

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE AGRONOMIA Y ZOOTECNIA.

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

“DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL *Clostridium perfringens* Y PREVALENCIA DE LA ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS EN TRES COMUNIDADES DEL DISTRITO DE OCONGATE – QUISPICANCHI – CUSCO”.

Presentado por el Bachiller.

Juan Carlos Álvarez Ccarhuachin

Para optar al Título Profesional de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Asesores.

Ing. Zoot. Mgt. Jim Cárdenas Rodríguez

Ing. Zoot. Dr. Andrés Estrada Zúñiga

Financiado: Convenio ARES – UNSAAC

KAYRA – CUSCO -

2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, asesor del trabajo de investigación/tesis titulado:

“DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL *Clostridium perfringens* Y PREVALENCIA DE LA ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS EN TRES COMUNIDADES DEL DISTRITO DE OCONGATE – QUISPICANCHI – CUSCO”.

Presentado por: **Juan Carlos Alvarez Ccarhuachin** con Nro. de DNI: **42808113** para optar el título profesional/grado académico de Ingeniero Zootecnista. Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 03 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del *Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC* y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de **10 %**

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera hoja del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 22 de febrero de 2023



Firma

Mgt, Jim Cárdenas Rodríguez

Nro. de DNI 23924578

ORCID del Asesor N° 0000-0002-8775-9014

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio:
<https://unsaac.turnitin.com/viewer/submissions/oid:27259:208177115?locale=es>

NOMBRE DEL TRABAJO

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN D
EL Clostridium perfringens Y PREVALEN
CIA DE LA ENTEROTOXEMIA EN ALPA**

AUTOR

Juan Carlos Alvarez Carhuachin

RECUENTO DE PALABRAS

20457 Words

RECUENTO DE CARACTERES

106857 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

116 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.3MB

FECHA DE ENTREGA

Feb 22, 2023 6:49 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Feb 22, 2023 6:50 PM GMT-5**● 10% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 10% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 15 palabras)

DEDICATORIA

En primer lugar, agradezco a DIOS por darme la vida y la oportunidad de cumplir una de mis metas más grandes, gracias Mamita Asunta por guiar mis pasos.

A mis padres:

Sra., Leoncia Ccarhuachin Chacón con todo mi amor a quienes debo la vida, quien estuvo siempre dándome energía para seguir.

Sr, Roberto Alvarez Mejía con gratitud y cariño y un eterno reconocimiento; por su apoyo incondicional y consejos que me dieron alientos.

A mi Familia.

Mi esposa Elisbed Ccanto Quispe, por toda la paciencia y amor que tuvo en todo momento de mi formación y con mucho cariño y eterno amor a la luz de mis ojos y mi fuerza mis hijos Alisson, Sebastián y Daniela.

A mis hermanos por creer siempre en mi Lucero, Bill y Bridgit.

AGRADECIMIENTOS

Más que un agradecimiento, una eterno reconocimiento a cada uno de los docentes por brindar en las aulas sus amplios conocimientos y meritorias experiencias que ayudaron a cumplir mis objetivos.

Al Ing. John Romero Peña, quien fue más que un docente, un amigo por brindarme sus concejos e impulsar a continuar en esta hermosa Carrera Profesional la Zootecnia.

Al Ing. Jim Cárdenas Rodríguez, quien me asesoro y me brindó su apoyo incondicional no solo en el asesoramiento del presente trabajo, más aún en la formación profesional, sobre todo por el carácter de trabajo en campo y aptitud como profesional que original y brinda a los estudiantes.

Al Dr. Andrés Estrada Zúñiga por asesorarme y bridar sus amplios conocimientos.

Por su puesto agradecer al Convenio ARES-UNSAAC y todo el equipo profesional que lo conforma, en especial a M. Sc Luz Marina Ponce Aranibar Coordinadora de convenio – ARES – UNSAAC.

A todas aquellas personas, amigos que han participado directamente e indirectamente en el proceso de mi proyecto de trabajo de tesis a mis amigos Ocongateños Ciriaco Pacsi, Luis Qesuallpa, Marcial.

A mis amigos de la Facultad Valentino Loayza, Michael Sumiré, Wilfredo Chacacanta, Eddy Rojas, Elio Puma, Edgar Montoya por su amistad, apoyo y por compartir buenos y malos momentos durante mi formación profesional.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	III
1 INTRODUCCION	2
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
2 OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	7
2.1 OBJETIVOS	7
2.1.1 <i>Objetivo General</i>	7
2.1.2 <i>Objetivo Específico</i>	7
2.2 JUSTIFICACIÓN.	8
3 MARCO TEÓRICO	10
3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	10
3.2 BASES CONCEPTUALES.....	15
3.2.1 <i>Generalidades de la Enterotoxemia</i>	15
3.2.2 <i>Etiología y Transmisión</i>	17
3.2.3 <i>Identificación</i>	18
3.2.4 <i>Epidemiología</i> :.....	19
3.2.5 <i>Tipificación</i>	20
3.2.6 <i>Principales toxinas</i>	22
3.2.6.1 La toxina alfa (α)	22
3.2.6.2 La toxina beta (β).....	22
3.2.6.3 La toxina épsilon (ϵ).....	23
3.2.6.4 La toxina iota (ι)	23
3.2.6.5 La enterotoxina (CPE)	23
3.2.6.6 La toxina beta 2 (β 2).....	24

3.2.6.7	La toxina NetB (Necrotic enteritis toxin, B-like)	24
3.2.7	Signos Clínicos.....	24
3.2.8	Lesiones Anatomopatológicas:.....	26
3.2.9	Diagnóstico.....	28
3.2.10	Diagnóstico Diferencial.....	31
3.2.11	Tratamiento:	32
3.2.12	Control y prevención.....	33
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.1	ÁMBITO DE ESTUDIO.....	35
4.1.1	Ubicación política	36
4.1.2	Ubicación geográfica.....	36
4.1.3	Límites del distrito de Ocongate.....	37
4.1.4	Vías de acceso.....	37
4.1.5	Clima	38
4.1.6	Pisos Altitudinales	38
4.1.7	Sistemas de crianza.....	39
4.1.8	Trabajo en laboratorio	39
4.2	MATERIALES DE ESTUDIO.....	40
4.2.1	Trabajo de Campo.....	40
4.2.2	Fecha de inicio del Experimento.....	40
4.2.3	Toma de Muestras.....	41
4.2.4	Tamaño de muestreo.....	41
4.2.4.1	Calculo de tamaño de muestras	42
4.2.5	Material Biológico.....	43
4.3	MATERIALES Y EQUIPOS	45

4.3.1	<i>Materiales para la extracción y transporte de material biológico..</i>	45
4.3.2	<i>Materiales para la extracción de ADN</i>	45
4.3.3	<i>Material para medir la concentración de ADN con Nanodrop</i>	
One	<i>.....</i>	46
4.3.4	<i>Material para medir la concentración de ADN con Qubit 3.0...</i>	47
4.3.5	<i>Material para evaluar la calidad de ADN mediante electroforesis</i>	
	<i>.....</i>	47
4.3.6	<i>Material para prueba de PCR en tiempo real de Clostridium</i>	
<i>perfringens</i>	<i>.....</i>	47
4.3.7	<i>Equipo para prueba de PCR tiempo real de Clostridium</i>	
<i>perfringens</i>	<i>.....</i>	48
4.4	METODOLOGIA DE ESTUDIO	49
4.4.1	<i>FLUJO GRAMA DE LA METODOLOGÍA DE ESTUDIO</i>	49
4.4.2	<i>Toma de muestras de sangre.....</i>	50
4.4.3	<i>Extracción de ADN.</i>	51
4.4.4	<i>Flujo grama para la Extracción de ADN de Sangre de Alpaca</i>	53
4.4.5	<i>Medición de la concentración</i>	54
4.4.5.1	<i>Protocolo de medición de la concentración de ADN con</i>	
Nanodrop	<i>.....</i>	54
4.4.6	<i>Prueba en PCR tiempo real.....</i>	54
4.4.6.1	<i>Distribución de Muestras en placa.....</i>	54
4.4.6.2	<i>Protocolo de detección de Clostridium perfringens.....</i>	55
4.5	FLUJOGRAMA DE TRABAJO DE RECONSTITUCIÓN DEL KIT	
	PARA DETECCION DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.....	56
4.5.1	<i>Primer C.perfringens_cpa.....</i>	56

4.5.2	<i>Primer Control interno de extracción</i>	57
4.5.3	<i>Control positivo de C.perfringens_cpa</i>	57
4.5.4	ANÁLISIS DE DATOS	63
4.5.5	PREVALENCIA	64
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
5.1	RESULTADOS	65
5.1.1	<i>Determinar la prevalencia de la Bacteria Clostridium perfringens en 3 Comunidad Campesina del Distrito de Ocongate por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (QPCR)</i>	65
5.1.2	<i>Cuantificar las Alpha toxin producing Clostridium perfringens (formally C. perfringens_ spp) (cpa gene) a partir ADN extraído de sangre alpaca.</i>	65
5.1.2.1	Validación de Prueba.	66
	Identificación de casos de Alpha toxin producing Clostridium perfringens (formally C. perfringens_ spp) (cpa gene).	67
5.2	EVALUACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR	68
5.3	DISCUSIÓN.	74
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
6.1	CONCLUSIONES	77
6.2	RECOMENDACIONES	78
7	BIBLIOGRAFÍA	79
8	ANEXOS	87
8.1	REGISTRO FOTOGRÁFICO	88

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Principales Vías De Acceso A Las Comunidades De Estudio Desde La Capital Del Distrito De Ocongate.....	37
TABLA 2. Tamaño De Muestras Para Las 3 Comunidades De Intervención.	42
TABLA 3. Toma De Muestras De Material Biológico Distribuido En Días, Comunidad, Sector, Número De Muestras Y Total En Días.....	43
TABLA 4. Muestras De Material Biológico Según Procedencia, Categoría, Sexo Y Raza.	44
TABLA 5. Distribución De Muestras En Placas	55
TABLA 6. Componentes De Reconstitución De Pre Pcr.....	58
TABLA 7. Reconstitución Del Control Positivo.....	58
TABLA 8. Mezcla Para Muestras De ADN.....	59
TABLA 9. Preparación de la mezcla para la curva estándar.	60
TABLA 10. Diluciones Para La Curva Estándar.....	61
TABLA 11. Tiempo Y Temperatura Para La Programación En Equipo Quanstudio.	62
TABLA 12. Cuantificación De A Toxinas/Cpa Gen De Muestras Que Amplificaron Al Pcr.....	65
TABLA 13. Valorización de la cuantificación de α toxinas produciendo <i>clostridium perfringens</i> (formally <i>c. Perfringens_spp</i>) (cpa gene).....	66
TABLA 14. Número De Casos Sospechosos Según Procedencia.	67

TABLA 15.	Identificación De Casos Positivos Por Localidad.....	68
TABLA 16.	Registro de alpacas muestreadas como material biológico..	93
TABLA 17.	Medidas De Concentración De Adn Por Nano Drop One° ...	99

INDICE DE PANEL FOTOGRAFICO.

