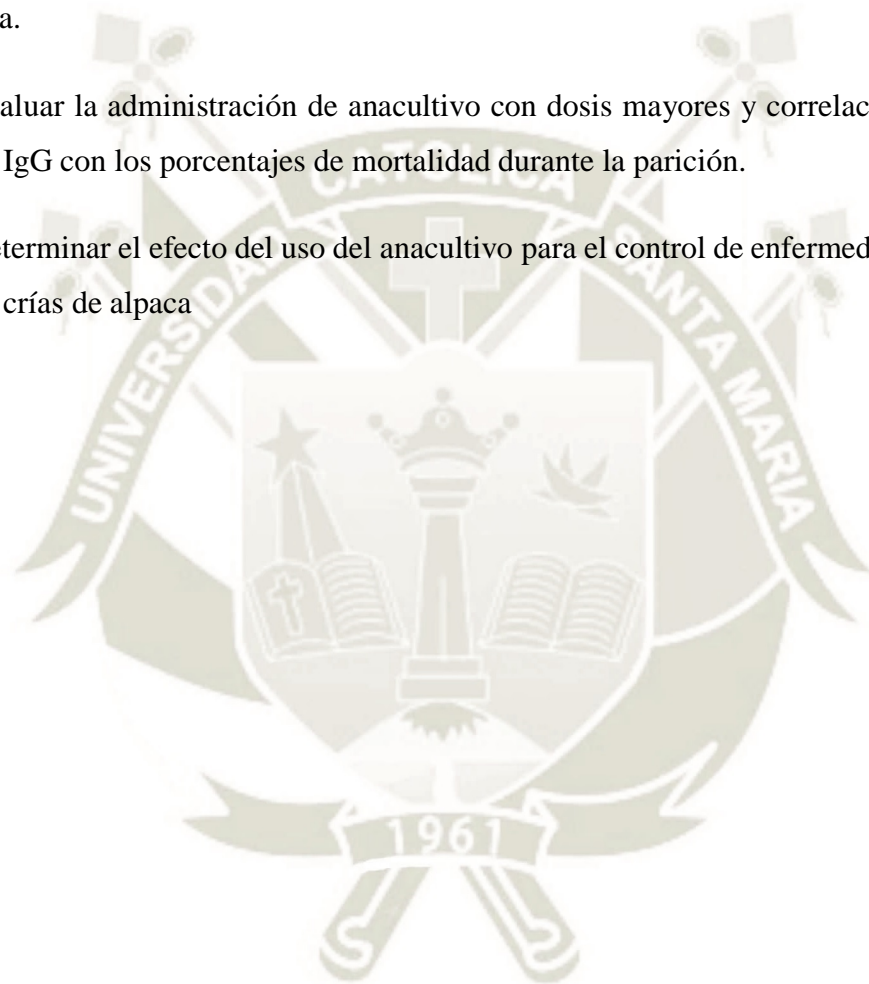
CONCLUSIONES

- Se determinó que el uso de anacultivo a base de cepas de *Clostridium perfringens* provenientes de casos de enterotoxemia tiene influencia positiva sobre la producción de IgG.
- Las crías de alpacas que son inoculadas con anacultivo a los 5 días de edad, incrementan sus niveles de IgG a los 10 días de edad.
- Determinamos en este trabajo que el grupo tratado con el anacultivo tiene un número mayor de IgG mg/DL frente al grupo no tratado.



RECOMENDACIONES

1. Considerar el uso del anacultivo como una opción para proteger a las crías de alpaca contra enterotoxemia.
2. Realizar mayores estudios sobre la inmunidad en crías de alpaca, con relación madre cría.
3. Evaluar la administración de anacultivo con dosis mayores y correlacionar los niveles de IgG con los porcentajes de mortalidad durante la parición.
4. Determinar el efecto del uso del anacultivo para el control de enfermedades pulmonares en crías de alpaca