Fotografía 1	Carretera de ingreso a las comunidades de estudio	88
Fotografía 2	Reunión de coordinación.	88
Fotografía 3	Dormidero de alpacas en CC. de Huacatinco	89
Fotografía 4	Dormidero de alpacas en Cc der Huacatinco	89
Fotografía 5	Dormidero de alpacas en Cc de Palcca	90
Fotografía 6	Colecta de muestras biológicas (sangre).....	90
Fotografía 7	Colecta de muestras biológicas (sangre).....	91
Fotografía 8	Cabina molecular Nivel II BioBase.....	91
Fotografía 9	Medición de la concentración de ADN con Nanodrop.....	92
Fotografía 10	Procesamiento de muestras en Termociclador	92

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1	Ubicación Política del distrito de Ocongate.....	35
Grafica 2	Protocolo para la amplificación de las muestras de ADN	63
Grafica 3	Configuración de la placa con los controles positivos, negativos	63
Grafica 4	Curva estándar para Cuantificación de Clostridium perfringens	68
Grafica 5	Muestra la amplificación de la muestra N°15 siendo su Ct35.933	70
Grafica 6	Muestra la amplificación de la muestra N°17 siendo su Ct 6.284	71
Grafica 7.	Muestra de amplificación de la muestra N°27 cuyo Ct es 36.284	72
Grafica 8.	Muestra la amplificación de la muestra N°33 cuyo Ct es 38.378	73

RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulado “DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL *Clostridium Perfringens* Y PREVALENCIA DE LA ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS EN TRES COMUNIDADES CAMPESINAS DEL DISTRITO DE OCONGATE – QUISPICANCHI – CUSCO”, tuvo como objetivo determinar la prevalencia de *Clostridium perfringens* por el método de Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR). Se colectaron 150 muestras de sangre de alpacas de la Raza Huacaya de ambos sexos, de las cuales se extrajo el ADN Genómico (gDNA), posterior a ello se procedió a medir la concentración de ADN utilizado el equipo Nanodrop One obteniendo como concentración media 15.70 ng/ μ L de un total de las 150 muestras de sangre de alpaca, de las cuales se seleccionaron 62 muestras con concentraciones de ADN más altas según recomendación del protocolo del kit Alpha toxin producing *Clostridium perfringens* (genesig) para proceder con los análisis en PCR, de las 62 muestras 4 amplificaron a las toxinas del *Clostridium perfringens* obteniendo una prevalencia de 6.45 % que corresponde a las muestras N° 15, 17, 27 y 33 de las cuales al cuantificar la presencia de toxinas de *Clostridium perfringens* a partir DNA extraído de sangre de alpacas dio 35.933 ct, 36.284 ct, 36.84 ct y 38.378 ct respectivamente en la cual el Ct (Ciclo umbral) del control positivo es de 21.44 y el Ct del control negativo no dio señal durante el experimento, los resultados se informaron oportunamente a los criadores en una reunión realizada en el Centro Poblado de Tinke del distrito de Ocongate.

Palabras claves: Enterotoxemia, *Clostridium perfringens*, alpaca, PCR

1 INTRODUCCION

La conservación y crianza de alpacas, es una de las principales actividades ligadas a la economía cuya importancia e impacto es preponderante para el desarrollo de la población alto andina del Perú; a diferencia del ganado vacuno y equino, los camélidos sudamericanos están bien adaptados a las condiciones ecológicas de la Cordillera de los Andes, pesan mucho menos, resisten bajas temperaturas, escases de agua y posee otras adaptaciones al clima radical de los Andes.

A pesar de sus grandes ventajas en su sistema de crianza, también afronta serios problemas en cuestiones sanitarias, que produce no solo el bajo rendimiento productivo y reproductivo, sino una alta mortalidad, ocasionando pérdidas económicas considerables para el criador (Caman, 2018). Estudios arqueológicos realizados demostraron la alta mortalidad neonatal en el proceso de domesticación, esto da a entender, esta dificultad sigue vigente, limitando seriamente la apropiada crianza de la alpaca en ambientes climáticos extremos como los Andes peruanos (Wheeler, 1995).

Asimismo, las enfermedades infecciosas incurren negativamente en el desarrollo de la industria alpaquera, siendo la enterotoxemia, primero causa que genera alta mortalidad, especialmente en explotaciones alpaqueras del sur peruano (Ameghino y De Martini, 1991). Por otro lado, contribuye a la presencia de esta enfermedad, una inadecuada nutrición, el último tercio de preñes, la cual se despliega en una época del año (estiaje) con deficiente calidad y cantidad de pasto naturales, ocasionando crías de pesos bajos al nacimiento, frágiles, agregando a ello, la baja eficacia del calostro y leche que produce la madre

debido a una mala alimentación durante todo el periodo de la gestación (Muñoz, 2007).

En consecuencia, esta enfermedad es fruto de interacciones entre dos o más agentes microbianos capacitados para producir patologías intestinales que liberan una disbiosis a nivel intestinal, caracterizada por una excesiva proliferación clostridial (***Clostridium perfringens***, tipo A) asociada con producción de fosfolipasa C y, en un menor porcentaje, producción de exotoxinas secundarias como la β_2 (Rosadio *et al.*, 2010; Lucas et al., 2016; Rojas et al 2016).

El cuadro clínico corresponde a una toxemia, generalmente de curso fatal, causando una severa enteritis hemorrágica o necrótica (Ameghino y De Martini, 1991; Palacios, 2004).

La tipificación del *C. perfringens* ha dependido, tradicionalmente, de inoculaciones de sobrenadantes bacterianos en animales de laboratorio; no obstante, la disponibilidad de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple, permite detectar de manera simultánea y en una misma reacción, la presencia de genes codificantes de las principales toxinas necesarias para arribar a una genotipificación incluyendo una subtipificación (Songer y Meer, 1996; Yoo et al., 1997). Esta técnica es una herramienta de diagnóstico rápida y confiable para determinar genotipos y subtipos de *C. perfringens*, en contraposición con la seroneutralización evidenciada en letalidad de ratones, técnica invasiva e incapaz de detectar bajos niveles de toxinas o cepas que no producen toxinas in vitro (Petit et al., 1999; Baums et al., 2004).

Finalmente, los estudios realizados sobre la prevalencia de la enterotoxemia, son necesarios, para estar al tanto de la situación actual de esta enfermedad en una determinada población o zona de crianza, permitiendo valorar e inspeccionar su estado sanitario. En tal sentido, el objetivo del estudio determinará la prevalencia de la enterotoxemia en alpacas de la comunidad campesina de Ilullucha, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es información valiosa para la generación de líneas de base en programas sanitarios del distrito de Ocongate para y si poder implementar políticas sanitarias adecuadas acorde a la realidad de la población.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El distrito de Ocongate, está reconocido como el primer productor de camélidos sudamericanos de la provincia de Quispicanchi, con una población más de 53,155 alpacas (INEI, 2012), siendo los sectores con mayor población de alpacas los centros poblados de Lauramarca, Llullucha y centro poblado de Tinke, donde encontramos una serie de dificultades, específicamente en la morbilidad y mortalidad de crías, tuis y adultos.

En tal sentido, en los últimos años se ha acrecentado el número de alpacas muertas por una serie de elementos como es el deficiente manejo en la traslación de los pastos, dormideros, parideras, deficiencias en sanidad por parte de los pastores. Todos estos elementos ligados al cambio climático, provoca negativo la salud de las alpacas, provocando los brotes de enfermedades, a su vez una clara disminución en lo reproductivo y productivo, afectando negativamente en la economía de los productores, ocasionando merma la cual influye directamente en el rendimiento productivo en dicha explotación. Por lo que estudios sobre la prevalencia de enfermedades como la Enterotoxemia, son de utilidad para mejorar las estrategias sanitarias de los criadores de la zona.

Las regiones alto andinas afrontan diversas dificultades, la muerte de las alpacas debido a consecuencias diversas es una de las dificultades con mayor importancia, en estas regiones en las cuales la actividad alpaquera se realiza de manera extensiva.

Consecuencias antes mencionadas son causantes de pérdidas, que impactan no solo en la cantidad poblacional de alpacas sino también en el

mejoramiento genético, que a su vez producen un impacto negativo en la economía del productor, por tal motivo se plantea la siguiente interrogante.

1. ¿Se ha determinado y cuantificado el *Clostridium perfringens* y la prevalencia en las Comunidad Campesina del Distrito de Ocongate?

2 OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo General.

Determinar y Cuantificar el *Clostridium perfringens* y la prevalencia de la Enterotoxemia en alpacas en 3 Comunidades Campesina del Distrito de Ocongate.

2.1.2 Objetivo Específico.

- Determinar la prevalencia de la Bacteria *Clostridium perfringens* en 3 Comunidad Campesina del Distrito de Ocongate por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (QPCR).
- Cuantificar las Alpha toxin producing *Clostridium perfringens* (formally C. perfringens_ spp) (cpa gene) a partir ADN extraído de sangre alpaca.

2.2 JUSTIFICACIÓN.

Conocer las causas de las enfermedades de las alpacas, en especial la prevalencia de las enfermedades, es importante, ya que contar con la información necesaria permitirá tomar medidas preventivas y disminuir su incidencia; para no afectar la economía del productor. A su vez, servirá como registro de las causas de muerte de la alpaca y será utilizado como indicador de crianza con limitadas habilidades en las comunidades agrícolas existentes en nuestra región.

El trabajo de investigación se realiza debido a que existe la presencia de la Enterotoxemia en las comunidades de intervención, y hasta la fecha no se toma medidas para poder reducir los niveles de prevalencia de esta enfermedad esto también debido a que no se cuenta con información necesaria de los niveles de prevalencia e incidencia de enfermedades en las comunidades campesinas, los trabajos de investigación por lo general se realiza en empresas y centros de producción alcaqueros como ejemplo la Rural Alianza y Otros.

En este contexto y según algunos estudios, la mortalidad en alpacas tiene una variabilidad según la clase o etapa de crianza, para tuis llega de un 4 % a 7 % y en los adultos es relativamente menor que va en rangos de 2 % a 4 % (Bustinza, 2001). Además, la pérdida de crías dentro de los tres o cuatro primeros meses de vida puede llegar a superar el 50 % de mortalidad, combinada con una alta incidencia de muerte embrionaria temprana y a su vez una baja tasa de natalidad anual (alrededor del 50 %), todo ello conlleva una escasa disponibilidad de reemplazos lo que limita las posibilidades de selección, reemplazo y mejoramiento genético (Ramirez, 1991).

En los últimos años se han incrementado los estudios para la identificación y control de los parásitos ya sea internos o externos y agentes infecciosos en las alpacas; pese a ello a un es incierto la prevalencia de las enfermedades causantes de mortalidad o morbilidad. Al mismo tiempo y con mayor frecuencia se encuentra mortalidad por trastornos metabólicos y orgánicos, este dificultad se va tornando difícil de controlar debido a que los signos clínicos no son fácilmente detectables o no lo presentaron y muchas alpacas fallecen de manera súbita (Caman, 2018).

Por consiguiente, al tener conocimiento de los agentes etiológicos causantes de las enfermedades podemos tomar decisiones al respecto, pero aún se desconoce la incidencia y reiteración de su presencia, debido a ello es necesario la investigación y estudio la cual influirá en la producción de alpacas. Asimismo, alcanzar más investigaciones acerca de la incidencia del ***Clostridium perfringes***, causante de la mortalidad en crías, aportando a los pobladores de las comunidades de Llullucha, Palcca y Huacatinco información necesaria para que puedan tomar las medidas de control basándose a los resultados adquiridos en la o las investigaciones realizadas en la zona referidas a camélidos sudamericanos.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.

Según Meli, *et al* (2010) Desarrollo y aplicación de un ensayo qPCR TaqMan(®) en tiempo real para la detección y cuantificación de 'Candidatus Mycoplasma haemolae' en camélidos sudamericanos. Dos alpacas de una manada en el suroeste de Suiza murieron por razones desconocidas. A la necropsia mostro pérdida de peso crónica y mucosas pálidas. Se sospechó infección por micoplasmas hemotrópicos y posteriormente se confirmó por métodos moleculares. Con el fin de investigar la situación epidemiológica en este rebaño, se desarrolló un ensayo TaqMan(®) qPCR en tiempo real para la detección y cuantificación específica de la infección por hemoplasma en camélidos sudamericanos.

De acuerdo a Uzal Francisco A, (2022) Enfermedad del cordero amarillo (enterotoxemia ovina tipo A por *Clostridium perfringens*) La enfermedad del cordero amarillo es una enfermedad poco frecuente en ovejas para la que existe poca referencia, y que ha sido reportada en EE. UU., Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Europa, aunque la evidencia principal indica que también puede haber sido diagnosticada en América del Sur. La enfermedad es provocada por algunas cepas de *Clostridium perfringens* tipo A que producen niveles inusualmente altos de toxina alfa. Porque *C. perfringens* del tipo A está presente y se encuentra en el intestino de la mayoría de las ovejas clínicamente sanas, el diagnóstico de la enfermedad del cordero amarillo es un desafío y requiere cuantificar la cantidad de este microorganismo presente en las heces y/o el contenido intestinal.

De acuerdo a Cristina, Marinl, R, & Patrik., (2011) Primera detección de "Candidatus Mycoplasma haemolae" en camélidos sudamericanos de Suiza y

evaluación de prevalencia. Los *Micoplasmas hemotróficos* (hemoplasmas), pequeñas bacterias que pueden parasitar la superficie de los eritrocitos, se han descrito en varias especies. Recientemente, se han desarrollado métodos moleculares para el diagnóstico de la infección por hemoplasma. El presente estudio describe por primera vez la detección y prevalencia de "Candidatus *Mycoplasma haemolamae*" en **camélidos** sudamericanos en Suiza. Una muestra aleatoria de esta última población se analizó **mediante PCR en tiempo real** para detectar infecciones por hemoplasma. Detectándose la infección en 18,6 % de los animales y se encontró tanto en camélidos originarios como importados. De los rebaños analizados, el 39,1 % albergaba al menos un animal positivo para hemoplasmas en PCR. No hubo diferencia en la prevalencia entre animales machos, hembras y/o especies llamas y alpacas, respectivamente. Es más, la prevalencia de infección no fue significativamente diferente en animales enfermos en comparación con camélidos sanos. De esta última observación y del hecho de que la alta prevalencia estuvo acompañada de una incidencia indetectable, concluimos que la patogenicidad de "Candidatus *Mycoplasma haemolamae*" puede ser baja

En la provincia de Puno según Chirinos, (2017). Cuantifico el *clostridium perfringens* y su relación con la presencia de *Eimeria spp*, trabajo realizado en crías de alpacas que demostraban ser aparentemente sanas considerando como intervalo la primera a novena semana referida a la edad y en crías ya fallecidas que demostraban síndrome enterotoxémico todas del mismo periodo. Para la toma de muestras del contenido intestinal de duodeno, yeyuno e íleon lo realizaron a través de laparotomía medial umbilical púbica y enterotomía. Para cuantificar el *Clostridium perfringens* la realizaron utilizando el medio de cultivo

Triptosa Sulfito Cicloserina (TSC), para determinar la presencia de *Eimeria* spp, se realizó por medio de una biopsia de intestino de 4 mm. Reportando niveles de 1.9 log UFC/ml, yeyuno 5.8 log UFC/ml e íleon log 8.4 UFC/ml, cantidad desde la primera a novena semana de edad. Posteriormente, alcanzaron niveles elevados en un intervalo de 21 a 31 días de edad correspondientes, llegando a 4.2 log UFC/ml en duodeno, 6.2 log UFC/ml en yeyuno y 6.8 log UFC/ml en íleon ($p=0.0014$). Concluyendo que la colonización de la bacteria *Clostridium perfringens* ocurrió a muy temprana edad mostrándose desde la primera semana de edad, variando durante las próximas nueve semanas de edad, hallándose mayor cantidad de *Clostridium perfringens* en íleon, yeyuno y por último en duodeno esto en crías que demostraban ser aparentemente sanas.

La investigación realizada por R. Miserez, (1998) Detección de *Clostridium perfringens* Tipo D α y ϵ -toxigénico en ovinos y caprinos mediante una técnica de amplificación de ADN (PCR) *Clostridium perfringens* aislado de ovejas y cabras con enterotoxemia en la necropsia y de animales sanos en el matadero se tipificaron mediante ensayos de PCR específicos para la detección de los genes de las toxinas α , β y ϵ . *Clostridium perfringens* aislado de los 52 animales con signos patológicos de enterotoxemia mostró la presencia de los genes de las toxinas α y ϵ , pero carecía del gen de la toxina β . Por lo tanto, estas cepas podrían identificarse como tipo D, características de la enterotoxemia clostridial de ovejas, corderos y cabras. En cambio, *Clostridium perfringens* aislado 11 de 13 animales sanos solo contenía el gen de la toxina α que es típico del tipo A. Dos de los animales sanos contenían *Clostridium perfringens* con los genes de las toxinas α y ϵ .

De acuerdo a Perez, *et al* (2012). Reportaron resultados de análisis moleculares de un total de 47 cepas de *C. perfringens* aislados de casos mortales provocados por enterotoxemia en las alpacas, estos 47 casos se basaron en la amplificación de los genes *cpa*, *cpb*, *etx* y *iap* codificantes de las toxinas α , β , γ , ϵ (genotipificación), así como la detección de genes secundarios codificantes de la enterotoxina (*cpe*) y toxina β_2 (subtipificación). El ADN bacteriano correspondiente a las 47 cepas fueron evaluadas a través de prueba de PCR múltiple demostrando que 46/47 (97.9%) de los aislamientos refieren al genotipo A y de estos, 13/46 (28.3%) contenían adicionalmente el gen β_2 (subtipo *cpe* –vo *cpb2* +vo), para el caso de las 33 muestras faltantes (71.7%) dieron negativo para ambos genes secundarios (subtipo *cpe* –vo *cpb2* –vo). Solo una de las muestras de las 47 muestras (2.1%) refirió al genotipo C y probablemente al gen CPE (subtipo *cpe* +vo *cpb2* –vo). En base a los resultados es probable la participación de la toxina alfa y beta2 en los casos relacionados a enterotoxemia en alpacas, pero excluyen a la enterotoxina.

En los estudios realizados por Maximiliano, *et al.* 2018. Determinaron los niveles de Inmunoglobulina G (IgG) sérica en alpacas neonatas, tomando intervalos de edad de 5 a 23 días, todas muertas a consecuencia de la enterotoxemia y en animales de la misma edad que se mostraban clínicamente sanos. En una primera evaluación establecieron una curva estándar de degradación fisiológica de la IgG sérica a partir de sueros sanguíneos de seis neonatos aparentemente sanos, a partir del día 2 y hasta los 21 días de edad. En una segunda fase determinaron las concentraciones de IgG sérica en 17 alpacas neonatas muertas con lesiones afines con la enterotoxemia y en 26 animales, de las mismas edades, clínicamente sanos. Las concentraciones de IgG, fueron

determinadas por la prueba de Inmunodifusión Radial, demostrando que todas las crías a las 48 horas del nacimiento presentaron concentraciones adecuadas de IgG, mientras que solo tres de los animales muertos por enterotoxemia tenían niveles de IgG por debajo de la curva estándar de degradación, solo una de las muestras presento niveles por debajo de 900 mg/dl a los 14 días, lo que podría ser considerado como falla parcial de transferencia pasiva. Las concentraciones de IgG sérica de los 26 animales clínicamente normales (2893 mg/dl) y aquellas obtenidas de animales muertos por enterotoxemia (2361 mg/dl) fueron estadísticamente similares. Concluyendo de acuerdo al análisis de riesgo mediante la prueba de Odds Ratio (OR: 5.35; IC= 0.50-57.22) que no existe asociación entre niveles adecuados de IgG y la mortalidad a consecuencia de enterotoxemia en alpacas neonatas.

La investigación de Lizana, 2016. Evaluó a las crías de alpacas en procesos diarreicos evaluando la asociación de *E.macusaniensis* y *C.perfringens* de la mencionada investigación dio como resultado que (45/190) un 23.7 % de las muestras, evidenciando una asociación moderada (36 %) con un $p < 0,05$ con prevalencias de; 0% (0/15), 40% (6/15); 0% (0/48), 6,25 % (3/48); y 81 ,88 %, (104/127), 35.4 3 % (45/127) de *E. macusaniensis* y *C. perfringens*, según grupo etario; perinatal, neonatal y crías respectivamente. La carga parasitaria de *E. macusaniensis* y presencia de *C. perfringens* presentó una relación moderada (0.57) con un $p < 0,05$ de igual manera presentó una relación moderada (0,53) entre carga parasitaria de *E. spp.* y presencia de *C. perfringens* con un $p < 0,05$ con medias de OPGH 4 338, 2 287, 890, y 0 en las categorías de alto, moderado, bajo y nulo correspondientemente en animales con procesos diarreicos, que son más que sugerentes para proponer que las infecciones por eimeriosis estimulan

la proliferación de *C. perfringens* en los intestinos desencadenando cuadros fatales.

3.2 BASES CONCEPTUALES.

3.2.1 Generalidades de la Enterotoxemia.

Entre las enfermedades infecciosas con mayor importancia se encuentra a la enterotoxemia la cual afecta a las alpacas, ocasionando elevadas tasas de mortalidad neonatal, en los centros alpaqueras del Perú reportan hasta un 70% (Ramírez et al., 1985); provocando una disminución en la población de camélidos y repercutiendo en los programas orientados al mejoramiento genético de las alpacas. El agente causante de esta enfermedad es el *Clostridium perfringens*, siendo el tipo A él más involucrado (Moro, 1987; Ramírez, 1987); aunque también han sido reportados los tipos B (Prehn et al, 1999), tipo C (Moro, 1971) y tipo D (Fowler, 1998).

Se trata de una bacteria denominada *C. perfringens* que es un bacilo anaerobio facultativo, móvil, Gram positivo, que es capaz de formar esporas y causante de una extensa diversidad de patologías tanto en humanos como en animales, se encuentra abundantemente distribuido en la flora intestinal microbiana de animales y humanos, también en el suelo. La virulencia de esta bacteria está dada por la existencia de exotoxinas, las cuales además determinan el genotipo de la cepa. Así, el tipo A posee solo la toxina α ; el tipo B las toxinas α , β y ϵ , el tipo C las toxinas α y β y el tipo D las toxinas α y ϵ , y el tipo E las toxinas α (Songer, 1996; Petit et al., 1999).

Además de las exotoxinas hay otros componentes de virulencia presentes en *C. perfringens*, los cuales se han asociado a inconvenientes entéricos, uno de ellos es la enterotoxina (CPE), la cual es producida principalmente por el tipo A, esta es sintetizada únicamente a lo largo de la etapa de esporulación, la cual causa pérdida de fluidos y electrolitos en la mucosa intestinal (Smedley et al., 2004).

Otro componente de virulencia es la toxina β_2 , una de las últimas identificadas y estudiadas, tiene una actividad biológica semejante a la toxina β , empero no muestra homología en la sucesión de aminoácidos de la toxina (Gibert, 1997; Smedley et al., 2004), además se demostró la asociación del gen *cpb2* con casos de enteritis necrótica en cerdos (Waters et al., 2003) y tiflocolítis en caballos (Herholz et al., 1999).

3.2.2 Etiología y Transmisión.

El *C. perfringens* es una bacteria que pertenece al phylum Firmicutes, Clase Clostridia, Orden Clostridiales, Familia Clostridiaceae, Genero Clostridium, Especie *C. perfringens* (Garrity et al., 2001). Ha sido aislado por primera ocasión en 1892 por Welch y Nutball desde muestras de cadáver humano en descomposición, llamándose antes *Clostridium welchi*, esta bacteria está extensamente distribuida como parte de la flora usual del suelo y tracto intestinal de animales de sangre caliente (en particular el tipo A); mientras tanto que otros (tipos B, C, D y E) son menos habituales en el tracto intestinal y tienen la posibilidad de ser raramente encontrados en el ambiente, en superficies donde este microorganismo hace patologías enzoóticas (Joclik y Willett, 1991; Songer, 1996).

Microscópicamente *C. perfringens* se presenta como un bacilo Gram positivo solitario o en pares, recto, grueso, rara vez en cadena, tomando forma cocoide o cúbica en cultivos jóvenes o elongados en cultivos viejos, no se mueve y presenta una cápsula de peptidoglicano que logra ser visible en frotices directos de fluidos corporales y tejidos (Brooks et al., 1998). *C. perfringens* es un organismo anaerobio tolerante, forma esporas (Barach et al., 1974), fermenta glucosa, lactosa, maltosa, sucrosa y otras variedades de azúcares (Hatheway, 1990) y es un típico productor de gases como CO₂ e hidrógeno, lo que le confiere al ambiente donde crece un ambiente anaeróbico (Madigan et al., 2001).

El *C. perfringens* es un bacilo gram positivo, anaerobio, formador de esporas no móvil, está disperso en el ambiente (suelo y agua) y comúnmente se encuentra en el tracto intestinal de los animales donde, bajo ciertas circunstancias, es patogénico. El *C. perfringens* no invade células sanas; pero produce diversas

toxinas y enzimas que son responsables de síntomas y lesiones asociadas. Las toxinas producidas dependen del tipo de cepa involucrada en el brote; y usualmente cada una de ellas produce síndromes diferentes, por lo tanto, la correcta identificación de la cepa del *C. perfringens* responsable del brote es crítico para la realización de estudios epidemiológicos y para el desarrollo de efectivas medidas preventivas, incluyendo la vacunación (Petit, 1999).