BIBLIOGRAFIA

1. Álvarez-Rueda N, Behar G, Ferré V, Pugnère M, Roquet F, Gastinel L, Jacquot C, Aubry J, Baty D, Barbet J, Birklé S. 2007. Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical hapten. *Mol Immunol* 44:1680–1690.
2. Ameghino, E., & De Martini, J. (1991). Mortalidad en Crías de alpacas Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. 71-80.
3. Blood D.C., Henderson IA., Radostits O.M. (1986). *Medicina Veterinaria*. Sexta - Edición. Nueva -Editor1af fnt-eramer1cana. S.A. -de. C.V. México D.F *Pag.* 198
4. Braathen R, Hohman V, Brandtzaeg P, Johansen F. 2007. Secretory Antibody formation; Conserved Binding Interaction between J chain and polymeric Ig receptor from humans and amphibians. *J. Immunol* 178: 1589-1597.
5. Brenes, E.; K. Madrigal; F. Pérez; K. Valladares. 2001. El cluster de los camélidos en Perú: Diagnóstico competitivo y recomendaciones estratégicas. Disponible en: <http://www.caf.com/attach/4/default/CamelidosPeru.pdf>
6. Bravo PW, Garnica J, Fowler ME. 1997. Immunoglobulin G concentrations in periparturient llamas, alpacas and their Crías. *Small Rumin Res* 26:145-149.
7. Bustinza, V. 2001. LA ALPACA Conocimiento del gran potencial Andino. Oficina de Recursos del Aprendizaje- Secciones publicaciones –UNA-Puno. Primera edición. P. 11-24.e Innovación. 13-32.
8. Carbajal M. 1974. Determinación de las causas de mortalidad en crías de alpaca en el departamento de Puno en las campañas ganaderas de 1972 y 1973. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ Nacional del Altiplano. 44 p.
9. Cebra CK, Mattson DE, Baker RJ, Sonn RJ, Dearing PL. 2003. Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 223: 1806-1808.
10. Corthésy B, Spertini F. 1999. Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem. Nov*; 380(11):1251-62.

11. Daley LP, Gagliardo LF, Duffy MS, Smith MC, JA. 2005. Application of Monoclonal antibodies in functional and comparative investigations of heavy-chain immunoglobulins in new world camelids. *Clin Diag Lab Immunol* 12(3): 380–386.
12. Deffar K, Shi H, Li L, Wang X and Zhu X. 2009. Nanobodies – the new concept in antibody engineering. *Afr J Biotechnol* 8(12):2645–2652.
13. Domínguez, UI. 2015. Antimicrobianos en el calostro. En entorno Ganadero. Año 12 Nro. 73. Agosto Setiembre. pp 20-24
14. Fernández, A.S.; Padola, N.L.; Estein, S.M. 1994. El calostro, fuente de transferencia de la inmunidad http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/cria_amamantamiento/01calostro.htm
15. Fernández Baca, S.; W. Hansel; C. Novoa. 1970. Embryonic mortality in the alpaca. *Biol. Reprod.* 3: 243-251.
16. Fernandez Baca, S 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
17. Flodr Hanna, Wheeler J., Krüger P., Olazábal J. Rosadio R. 2012. Pruebas de campo para evaluar calidad calostrual en la alpaca. *Rev Inv Vet Perú*; 23(3): 307-316.
18. Franco E, Pezo D, García W. 1998. Gestión de centros de producción de reproductores de alpacas y llamas. *Pub. Tec. FMV* N° 37
19. Garnica J. (1992). Absorción de IgG en- los primeros días de Vida en Crías de Alpacas. IIPC - UNA Resumen del XI congreso nacional de Ciencias Veterinarias. del Perú. ·Puno – Perú. Pag·1·54
20. Garmendia A, McGuire T. 1987. Mechanism and isotypes involved in passive immunoglobulin transfer to the newborn alpaca (*Lama pacos*). *Am J Vet Res* 48:1465-1471.