3.2.3 Identificación

El *C. perfringens* desarrolla bajo condiciones de anaerobiosis, teniendo un buen desarrollo a 45°C, su incremento en caldo de carne es veloz, con producción de ácido gas, teniendo el cultivo un olor hediondo y demostrando la carne sin digestión y enrojecida (Cruickshank, 1965). Las colonias de *C. perfringens* que desarrollan en medio agar sangré comúnmente presentan una peculiaridad región de doble hemólisis cerca de la colonia: una región interna clara (hemólisis completa o tipo P) gracias a la toxina β ; y una región externa nublosa (hemólisis inconclusa o tipo A) gracias a la toxina α . En medio agar yema de huevo, las colonias son rodeadas por una ancha región opaca circular, reconocida como la actitud de lecitinas (reacción de Nagler) gracias a la toxina α . En los medios enriquecidos con leche, casi cada una de las cepas de *C. perfringens* generan una “Fermentación Tormentosa”, gracias a la fermentación de la lactosa, producción de gas, y coagulación; sin embargo, no a la digestión de caseína. (Hatheway, 1990; Jocklik y Willett, 1991).

3.2.4 Epidemiología:

La presentación de brotes epidémicos de la enfermedad al parecer es compleja, pero son producto de las condiciones de manejo y la capacidad inmunológica de la cría, la cual está determinado por la presencia de los anticuerpos específicos transmitidos por la madre o de la propia respuesta inmune del neonato al agente causal (Ramirez y Ellis, 1988; Ortz, 1988).

Registros obtenidos por 10 años consecutivos (1973 - 1982) en una unidad productiva del Perú, mostraron un comportamiento cíclico de la enfermedad enterotoxémica; lo cual podría atribuirse a la pérdida del estado inmune materno que se traduce en fallas de la transferencia humoral a la cría (Ramirez et al, 1985).

La enterotoxemia de las alpacas se muestra a modo de brotes epizooticos a lo largo del periodo de parición, y está relacionada a componentes climáticos y deficiencias en el funcionamiento y limpieza del hato (Ramirez, 1991; Ameghino y De Martini, 1991).

La enfermedad de enterotoxemia perjudica primordialmente a las crías de las alpacas en un intervalo de 3 a 80 días de edad, siendo la edad más sensible entre las 2 a 3 semanas de edad, de igual manera, se ha visto que las crías en buena condición del cuerpo son más propensos a desarrollar la patología. Esto posiblemente debido a su ingesta prematura de forraje contaminado de la pradera en su entorno (Ramírez et al., 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991).

En los primeros meses del año entre el mes de enero al mes de marzo, tiempo de intensa presencia de lluvias y adicionado la época de nacimiento de los animales, predisponen la manifestación de epizootias de enterotoxemia,

ocasionado por la alta humedad presente en el suelo, lo que propicia la presencia, multiplicación y modificación biológica de esporas a células vegetativas de *C. perfringens*. Asimismo, el exagerado cambio de temperaturas máximas (14° C) y mínima (3° C) durante el día que tiene que soportan las crías de alpacas en el altiplano generan un gran estrés en ellos denominado estrés calórico (Ramírez *et al.*, 1985).

Las características bioquímicas complementarias son: licuefacción de gelatina, motilidad negativa, producción de H₂S, reducción de nitrato, reducción de sulfito, indol negativo, ureasa negativo, lipasa negativa, catalasa y oxidasa negativo, y fermentación de una gran cantidad de azúcares (Nicolet, 1986; Joclik y Willett, 1991).

3.2.5 Tipificación

La clasificación de las cepas del *C. perfringens* se divide en 5 tipos (A, B, C, D y E) basándose a la producción de sus cuatro toxinas letales (Cp-PLC, β , ϵ y ι), todas las cuales son secretadas durante la etapa de crecimiento exponencial, así las cepas tipo A producen Cp-PLC; las tipo B producen las toxinas Cp-PLC, β y ϵ ; las cepas tipo C producen las toxinas Cp-PLC y β ; las cepas tipo D producen las toxinas Cp-PLC y ϵ ; y las cepas tipo E producen las toxinas Cp-PLC y β (Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996; Petit *et al.* 1999).

La técnica de tipificación clásica se basa en las pruebas de neutralización toxina antitoxina *in vivo*, utilizando sobrenadantes de cultivos líquidos de *C. perfringens*, tratadas y no tratadas con tripsina. La tripsina es capaz de activar a las toxinas ϵ y ι e inactivar a la toxina β , estos sobrenadantes son enfrentados con y sin antisuero de cada tipo, y después son inoculados vía intradérmica en cobayos

o vía intraperitoneal en ratones para evidenciar la seroneutralización toxina-antitoxina, la respuesta es vista después de 24 a 48 horas en cobayos (dermonecrosis) y a las 72 horas en ratones (Cruickshan, 1965; Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996).

Una buena identificación de los tipos de *C. perfringens* es crítica para el progreso de estudios epidemiológicos y el establecimiento de eficaces medidas de prevención, incluyendo la vacunación, por ello, las técnicas moleculares como PCR e hibridación de ADN han venido siendo desarrolladas para tipificar cepas de *C. perfringens* por ser mucho más confiables y rápidas en comparación con las clásicas pruebas de neutralización in vivo en ratones y cobayos (Petit et al., 1999; Baums et al., 2004).

Entre ellos, protocolos de PCR Múltiple han sido elaborados para genotipificar (en base a la presencia de los genes plc, cpb, etx y iap y su tipificar (con base en la presencia de los genes cpe y cpb2) cepas de *C. perfringens* (Waters et al., 2003; Baums et al., 2004; Gholamiandekhordi et al., 2006).

No obstante, otras técnicas moleculares como el ADN microarray, la ribotipificación (Schalch et al., 2003), la electroforesis de gel en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electroforesis; PFGE) y el análisis de repeticiones en tandem en número variable de múltiples locus (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Análisis; MLVA) también han sido empleadas para estos fines. (Al-Khaldi et al., 2004a; Al-Khaldi et al., 2004b) (Nauerby et al., 2003) (Sawires y Songer, 2005)

3.2.6 Principales toxinas

3.2.6.1 La toxina alfa (α)

La toxina alfa es un zinc metalofosfolipasa que hidroliza fosfatidil colina y esfingomielina, los cuales se hallan presentes en la membrana externa de la célula eucariota, lo cual es la responsable de su actividad citotóxica, necrótica y hemorrágica (Titball et al., 1999). El gen que lo codifica es de ubicación cromosomal y está presente en todos los tipos de *C. perfringens* (A - E) (Rood, 1998).

La toxina está formada por dos dominios: (dominio N) un dominio amino-terminal compuesto de hélices y otro (dominio C) dominio carboxi-terminal compuesto de hojas plegadas. Estos dominios están unidos por una región común flexible (Duchesnes y Mainil, 2005).

El dominio N contiene el sitio activo de la fosfolipasa C principal para todas las actividades; mientras que el dominio C podría tener un rol clave en la interacción con la membrana fosfolipídica (Titball et al., 1999).

3.2.6.2 La toxina beta (β)

La toxina beta es una exotoxina y está presente solo en los tipos A y C del *C. perfringens* e incita inflamación y necrosis celular (Songer, 1996). El gen de esta toxina es plasmidial, la toxina es secretada al final del crecimiento logarítmico, se conoce aún poco sobre su mecanismo de acción, pero debido a su homología con la toxina y leucocidina de *Staphylococcus aureus*, se alude que podría actuar como una purina, trastornando la permeabilidad de la membrana y como consecuencia la muerte celular (Duchesnes y Mainil, 2005).

3.2.6.3 La toxina épsilon (ϵ)

La toxina épsilon es una exotoxina producida por los tipos B y D del *C. perfringens*, posee acción letal, necrotizante y edematizante, el gen codificante de esta toxina es plasmidial, y la toxina producida necesita ser activada por proteasas intestinales para convertirse en una toxina activa (Smedley et al., 2004).

3.2.6.4 La toxina iota (*i*)

La toxina iota es una exotoxina producida por el tipo E de *C. perfringens*, posee actividad dermonecrótica, causa alteración de la permeabilidad y es letal en ratones. Esta toxina es producida por dos genes ubicados en un plásmido y es secretada durante la fase exponencial de crecimiento como proteínas inactivadas, los cuales a la acción de proteasas se vuelven activos (Duchesnes y Mainil, 2005).

3.2.6.5 La enterotoxina (CPE)

La enterotoxina del *C. perfringens* (*C. perfringens* enterotoxin; CPE) es una endotoxina sintetizada solo durante la fase de esporulación, la cual induce una significativa secreción de agua e iones en enterocitos, provocando descamación y acortamiento de las microvellosidades intestinales (Rood, 1998, Smedley et al., 2004). La CPE no posee actividad necrotizante y es producida por menos del 5% de la población de *C. perfringens*, principalmente por cepas tipo A (Rood, 1998; Smedley et al., 2004) aunque también por cepas tipo C y D (Rood, 1998).

El gen que lo codifica (gen *cpe*) puede ser encontrado en una región variable del cromosoma (cepas aisladas de casos de intoxicación de origen alimentario) o en un largo plásmido (cepas aisladas de casos de gastroenteritis humana no

asociadas a intoxicación de origen alimentario y de casos entéricos en animales) (Songer, 1996; Rood, 1998; Smedley et al., 2004).

3.2.6.6 La toxina beta 2 (β 2)

El gen de la toxina beta 2 se encuentra en un plásmido que puede estar presente en todos los tipos de *C. perfringens*, esta toxina se encuentra asociado a una serie de enfermedades entéricas en animales (Waters et al., 2003; Engstrom et al., 2003; Dray, 2004; Smedley et al., 2004). La toxina se secreta durante la etapa logarítmica tardía, y su expresión no se demostró en todas las cepas positivas al gen *cpb2*. Esta toxina no guarda homología con la toxina, es letal en ratones, algunas líneas celulares y provoca necrosis hemorrágica en mucosa intestinal (Campos et al., 2004).

3.2.6.7 La toxina NetB (Necrotic enteritis toxin, B-like)

La toxina NetB se trata de las últimas toxinas descritas en *C. perfringens* y se mostró gran interés por la investigación de esta toxina debido a que demostró actividad en la patogenia de la enteritis necrótica producida en pollos. Se indica su localización plasmídica, guarda una cierta relación con la toxina (38% de identidad), y sería una toxina capaz de formar poros. Se ha detectado también cepas portadoras del gen *netb* en aves y pollos aparentemente sanas (Keyburn et al., 2008).

3.2.7 Signos Clínicos.

Las crías de alpaca y llama son las principales víctimas de la enterotoxemia por lo general se inicia a los 3 días ampliándose hasta los 80 días de edad, siendo la segunda semana a la tercera semana de edad las más susceptibles. Se ha

observado que las crías tanto de alpacas y llamas que presentan buena condición corporal son aparentemente las más susceptibles a desarrollar la enfermedad (Moro, 1971; Ramírez et al., 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000). La enfermedad no distingue sexo afecta tanto a crías hembras también a machos; Así mismo, curiosamente esta enfermedad tiene una prioridad por la raza Suri, es así que las crías de la raza Suri blancas han mostrado verse más afectadas que las crías de la raza Huacaya y de colores (Ramírez et al., 1985; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000).

Debido a que la época de parición mayormente son durante los meses de enero a marzo, época que coincide con la presencia de precipitación pluvial, estos factores asociados median ambientales y de manejo (lluvias abundantes, hacinamiento y animales susceptibles) estaría predisponiendo a la presentación de epizootias de enterotoxemia, a causa de la extrema humedad presente en el suelo contribuyendo a la presencia, multiplicación y modificación biológica de las esporas y células vegetativas del *C. perfringens*. Así como también la extrema variación entre temperatura máxima (14 °C) y mínima (3 °C), que deben soportar las crías a pocos días de nacidas (Ramírez et al., 1985).

Generalmente, la ocurrencia de muerte súbita, debido a la toxemia aguda, en crías de buen estado corporal es la única manifestación evidente, las crías amanecen muertas en los corrales o rediles sin haber mostrado evidencias de la enfermedad. En casos en que se hacen presenté las manifestaciones clínicas, éstas transcurren rápidamente antes de sucederse la muerte del animal (Novoa y Florez, 1991). Las crías enfermas se encuentran alejadas de sus madres, mostrando gran depresión y anorexia; sin embargo, algunas ingieren grandes cantidades de agua y desarrollan un apetito depravado, ingiriendo incluso papeles,

tierra, piedrecitas, etc. Se las observa postradas con la cabeza hacia delante, las orejas dirigidas hacia atrás y los ojos cerrados denotando sufrimiento (Ameghino y De Martini, 1991).

Conforme progresa la enfermedad, se observará a las crías con los miembros anteriores estirados, la cabeza apoyada sobre el suelo y el abdomen distendido (Ameghino y De Martini, 1991); y que a la percusión produce un sonido característico (Novoa y Florez, 1991) debido a la acumulación de gases producto de la fermentación de carbohidratos. En estos casos se observa constipación, el animal emite quejidos debido al dolor abdominal; y su respiración es dificultosa (disnea) (Ameghino y De Martini, 1991).

En esta enfermedad no se observa diarrea, por lo general lo que se observa es constipación, en caso haya diarrea, lo más probable es que debamos asociarlo a infecciones mixtas con E. coli u otro microorganismo enteropatogeno. Algunas crías que presentan diarreas por enterotoxemia, no mueren probablemente a que eliminan la toxina a través de las deyecciones, el color de las heces varía de acuerdo a la sustancia ingerida (Ameghino y De Martini, 1991). Finalmente, en casos en que la enfermedad se encuentra más avanzada, se caracterizan por presentar alteraciones nerviosas, tales como opistotonos y convulsiones, posteriormente el animal entra en coma y muere (Ameghino y De Martini, 1991).

3.2.8 Lesiones Anatomopatológicas:

Los animales (alpacas y llamas) que llegan a morir, generalmente, tienen buenas condiciones corporales, exteriormente se puede observar el abdomen distendido y con las paredes tensas por la presencia de gas en los intestinos. El timo y el pericardio se observan congestionados, y a veces presentan petequias, la

red vascular de la capa subcutánea se encuentra congestionada, y en algunas ocasiones con presencia de petequias al separar la piel, principalmente en la zona inguinal (Novoa y Florez, 1991).

Al incidir en la cavidad abdominal, las asas intestinales tienden a escapar debido a la fuerte presión que ejerce el gas, el olor que se percibe es desagradable y característico (Ameghino y De Martini, 1991). Los intestinos delgado y grueso suelen estar congestionados, y a veces hemorrágicos, con contenido acuoso, este puede variar de color de acuerdo al tipo de ingesta que prevalece en el cadáver en relación con su edad (verdoso, blanquecino, plumizo amarillento, etc). Es frecuente observar a lo largo de los intestinos un aumento en el tamaño de las placas de peyer, siendo más notorias en el intestino grueso (región del ciego) donde se aprecian saltantes placas circulares u ovaladas de color gris, que se notarán a simple vista (Huanca, 1991, Novoa y Florez, 1991)

Los linfonodos mesentéricos aparecen aumentados de tamaño, congestionados o hemorrágicos, el hígado presenta un color más oscuro; se ve congestionado y a veces amarillento, signo de degeneración grasa. El bazo puede estar aparentemente normal; pero a veces se encuentra aumentado de tamaño y reblandecido, observándose al corte, la presencia de barro esplénico (Ameghino y De Martini, 1991).

En los riñones además de congestión, se observa desprendimiento del parénquima y separación de la cápsula renal (Novoa y Florez, 1991). La vejiga por lo general se presenta distendida, ello debido a la acumulación de orina, por efecto de la parálisis. En la cavidad torácica, a lo largo de la tráquea y bronquios se observan las mucosas congestionadas, con presencia de un contenido espumoso

y estrías de sangre (Prehn, Sáez y Arriagada, 1999), que algunas veces se encuentran acompañados de ingesta.

Los pulmones aparecen congestionados, y al corte fluye sangre combinada con exudado espumoso. Los linfonodos en esta región se encuentran hemorrágicos y ligeramente aumentados de tamaño, en el corazón, las arterias coronarias se hallan dilatadas y las aurículas presentan petequias (Novoa y Florez, 1991). El pericardio se halla con abundante líquido seroso, estrías de fibrina y petequias en el miocardio (Prehn, Sáez y Arriagada, 1999).

En la cavidad abdominal como también en la torácica y a su vez el saco pericárdico se presenta un exudado seroso, ligeramente viscoso y claro; la cantidad es variada de un animal a otro. Esto se relaciona al daño endotelial de los vasos sanguíneos producido por las toxinas, todas estas alteraciones indican que se trata de un verdadero cuadro toxémico (Ameghino y De Martini, 1991).

3.2.9 Diagnóstico

El aislamiento bacteriano no tiene mucha validez, debido a que el *C. perfringens* forma parte de la flora normal intestinal (Songer, 1996), aunque un recuento alto de clostridios por g de heces o contenido intestinal puede ser sugestivo de enterotoxemia. Otras pruebas realizadas como frotices directos utilizando como muestra contenido intestinal o detección de anticuerpos antitoxina α no son concluyentes, sugiriéndose la detección de toxinas en fluidos corporales, pese a que las lesiones ocasionadas por la enterotoxemia, son en su mayoría casi definitivo para el diagnóstico de esta enfermedad en el campo.

Sin embargo, lo usual y más práctico consiste primeramente en identificar la magnitud del problema, basarse en las características epidemiológicas de la mortalidad neonatal en el rebaño y considerar las características del brote, así como los signos clínicos y lesiones observadas en las necropsias (Ramirez, 1990).

La historia del rebaño (edad, estado nutricional de las madres y crías, antecedentes de muerte súbita de crías en buenas condiciones cárnicas) se complementará a los hallazgos post-mortem, para establecer la causa de muerte en las crías (Ameghino y De Martini, 1991).

Si se desea profundizar más y realizar diagnóstico de laboratorio, la mejor muestra a enviar son segmentos de intestino afectado amarrado por sus extremos (8 - 10 cm) incluyendo su contenido intestinal. Como medio de transporte se puede utilizar borax en polvo o glicerina tamponada. Por otro lado, se puede remitir también ganglios mesentéricos, hígado, bazo, riñones, etc. (Novoa y Florez, 1991; Ameghino y De Martini, 1991).

En el laboratorio se deberán realizar cultivos bacteriológicos en condiciones anaeróbicas tanto en medios sólidos (agar sangre) como en medios líquidos (caldo carne). El aislamiento del *Clostridium perfringens*, generalmente es abundante y puro (Novoa y Florez, 1991). Paralelamente, es preciso realizar la técnica de tinción Gram con la que se logra observar bastoncillos rectos, gram positivos, con caras paralelas y extremos redondeados.

La ausencia de esporulación es característica del *Clostridium perfringens* cuando se realiza la tinción Gram (raramente esporulan); sin embargo, se pueden reconocer las esporas (en posición terminal) y los bacilos esporulados del contenido

intestinal mediante técnicas de coloración específica para esporas (Ameghino y De Martini, 1991).

El diagnóstico definitivo se logra mediante la detección biológica o inmunológica de la enterotoxina presente en el contenido intestinal u otro fluido corporal de crías muertas por enterotoxemia (suero sanguíneo, exudado peritoneal o pericárdico) (Novoa y Florez, 1991). El método de diagnóstico y tipificación clásica está basado en la seroneutralización que consiste en probar la letalidad de las cepas en ratones; y comprobar posteriormente la seroprotección con anticuerpos neutralizantes enfrentados con el sobrenadante de cultivos crudos del *Clostridium perfringens* (Petit, 1999).

Otras pruebas biológicas utilizadas incluyen la respuesta eritemal en piel de conejo o cobayo (moderada sensibilidad), intestino ligado en conejo (moderada sensibilidad); y la citopatogenicidad en monocapas de células VERO (alta sensibilidad) (Ramirez, 1990). La detección serológica de la enterotoxina, será a partir de los líquidos de la cavidad torácica o abdominal, o suero sanguíneo de crías muertas. Las técnicas inmuno enzimáticas empleadas más comúnmente son las de ELISA y la de "INMUDOT PEROXIDASA" (Ramirez, 1987; Ramirez y Ellis, 1988), las cuales pueden detectar nanogramos de toxina, ya que su sensibilidad ha sido incrementada mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra la toxina (Ameghino y De Martini, 1991).

Existen además otras pruebas de laboratorio menos específicas; pero de utilidad diagnóstica (Novoa y Florez, 1991); así tenemos a la hemaglutinación pasiva, inmufluorescencia, inmunodifusión y a la inmunolectroforesis. El

fundamento de todas las pruebas inmunológicas es la reacción específica entre la enterotoxina y la anti-enterotoxina (Ramirez, 1990).

3.2.10 Diagnóstico Diferencial

Para el diagnóstico diferencial se deberán considerar los procesos entéricos causados por enteropatógenos que frecuentemente cursan con diarreas. Entre estos deberán tomarse en cuenta a *E. Coli* enteropatógena, Rotavirus, Coronavirus y los protozoarios *Coccidia* y *Criptosporidium* (Ramirez, 1990).

La colibacilosis presentará generalmente una morbilidad de 15%; y se observará a las crías con procesos diarreicos por 3 - 8 días, con una consiguiente disminución de peso corporal. Cuando se produce la muerte, a la necropsia, la alteración más notoria es la enteritis principalmente a nivel del yeyuno, con acumulación de líquido en ocasiones sanguinolento. El diagnóstico definitivo lo constituye el aislamiento de la *E. Coli* y la demostración de sus toxinas (Ramirez, 1990).

Es importante tener en cuenta la posible presentación de infecciones mixtas de *C. perfringens* y *E. Coli* enteropatógena, que se caracteriza por la presencia de heces diarreicas; lo cual no ocurre en casos de enterotoxemia pura. La coccidiosis debido a *Eximíría* sp se diferencia de la enterotoxemia por ser una parasitosis observada frecuentemente en animales jóvenes; pero mayores de un mes de edad. Su diagnóstico definitivo se realiza por la demostración macroscópica de la presencia de estadios endógenos (esporozoitos, esquizontes y merozoitos) en el raspado de segmentos congestionados de íleon.

Las infecciones virales por rotavirus y coronavirus comprometidos en procesos entéricos de las alpacas no han sido ADN precisados. Sin embargo, podrían estar presente con la subsiguiente predisposición a una infección bacteriana secundaria. Recientemente, se ha dado a conocer la detección de anticuerpos contra rotavirus en alpacas adultas, lo que permite asumir su exposición a este virus en algún momento de su vida.

Últimamente, se ha reconocido como causa de procesos diarreicos en corderos de un mes de vida al *Criptosporidium* sp, los cuales no han sido diagnosticados en alpacas, solo se ha comunicado su presencia en animales sanos. Así mismo, infecciones causadas por otras bacterias enteropatógenas (Ejm.: *Salmonella*, *Yersinia*, etc.) tampoco han sido reconocidos en camélidos (Ramirez, 1990).

3.2.11 Tratamiento:

No existe ningún tratamiento satisfactorio y de uso práctico que actúe contra las toxinas en el tracto intestinal, quedando éste supeditado al uso de productos paliativos (cuando las circunstancias lo permiten) y a la aplicación de medidas de control en la higiene y el manejo (Ameghino y De Martini, 1991). Como tratamiento paliativo se considera la administración de algún laxante como sulfato de magnesio al 10% disuelto en agua tibia (80 - 100ml); para favorecer la expulsión de toxinas. Con el mismo objetivo se puede aplicar también supositorios de glicerina o aceite mineral.

En casos que presentan diarreas causadas por infecciones mixtas con *E. coli*, es necesaria la administración de ampicilina, estreptomina y sulfamidas para evitar que se sigan diseminando los agentes infecciosos (Ameghino y De Martini,

1991). Por otro lado, la administración de cloranfenicol o penicilina, podría prevenir la proliferación de clostridios y por ende la producción de toxinas (Ramirez, 1987).

3.2.12 Control y prevención

Establecida la enfermedad en el rebaño es necesaria la rotación de los dormideros, y si es posible, cambiar también de las canchas o parideros a lugares más alejados (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991). Aunque, todos estos procedimientos han mostrado no traer significativa reducción de la mortalidad una vez establecida la epizootia (Melo et al., 1999).

El uso de vacunas a partir de cepas aisladas de campo asociado a medidas de higiene adecuadas, como la rotación continua de canchas, es la medida de prevención más adecuada (Moro, 1971; Moro, 1987). En investigaciones realizadas por Yaya y Rosadio (2005), usando un cultivo en base en cepas de *C. perfringens* aisladas de casos clínicos, aplicadas tanto a madres como también a crías, lograron una disminución significativa de casos de la mortalidad ocasionadas por enterotoxemia.

El uso de antiparasitarios para el control de la eimeriosis, podría también ser una buena medida de prevención, debido a que se sugiere la infección mixta de *C. perfringens* con *Eimeria* spp, para la producción de enterotoxemia (Rosadio et al., 2010).