21. Garmendia A, McGuire T., y Aedo R. (1990). Precipitación de Suero con Sulfito de Sodio: Método Rápido para Evaluar la Transferencia Pasiva de inmunoglobulinas calostrales a las Crías de Alpaca. Bol. de div. N° 23 del IVIT A, Lima, Perú. 34-35 Pag 57.
22. Gómez-Lucía Duato E (2007) El complejo mayor de histocompatibilidad. En “Manual de Inmunología Veterinaria”. Gómez-Lucía E, Blanco MM y Doménech A (eds.). Pearson Prentice Hall. Madrid. Pp. 117-136.
23. Halliwell R. Gurman N. (1989). Inmunología Clínica Veterinaria. Primera Edición. Editorial Acríbia· S.A Zaragoza- España: Pag243).
24. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyld, S., Robinson, G., ·Hamers, C., Bajyana Songa, E., y otros. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature (363), 446-448.
25. Harmsen MM, De Haard HJ. 2007. Properties, production, and applications of camelid single domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol 77:13–22.
26. Hurtado JL., 2011. La enterotoxemia en alpacas: algunos aspectos etiológicos y clínicos. Revisión bibliográfica. Sistema de Revisiones en Investigación. FMV-UPG-UNMSM Perú pp 2-10..
27. Jorgensen, D. (1991). llama immunoglobulin G (IgG), and it's role asan indicator of health status. *Llama Life*. www.kentlabs.com/artic/es_igghea/th.htm.
28. Jorgensen D. Triple J. Farms (1992). IgG (an immunity factor) and its importance in the newborn llama. Llama Association of North America, LANA. USA. Pag 193
29. Kamber R, Farah Z, Rusch P, Hassig M. 2001. Studies on the supply of immunoglobulins G to newborn camel calves (*Camelus dromedaries*). J Dairy Res 68:1–7.
30. Kruse, V. 1970. Absorption of immunoglobulins from colostrum in newborn calves. Anim. Prod. 12:627
31. Lecce J.G. & Morgan D.O. {1962) Effect of Dietary Regimen on Cessation of Intestinal Absorption of Large Molecules (closure) in the Neonatal Pig and Lamb. *J Nutr*. Pag. 6.

32. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB. 2007. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods* 324(1-2):13–25.
33. Medina MA, Fernandez F, Saad S, Rebuffi G, Yapur J. 2004. Inmunoglobulinas G de cadenas pesadas en la leche de los camélidos sudamericanos. *J Neotrop Mammal* 11(1): 19–26
34. MINAG, 2013. Publicación de Anuario Estadístico Agroindustrial.
35. Moro M. 1966. Enfermedades infecciosas de las alpacas. Enterotoxemia, diarrea bacilar producida por el *Clostridium welchii* tipo A. *Rev Fac Med Vet, UNMSM*.18-20: 85-87.
36. Moro M. 1971. Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) UNMSM. Lima, Perú. p 9-14.
37. Moro M, Guerrero C. 1971. La alpaca: enfermedades infecciosas y parasitarias. *Bol Div IVITA, Lima*. 63 p.
38. Moro M. 1987. Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas. *Rev. Camélidos Sudamericanos, Lima* 4: 8-13. Murray *et al.*, 2009).
39. Murray; P., Rosenthal K; Pfaller M. 2009. *Medical microbiology*. 6th ed. Editorial Philadelphia. USA 947 pp.
40. Ortiz S. 1988. Evaluación de algunos métodos de control de la mortalidad en crías de alpaca (*Lama pacos*) en explotaciones familiares. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 58 p.
41. Outteridge, P. 1985. *Veterinary immunology*. Academic Press. London, U.K. 280 p.
42. Palacios C. 2004. Caracterización anatomopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ Nacional Mayor de San Marcos. 164 p.