Luego del parto, lo primordial es asegurar la ingestión de calostro por parte de la cría dentro de las primeras 12 horas de vida. Sería bueno evitar largas caminatas o excesiva manipulación de las crías que implique fatiga o situaciones de estrés, lo cual podrá predisponer al padecimiento de la enfermedad. Se debe

controlar y asegurar que las crías beban agua corriente, y no estancada, ya que esta puede ser fuente de contaminación (Ameghino y De Martini, 1991).

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Ámbito de Estudio.

Las muestras para el presente trabajo de investigación se obtuvieron de tres Comunidades Campesinas, LLullucha, Palcca y Huacatico del distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchi, departamento del Cusco, el cual se ubica entre los 3600-4600 m.s.n.m.

Grafica 1 Ubicación Política del distrito de Ocongate



Fuente: (Plan de Desarrollo Concertado Del Distrito de Ocongate 2012 - 2021).

4.1.1 Ubicación política

- Región : Cusco
- Departamento : Cusco
- Provincia : Quispicanchi
- Distrito : Ocongate
- Comunidad : Llullucha, Palcca y Huacatinco

Fuente: (INEI, 2017)

4.1.2 Ubicación geográfica.

El lugar del cual se colectara las muestras es el distrito de Ocongate que está ubicado en la parte Sur Este de la provincia de Quispicanchi y de la región Cusco; Ocongate forma parte de la cuenca del Río Mapacho así también la capital del distrito es sobre la margen derecha del mismo Río, tiene una configuración urbana lineal compacta y longitudinal a lo largo de la carretera Urcos - Puerto Maldonado:

- Latitud Sur: 13° 37' 24".
- Longitud W: 71° 23' 07".

La comunidad de Llullucha está ubicada geográficamente a:

- Latitud Sur: 13° 39' 46".
- Longitud W: 71° 26' 25".

4.1.3 Límites del distrito de Ocongate.

- Con el distrito de Ccarhuayo por el Norte
- Con el distrito de Pitumarca, provincia de Canchis. Por el Sur
- Con los distritos de Quiquijana y Cusipata. Por el Sur Oeste
- Con el distrito Marcapata por el Este.
- Con el distrito de Ccatcca por el Oeste

4.1.4 Vías de acceso

Como vía de acceso al distrito de Ocongate, es por medio terrestre, sabiendo que la construcción de la carretera Interoceánica Sur Perú – Brasil es la principal obra de infraestructura vial que cruza longitudinalmente por el distrito de Ocongate.

La vía de acceso principal a las comunidades campesinas es por trocha carrozable.

tabla 1. Principales vías de acceso a las comunidades de estudio desde la capital del distrito de Ocongate.

Provincia/distrito Capital	Capital/comunidad	km	Estado de la carretera
Urcos/Ocongate - 70 km	Ocongate - Palcca	20	Asfaltada y trocha
	Ocongate - Llullucha	12	Asfaltada y trocha
	Ocongate - Huacatinco	19	Asfaltada y trocha

PIP Expediente Técnico Alpacas MDO – 2011

4.1.5 Clima

Presenta un clima es variado, en temporada de invierno varía entre -12° hasta 2° y el resto del año una temperatura promedio de 12° , las precipitación pluvial de 700 mm en época de lluvia que por lo general durante 4 meses y seco los 8 meses restantes. En la zona denominada Meso Andina, presenta un clima de transición entre el clima templado zona quechua y el clima frío de zona puna. La temperatura media anual es de 19.4° C, la temperatura media mínima es de 6.8° C, siendo el mes de julio más frígido con 0.8° C. La precipitación anual es de 900 a 1100 mm distinguiéndose dos periodos bien diferenciadas; una de período de lluvias entre los meses de octubre al mes de abril, y otro de período seco entre los meses de mayo al mes de septiembre.

En la zona alto andina el clima es sub húmedo y frío, la temperatura media máxima varía entre $16,6^{\circ}$ C para el mes de noviembre y 15.2° C para el mes de agosto siendo el promedio anual de 15.7° C. Las temperaturas medias mínimas varían entre 1.5° C para el mes de julio y 12.4° C para el mes de febrero, siendo su promedio anual de 6.3° .

Fuente: (SENAMHI, 2022)

4.1.6 Pisos Altitudinales

El lugar de estudio se encuentra aproximadamente dentro de la región Suni y Puna según la clasificación de pisos altitudinales de Pulgar Vidal, 1987 (3.800 a 4.860 m.s.n.m).

Caracterizado por la presencia de vegetación rastrera y gramínea que alterna con zonas húmedas (bofedales), la zona alta forma altiplanos más o menos

homogéneos de aptitud ganadera, zona en donde pastan principalmente camélidos silvestres y domésticos.

Fuente: (Ecologiaverde, 2022)

4.1.7 Sistemas de crianza.

En las comunidades de Llullucha Palca y Huacatinco el sistema de crianza es tradicional, en la que las alpacas son pastoreadas por un miembro de la familia ya sea la madre de familia o el hijo, una punta promedio está compuesta entre 30 a 50 alpacas, el manejo sanitario es subvencionado por el gobierno local y las ONG como es el caso de CAIJO quienes apoyan con técnicos y promotores en campañas sanitarias.

4.1.8 Trabajo en laboratorio

Se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático sobre los sistemas de producción animal en la sierra sur del Perú ubicado en el Centro Agronómico de K'ayra de la Facultad de Ciencias Agrarias, la cual se encuentra ubicada en el distrito de San Jerónimo departamento de Cusco, con una temperatura promedio anual de 15° C, a una altitud de 3220 m.s.n.m.

4.2 MATERIALES DE ESTUDIO.

4.2.1 Trabajo de Campo.

Se procedió a la verificación del lugar de estudio guiado por los comuneros en las tres comunidades campesinas (Llullucha, Palcca y Huacatinco), realizando la vista a los dormideros de las alpacas y los lugares de pastoreo, de los cuales considerando el lugar de pastoreo se procedió a seleccionar con quienes se tenía que trabajar.

La sensibilización a los criadores se realizó en campo, con la finalidad que cada uno conozca y se informe a cerca del trabajo de investigación que se realizó.

El hecho de tratarse de extracción de sangre generó desconfianza y rechazo en los propietarios, motivo por el cual se optó la estrategia que por cada muestra de sangre obtenida se tuviera que colocar vitaminas por su puesto posterior a la extracción de sangres vía subcutánea, la vitamina que se utilizó es la B12 (Hematofos B12).

4.2.2 Fecha de inicio del Experimento.

En el proceso de trabajo de investigación se sud dividió en dos etapas, trabajo de campo y trabajo en laboratorio.

- trabajo en campo.
 - ✓ Se realizó reuniones de coordinación y sensibilización a los productores durante el mes de agosto del 2018.
 - ✓ Se identificó a los productores con quienes se trabajara durante el 15 al 30 de agosto del 2018.

- ✓ Se realizó la toma de muestras distribuido en fechas diferente previa coordinación con los propietarios.
 - Primer muestreo se realizó el 01 de setiembre del 2018.
 - Segundo muestreo se realizó el 10 de setiembre del 2018.
 - Tercer muestreo se realizó el 18 de setiembre del 2018.

4.2.3 Toma de Muestras.

Se realizó el muestreo por conveniencia debido a la disponibilidad de animal a estudiar, se consideró los siguientes criterios:

- Considerando el territorio de pastoreo, se identificó animales que por lo general son pastoreados en bojedales.
- Considerando crías destetadas, se identificó animales dientes de leche de la última parición entre hembras y machos.
- Considerando la raza, se seleccionó animales de la raza Huacaya por ser de mayor población.

4.2.4 Tamaño de muestreo.

Tomando como referencia en IV Censo Nacional Agropecuario 2012 en el CUADRO N° 110: POBLACIÓN DE ALPACAS, POR CATEGORÍAS, SEGÚN TAMAÑO DE LAS UNIDADES AGROPECUARIAS. En distrito de Ocongate provincia de Quispicanchi departamento de Cusco. De una población de total de 53155 alpacas de las cuales 6372 son crías entre machos y hembras las cuales se encuentran distribuidas a lo largo de las 33 comunidades del distrito de Ocongate, las comunidades de Llullucha, Palcca y Huacatinco poseen una población aproximada de 950 crías de alpacas.

4.2.4.1 Cálculo de tamaño de muestras

$$\text{Tamaño de Muestra} = Z^2 * (p) * (1-p) / c^2$$

Fuente: <https://www.questionpro.com>

Donde:

Z = Nivel de confianza (95% o 99%)

p = .5

c = Margen de error (.05 = ±5)

tabla 2. Tamaño de muestras para las 3 comunidades de intervención

Comunidades de Estudio	Población Total	Tamaño de muestra
<ul style="list-style-type: none">• Llullucha.• Palcca.• Huacatico	950	275

Consideración: Debido a que el kit Alpha toxin producing *Clostridium perfringens* es para 150 pruebas, es motivo por el cual se consideró como el total de muestras para recolectar. A su vez, por ser un kit de alto costo o valor económico se trabajó con 150 muestras valga la redundancia.

La colección de muestras se realizó en 3 días de acuerdo a la disponibilidad de tiempo de los productores y a la cercanía de los dormideros de las alpacas, el trabajo se realizó a partir de las 5 a.m. hora en la que ya nos encontrábamos en los corrales listos para proceder con la faena previamente programada con los propietarios de las alpacas, los días trabajo y lugares se detallan en la siguiente tabla.

tabla 3. Toma de muestras de material biológico distribuido en días, comunidad, sector, número de muestras y total en días.

DIAS	COMUNIDAD	SECTOR	N° DE MUESTRA	N° MUESTRAS DIA
1	Llullucha	Alianza	18	33
	Palcca	Palcca	15	
2	Llullucha	Patachahuana	11	42
	Llullucha	Patachahuana	9	
	Huacatinco	Huacatinco	22	
3	Llullucha	Pucaccasa	14	75
	Llullucha	Pucaccasa	16	
	Llullucha	Pucaccasa	10	
	Llullucha	Pucaccasa	9	
	Llullucha	Pucaccasa	26	
TOTAL			150	150

4.2.5 Material Biológico.

Clostridium perfringens es una bacteria anaeróbica, formadora de esporas, no motil, Gram positiva. Es ampliamente Distribuidos en el medio ambiente y los alimentos y forma parte de la flora intestinal normal tanto en el hombre y animales. *C. perfringens* persiste en el suelo, sedimentos y áreas sujetas a Contaminación fecal. (genesig, 2016)

Con esta premisa se procedió a la colección de muestra, se estableció en tres sectores, considerando los criterios antes mencionados en toma de muestras, los animales en estudio son criados de forma tradicional, basándose su

alimentación netamente en pastoreo y viviendo en la intemperie, cabe destacar que estos animales tienen algunos tratamientos sanitarios como es la desparasitación tanto internos como externos, no cuenta con un tratamiento de vacunación contra la Enterotoxemia.