43. Pérez D. 2006. Genotipificación y subtipificación de cepas de *Clostridium perfringens* de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 91 p.
44. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt. 2006. Roitt's Essential Immunology. Eleven Edition. Blackwell publishing. EEUU. pp.467.
45. Petit L, Gibert M, Popoff M. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 7: 104-110.
46. Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthésy B. 2002. Secretory component: a new role in secretory IgA mediated immune exclusion in vivo. Immunity 17(1):107-15.
47. Porporatto C, Bianco ID, Correa SG. 2007. La modulación del sistema inmune de mucosas con polisacáridos, bases para una atractiva alternativa en terapia. Acta Bioquím Clín Latinoam 41(2):203–211.
48. Quispe M. Pacheco R. Garnica J. Bravo PW. 1999. Proteínas totales e inmunoglobulinas G en la vida perinatal de la Alpaca. Libro de resúmenes del Segundo Congreso Mundial Sobre Camélidos Sudamericanos. Cuzco - Perú. Pag 211.
49. Quispe W. 2009. Determinación del tiempo de producción de IgG en crías de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann – Tacna
50. Ramírez A, Huamán D, Ellis RP. 1985. Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. INIPA y SR-CRSP. Reporte Técnico N.º 63. Lima. 17 p.
51. Ramírez A. 1987. Alpaca *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia: purification and assays of the enterotoxin. PhD Thesis. USA: Colorado State University. 201 p.
52. Ramírez A, Franco E, Pezo D, García W. 1998. Diagnóstico y control de enfermedades en CSA. Pub. Tec. FMV 34: 9-14

53. Rosadio R, Yaya K, Véliz A, Quispe T. 2012. Efecto protector de una vacuna polivalente anticlostridial sobre la mortalidad neonatal en alpacas. *Rev Inv Vet Perú*; 23 (3): 299-306
54. Sánchez—Vizcaíno J.M. 2006. Vacunas y sueroterapia. En manual de inmunología veterinaria. Pearson Educación, Madrid, pp. 513-535.
55. Smedley JG, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA. 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152:183 – 204
56. Stott G. H. and Fellan A. (1993) Function and Passive Immunity in the Cyst calf. *J. Dairy Sci.* Pag. 61.
57. Su Ch., Nguyen VK and Nei M. 2002. Adaptive evolution of variable region genes encoding an unusual type of immunoglobulin in camelids. *Mol Biol Evol* 19(3):205–215.
58. TIZARD, Ian. *Inmunología veterinaria*. Editorial Mc Graw Hill. 6 ed. México D.F. 2002. 517 p.
59. Tizard I. 2009. *Introducción a la inmunología veterinaria*. 8a edición, Editorial ELSEVIER, España, S.L. pp 223-227.
60. Vadillo SM, Píriz SD, Mateos EY. 2002. *Manual de microbiología veterinaria*. Madrid: McGraw-hill interamericana. 853pp.
61. Wattiaux M.A. 2003. *Crianza de Terneras del Nacimiento al Destete, Importancia de alimentar con Calostro*; Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison. Pag. 18.
62. Weaver DM, Tyler JW, Marion RS, Wallace LM, Nagy JK, Holle JM. 2000. Evaluation of assays for determination of passive transfer status in neonatal llamas and alpacas. *J Am Vet Med Assoc.* 216:559-563.
63. Wernery U. 2001 Camelid immunoglobulin and their importance for the New-Born. *J Vet Med* 48:561-568.

64. Yaya K, Rosadio R. 2005. Ensayo de tres programas de vacunación Anticlostridial en alpacas. Rev Inv Vet Perú; 16 (1):49-55
65. Zaldívar M. 2002. El Sistema inmunológico de las mucosas. Rev Cubana Med Gen Integr. 5: 24-36.



Anexos 1

Cuadro de observación a registrar

Cuadro 1. Niveles de concentración de IgG (mg/dl) en suero de crías con y sin anacultivo a los 5 y 10 días después de nacidas.

N° cría	Concentración de IgG T ₁			Concentración IgG (testigo) T ₀		
	5 Días	10 Días	Discrepancia de niveles de IgG	5 Días	10 Días	Discrepancia de niveles de IgG
1	403.50	454.06	-50.56	354.06	305.72	48.33
2	354.06	403.50	-49.44	612.39	354.06	258.33
3	667.39	505.72	161.67	612.39	354.06	258.33
4	354.06	454.06	-100.00	354.06	258.50	95.56
5	354.06	667.39	-313.33	898.50	354.06	544.44
6	959.06	2834.06	-1875.00	403.50	354.06	49.44
7	354.06	667.39	-313.33	612.39	558.50	53.89
8	354.06	612.39	-258.33	1414.06	1147.39	266.67
9	2320.7 2	3292.39	-971.67	667.39	167.39	500.00
10	2000.7 2	3198.50	-1197.78	1278.50	667.39	611.11

Anexo 2

Medidas en mm de los halos de los pocillos de inmunodifusión radial

Muestra	ESPACIO EN EL DISCO	5 días (mm)	10 días (mm)	CONDICION
1	A4	3.79	3.84	Con Anacultivo
2	A5	3.1	3.65	Con Anacultivo
3	A6	4.35	3.92	Con Anacultivo
4	A7	3.7	3.87	Con Anacultivo
5	A8	3.47	4.19	Con Anacultivo
6	B1	4.81	7.25	Con Anacultivo
7	B2	3.07	4.07	Con Anacultivo
8	B3	3.57	4.23	Con Anacultivo
9	B4	6.66	7.75	Con Anacultivo
10	B5	7.74	5.72	Con Anacultivo
11	B6	3.5	4.08	Sin Anacultivo
12	B7	3.65	4.25	Sin Anacultivo
13	B8	4.18	4.25	Sin Anacultivo
14	C1	3.01	3.56	Sin Anacultivo
15	C2	3.74	4.66	Sin Anacultivo
16	C3	3.76	3.4	Sin Anacultivo
17	C4	4.15	4.05	Sin Anacultivo
18	C5	5.48	5.06	Sin Anacultivo
19	C6	4.27	6.09	Sin Anacultivo
20	C7	8.49	6.29	Sin Anacultivo

ANEXO 3

Tabla de valores de referencia para la determinación cuantitativa de placas de inmunodifusión radial de punto final

Table of Reference Values for the Quantitative Determination of End Point Plates

Plate Lot #6284A15 Standard Lot 6286H

Y Intercept $b = 12.987$ Slope of the Line $m = 0.018$

Camelid IgG		ENDPOINT		CONCENTRATIONS IN		MG DL	
dia _j	conc _j	dia _k	conc _k	dia _i	conc _i	dia _n	conc _n
3.9	121.699	5.2	769.331	6.5	1602.001	7.8	2619.708
4	164.947	5.3	826.813	6.6	1673.716	7.9	2705.658
4.1	209.29	5.4	885.39	6.7	1746.527	8	2792.702
4.2	254.72	5.5	945.062	6.8	1820.433	8.1	2880.842
4.3	301.262	5.6	1005.829	6.9	1895.433	8.2	2970.076
4.4	348.89	5.7	1067.69	7	1971.529	8.3	3060.405
4.5	397.613	5.8	1130.647	7.1	2048.719	8.4	3151.829
4.6	447.431	5.9	1194.699	7.2	2127.004	8.5	3244.348
4.7	498.344	6	1259.845	7.3	2206.384	8.6	3337.961
4.8	550.351	6.1	1326.086	7.4	2286.859	8.7	3432.67
4.9	603.454	6.2	1393.423	7.5	2368.429	8.8	3528.474
5	657.651	6.3	1461.854	7.6	2451.094	8.9	3625.372
5.1	712.944	6.4	1531.38	7.7	2534.854	9	3723.365

Radial Immunodiffusion Test For Camelid IgG
24 wells

Immunodiffusion plate containing antiserum to Camelid IgG in agarose gel for quantitation of Camelid IgG by Radial Immunodiffusion

store plate upside down at 4 to 8 degrees centigrade
avoid jarring and near freezing temperatures
plate will not measure equine, bovine or goat IgG

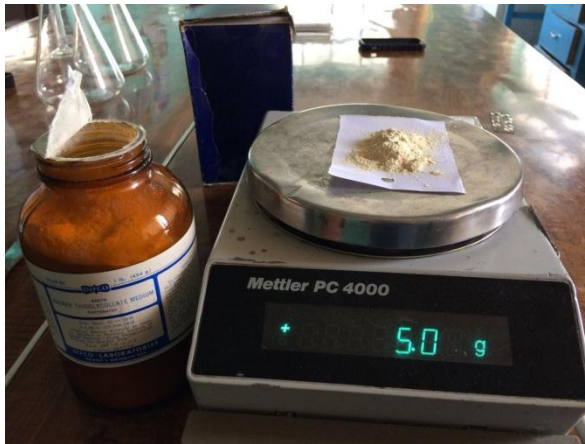
Lot #: 6284A15 Expires: October 29, 2018
Triple J Farms
777 Jorgensen Place Bellingham Washington USA
phone 360-398-9512 fax 360-398-1766 e mail Jason@kentsabs.com

This table of batch specific reference values is a computer print out upon data from several parallel testings of fresh plates. It may only be used for the determination of above mentioned protein using plates with Lot number specified above. Samples with diameters "<REF 3" should be tested with the LL. (Low Level) Plates especially developed for this concentration range. Precipitation diameters of ">RED 1" require a dilution of the sample using NaCl solution. The accuracy of the values is dependent upon laboratory-specific conditions. Therefore it should be regularly controlled by plotting reference curves using the suitable reference standards. The values depend partially on the quantity of the sample (5 ul), the temperature (21-25 degrees C), the diffusion time (24 hours) and the age of the plates. During each series of determinations also test at least one Control Serum. The control result must fall within the given assay range of this serum or results for unknowns cannot be considered valid. This table should be used only after its validity has been verified by the user under his test conditions.

Triple J Farms 777 Jorgensen Place Bellingham, WA 98226

ANEXO 4

SECUENCIA FOTOGRÁFICA



PREPARACION ANACULTIVO

Figura 1: Pesaje del caldo tioglicolato



Figura 2: disolviendo el medio de cultivo del medio de cultivo mediante calentamiento



Figura 3: reacción de la bacteria en el medio de cultivo (formación de espuma)

RECONOCIMIENTO DEL CLORTRIDIUM

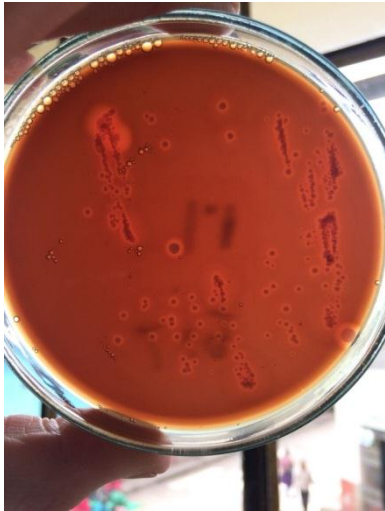


Figura 4: Formación de colonias de *clostridium perfringens* en agar sangre



Figura 5: Formación de colonias de *clostridium perfringens* en agar yema de huevo

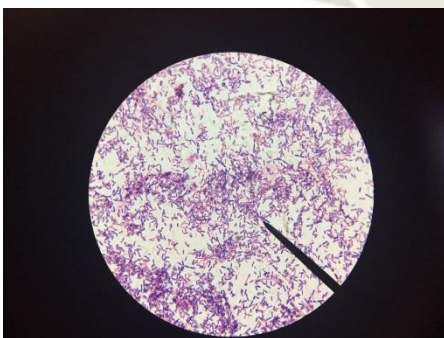


Figura 6: imagen microscópica de la bacteria de *Clostridium perfringens* obtenida de los medios de cultivo agar sangre y agar yema de huevo



FIGURA 7: Inoculación del anacultivo

MEDICION DE MUESTRA



Figura 8: disco de inmunodifusion radial con las muestras de suero de las crías de alpaca



Figura 9: reacción de las IgG en el disco de inmunodifusion radial a los 5 días (grupo control).



Figura 10: reacción de las IgG en el disco de inmunodifusion radial a los 10 días (grupo control).