En el presente trabajo de investigación, la recolección de muestras de sangre de alpacas se realizó durante los meses de agosto a octubre. Lográndose recolectar 150 muestras de animales aparentemente sanos de la categoría A, tanto hembras como machos de la raza Huacaya. Esto debido a que estos animales pudieron llegar a contraer la enfermedad de la enterotoxemia en la época de lluvias y aún pueden llegar a presentar canga bacteriana en la flora interina, convirtiéndose en los posibles portadores del *Clostridium perfringens* en la Comunidad Campesina de Llullucha.

tabla 4. Muestras de material biológico según procedencia, categoría, sexo y raza

ITEM	PROCEDENCIA	N° DE ALPACAS	Categoría en dentición (DL)	SEXO		RAZA HUACAYA
				Machos	Hembra	
1	Llullucha	113	A	30	83	113
2	Palcca	15	A	0	15	15
3	Huacatinco	22	A	3	19	22
TOTAL		150	150	33	117	150

4.3 Materiales y Equipos

4.3.1 Materiales para la extracción y transporte de material biológico.

1. Aguja Vacutainer
2. Tubos con EDTA
3. Algodón
4. Alcohol yodado
5. Guantes desechables
6. Hielo seco
7. Cajas térmicas de tecnopor
8. Adaptador de agujas Vacutainer
9. Barbijo
10. Plumón indeleble
11. Soga

4.3.2 Materiales para la extracción de ADN

1. Micropipeta de 10-20 μL
2. Micropipeta de 20-200 μL
3. Micropipeta de 100-1000 μL
4. Puntas con filtro de 0.5-10 μL
5. Puntas con filtro de 20 μL
6. Puntas con filtro de 200 μL
7. Puntas con filtro de 1000 μL

8. Tubos eppendorf 1.5 ml
9. Racks para tubos de 1.5 ml
10. Agua grado molecular
11. Etanol puro
12. Guantes de nitrilo
13. Barbijo
14. Gorros
15. Mandiles desechables
16. Kit de extracción Purelink- Genomic ADN minikit
17. Equipos para la extracción y conservación de ADN
18. Cabina de flujo laminar nivel molecular BioBase
19. Termobloque
20. Centrifuga convencional
21. Vortex
22. Refrigeradora de -86 °C

4.3.3 Material para medir la concentración de ADN con Nanodrop One

1. Micropipeta de 0.2-2 μ L
2. Punta con filtro de 2 μ L
3. Papel Kimwipe

4.3.4 Material para medir la concentración de ADN con Qubit 3.0

1. Tubos ópticos
2. Gradilla
3. Kit

4.3.5 Material para evaluar la calidad de ADN mediante electroforesis

1. Puntas de 20 μ L
2. Gel agarosa de 2%
3. Agua grado molecular
4. Reactivo peso molecular
5. Equipo de electroforesis

4.3.6 Material para prueba de PCR en tiempo real de *Clostridium perfringens*

1. Micropipeta de 10-20 μ L
2. Micropipeta de 20-200 μ L
3. Micropipeta 0.2-2 μ L
4. Puntas con filtro de 200 μ L
5. Puntas con filtro de 20 μ L
6. Puntas con filtro de 10 μ L
7. Placa de 96 pocillos.
8. Racks para tubos 2 ml
9. - Sellador de placa

10. Vortex para placa

11. Film sellador de placa

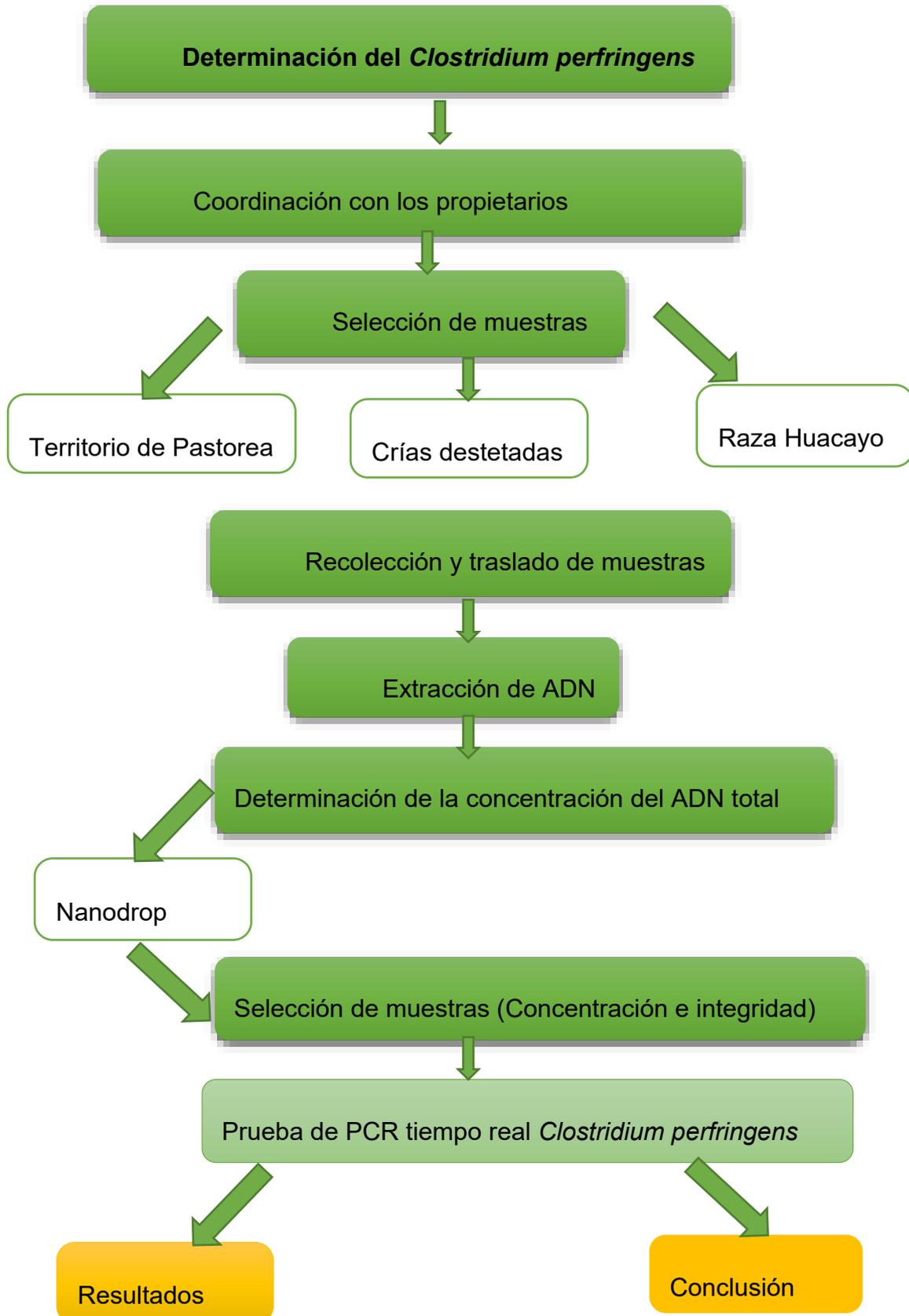
12. Kit Alpha toxin producing *Clostridium perfringens* (formally *C. perfringens_spp*) gene Genesig® Advanced

4.3.7 Equipo para prueba de PCR tiempo real de *Clostridium perfringens*

1. Cabina molecular Nivel II BioBase
2. Termociclador QuantStudio 3
3. Vortex
4. Vortex para placas de 96 pocillos

4.4 METODOLOGIA DE ESTUDIO

4.4.1 FLUJO GRAMA DE LA METODOLOGÍA DE ESTUDIO



4.4.2 Toma de muestras de sangre.

1. Se capturó de la alpaca, ya sea con lazo o sujeción.
2. Se sujetó al animal por un colaborador quien mantenga perfectamente inmovilizado y en una posición adecuada.
3. Se desinfectó el área de extracción en este caso el cuello.
4. Se ubicó la vena con el dedo pulgar e índice.
5. Se realizó la hemostasia con ambos dedos presionando suavemente.
6. Se deslizó la aguja por encima de la una del dedo pulgar, realizando la punción cuidadosamente aproximadamente unos 25° para así poder ingresar a la vena.
7. Se colectó la sangre en el tubo de ensayo previamente rotulado.
8. Se colocó la muestra en la caja térmica de tecnopor.
9. Se realizó un leve masaje al cuello del animal.
10. Se desinfectó el área tratada.
11. Se aplicó vía intra muscular vitamina B12.

4.4.3 Extracción de ADN.

El Mini Kit PureLink® Genomic DNA permite extracciones de ADN genómico (gDNA) de alto rendimiento y alta pureza de una amplia variedad de tipos de muestras.

A partir de sangre, tejidos, células, bacterias, hisopos y manchas de sangre.

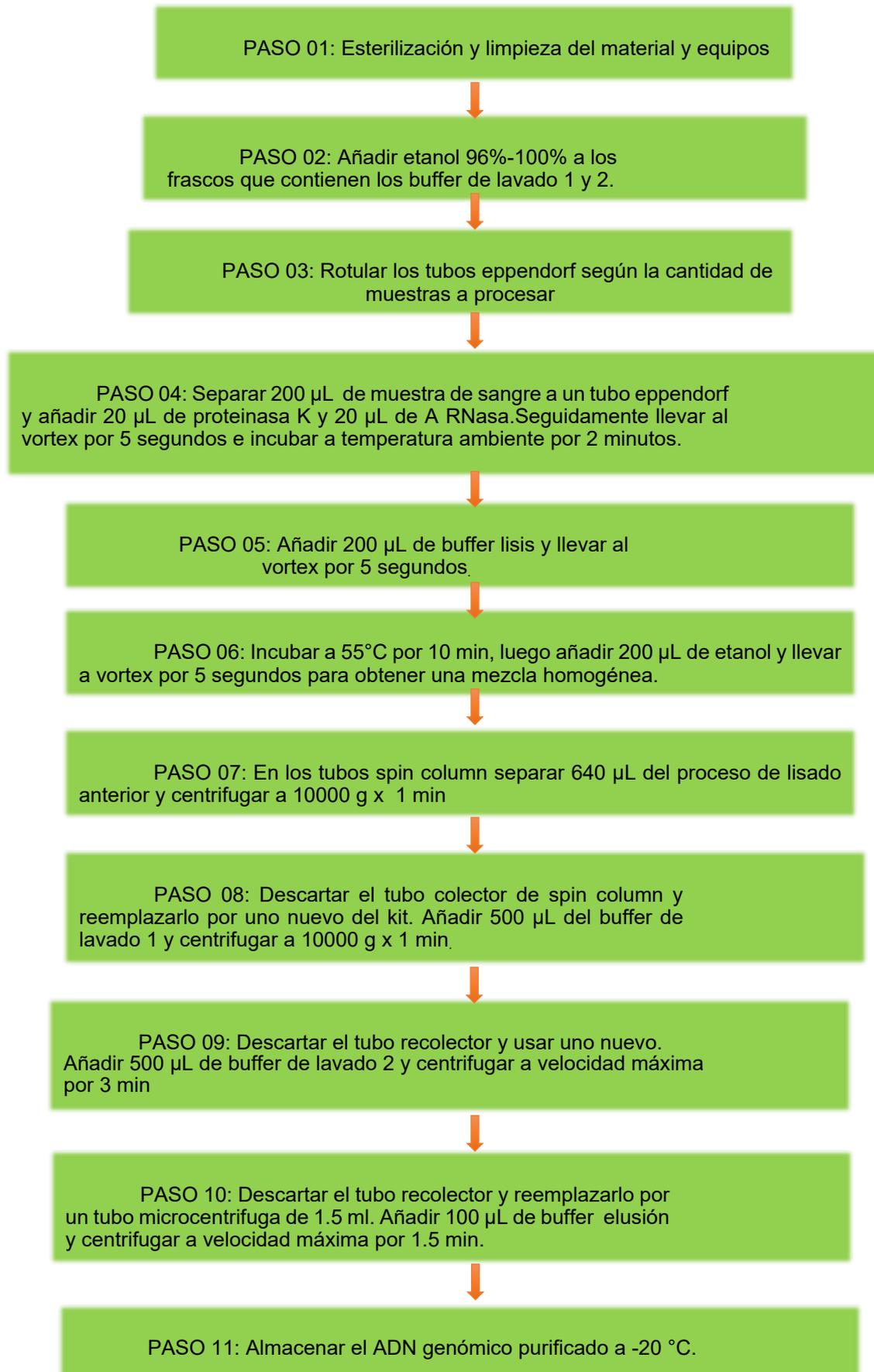
La extracción de ADN se realizó el mismo día de la colección de sangre en campo, aproximadamente 4 horas luego de la última colecta de sangre, inmediatamente a la llegada al laboratorio se procedió a la extracción del ADN según inserto del kit Purelink- Genomic ADN minikit que se describe a continuación:

1. Tomar muestra de sangre (200 µL) y colocar en tubos de 1.5 ml
2. Agregar 20 µL PROTEINAasa K
3. Llevar a vortex por 5 segundos
4. Agregar 20 µL RNAasa.
5. Llevar a vortex por 5 segundos
6. Incubar a temperatura ambiente por 02 minutos.
7. Agregar 200 µL de etanol absoluto.
8. Incubar a 55° C en el termobloque por 10 minutos
9. Agregar 200 µL de etanol absoluto
10. Llevar a vortex por 05 segundos

- 11.** Extraer de la muestra 640 μL y colocar con un micro tubo con filtro
- 12.** Centrifugar a 10 000 x g durante un minuto
- 13.** Descartar en tubo de abajo con el residuo y colocar uno nuevo.
- 14.** Agregar 500 μL de SOLUCIÓN LAVADO (wash buffer 01)
- 15.** Centrifugar a 10 000 x g durante un minuto
- 16.** Descartar el contenido de abajo.
- 17.** Agregar 500 μL de SOLUCION LAVADO (wash buffer 02)
- 18.** Centrifugar a 10 000 x g durante un minuto
- 19.** Retirar el filtro y colocar en tubo nuevo
- 20.** Agregar 100 μL de ELUSION BUFFER.
- 21.** Incubar a temperatura ambiente por 01 minuto
- 22.** Centrifugar a 10 000 x g durante un minuto
- 23.** Descartar el filtro y conservar el ADN extraído.

Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su primer análisis en
Nanodrop One

4.4.4 Flujo grama para la Extracción de ADN de Sangre de Alpaca



4.4.5 Medición de la concentración

La medición de la concentración de ADN se realizó utilizando el equipo Nanodrop One

4.4.5.1 *Protocolo de medición de la concentración de ADN con Nanodrop*

Se limpia el pedestal con agua grado molecular (solución blanca) y se seca con papel

1. Seleccionar el programa ADN para empezar a medir
2. Pipetee 1 μ L de la muestra de ADN en el pedestal inferior
3. Iniciar con la medición.

Al finalizar la medición de todas las muestras GUARDE el experimento, limpie el pedestal inferior con solución blanca y proceda con el secado.

4.4.6 Prueba en PCR tiempo real.

4.4.6.1 *Distribución de Muestras en placa.*

Para la distribución de muestras se consideró las de mayor, concentración tomando en cuenta los resultados obtenidos según el **Protocolo de medición de la concentración de ADN con Nanodrop**, las cuales se distribuyeron en dos placas por dos repeticiones, siendo un total de 62 muestras, para la curva estándar 6 puntos por 3 repeticiones siendo un total de 18 para el control negativo 1 por 2 repeticiones y control positivo 1 por 2 repeticiones estos últimos en ambas placas, según el siguiente cuadro.

tabla 5. Distribución de muestras en placas

ITEM	DESCRIPCION	PUNTOS	REPETICIONES	TOTAL PUNTOS
placa 1	St curve	6	3	18
	Muestras	37	2	74
	Blanco NTC	1	2	2
	Positivo CP	1	2	2
placa 2	Muestras	25	2	50
	Blanco NTC	1	2	2
	Positivo CP	1	2	2
TOTAL				150

4.4.6.2 Protocolo de detección de *Clostridium perfringens*

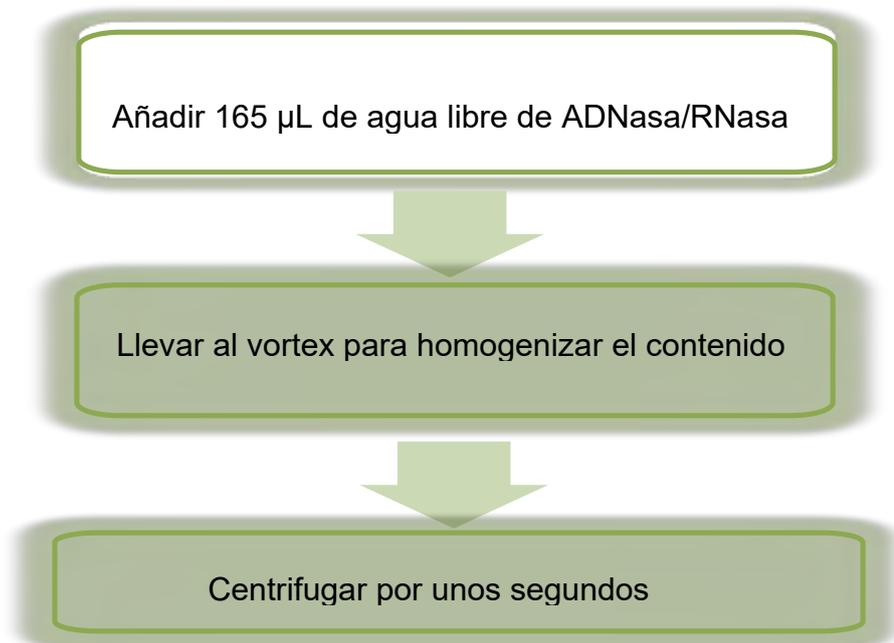
Se utilizó el kit Alpha toxin producing *Clostridium perfringens* (formally *C. perfringens_spp*) (cpa gene) gene Genesig® Advanced, el trabajo se realiza en cabinas moleculares y de seguridad biológica, el protocolo se describe a continuación:

1. Reconstitución de componentes (Pre PCR pack):

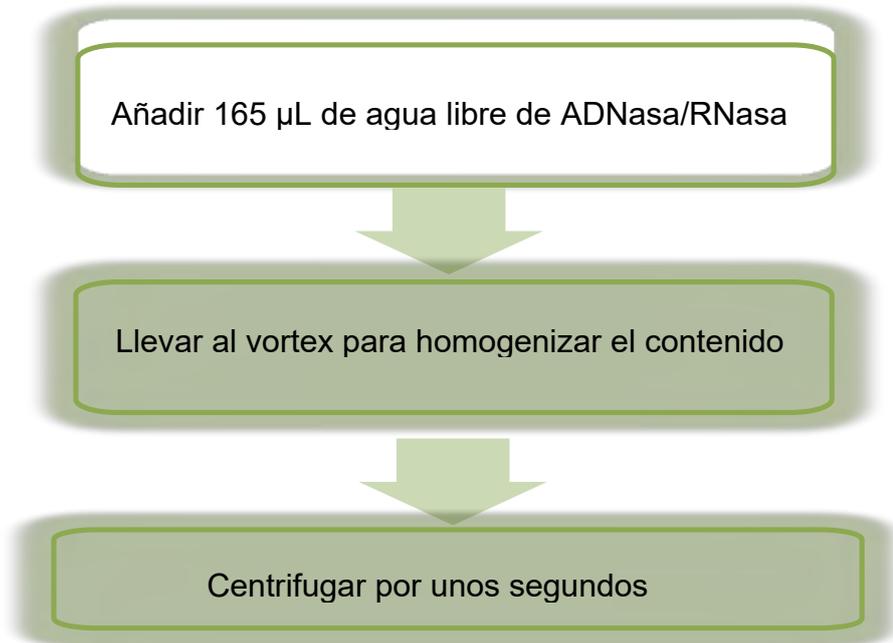
Reconstituir con agua libre de ADNasa/ARNasa que viene el kit, los componentes son:

4.5 FLUJOGRAMA DE TRABAJO DE RECONSTITUCIÓN DEL KIT PARA DETECCIÓN DE *Clostridium perfringens*.

4.5.1 Primer *C.perfringens_cpa*



4.5.2 Primer Control interno de extracción



4.5.3 Control positivo de *C.perfringens_cpa*

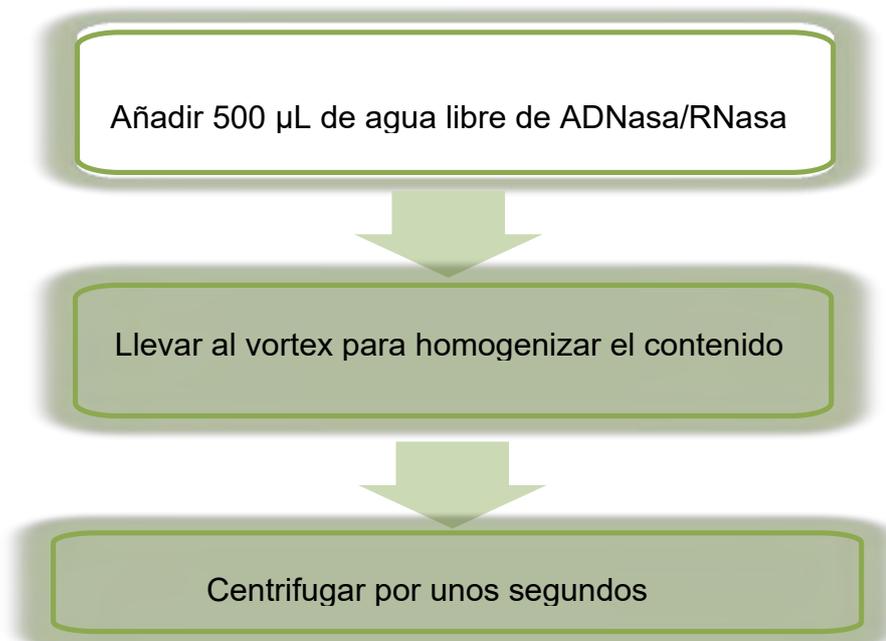


tabla 6. Componentes de reconstitución de Pre PCR

Pre PCR pack	Volumen
<i>C.perfringens_cpa</i> primer/probe mix	165 µL
Control interno de extracción primer/probe mix	165 µL

Fuente: kit Alpha toxin producing

2. Reconstitución de control positivo

tabla 7. Reconstitución del control positivo

Componente	Volumen
Control positivo de <i>C.perfringens_cpa</i>	500 µL

Fuente: kit Alpha toxin producing

*Este componente es peligroso contaminante por lo cual se recomienda realizarlo de forma separada de los otros componente.

3. Preparación de las muestras con ADN

Preparar la siguiente mezcla para cada muestra de ADN como se indica en la tabla N°07

tabla 8. Mezcla para muestras de ADN

COMPONENTES	Volumen
Oasiig 2x qPCR Maternix	10 μ L
C. Perfringes_cpa primer/probe mix	1 μ L
Control interno de extracción primer/ probe mix	1 μ L
Agua libre de ADNasa/ARNasa	3 μ L
Volumen Final	15 μ L

Fuente: kit Alpha toxin producing

4. Pipetear 15 μ L de la mezcla en cada pocillo de acuerdo a la configuración realizada para el experimento.
5. Pipetear 5 μ L de ADN en cada pocillo de acuerdo a la configuración del experimento.
6. Para el control negativo pipetear 5 μ L de agua libre de ARNasa / ADNasa. El volumen final de cada Pocillo es de 20 μ L.

tabla 9. Preparación de la mezcla para la curva estándar

COMPONENTE	VOLUMEN
Oasiig 2x qPCR Maternix	10 μ L
C. Perfringes_cpa primer/probe mix	1 μ L
Agua libre de ADNasa/ARNasa	4 μ L
Volumen final	15 μ L

Fuente: kit Alpha toxin producing

Preparación de la dilución para la curva estándar

7. Pipetear 90 μ L de la preparación buffer en tubos en numerados de 2 a 6.
8. Pipetear 10 μ L del control positivo en el tubo n° 02
9. Poner al vortex
10. Cambie de punta y pipetear 10 μ L del tubo n°02 al tubo n°03
11. Poner al vortex
12. Repetir los pasos 4 y 5 hasta completar las series.

tabla 10. Diluciones para la curva estándar.

Curva estándar	Número de copia
Tubo 01 Control positivo (Rojo)	2×10^5 por μL
Tubo 02	2×10^4 por μL
Tubo 03	2×10^3 por μL
Tubo 04	2×10^2 por μL
Tubo 05	20 por μL
Tubo 06	2 por μL

Fuente: *kit Alpha toxin producing*

13. Pipetear 15 μL de la mezcla en cada pocillo según la configuración del experimento.
14. Pipetear 5 μL de las diluciones de la curva estándar en cada pocillo según la configuración del experimento.

El volumen final será 20 μL en cada pocillo.

3.3.5.2. Protocolo de amplificación.

tabla 11. Tiempo y temperatura para la programación en equipo Quanstudio.

Ciclado x50	Pasos	Tiempo	temperatura
	Tratamiento UNG (si es requerido)	15 min	37 °C
	Activación enzimática	2 min	95 °C
	Denaturacion	10 secs	95° C
	Colección de datos *	60 secs	60° C

Fuente: kit Alpha toxin producing

* El dato fluorogenico debe ser colectado durante este paso a través de los canales FAM y VIC

Grafica 2 Protocolo para la amplificación de las muestras de ADN



Fuente: Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático

4.5.4 ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó empleando el software Quantstudio desing and analysis.

Grafica 3 Configuración de la placa con los controles positivos, negativos



Fuente: Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático

4.5.5 PREVALENCIA .

$$\frac{\text{Número de casos}}{\text{Población}} \times 100$$

$$\frac{4 \text{ casos}}{62 \text{ población}} \times 100 = 6.45 \%$$

5 Resultados Y Discusión

5.1 Resultados

5.1.1 Determinar la prevalencia de la Bacteria *Clostridium perfringens* en 3 Comunidad Campesina del Distrito de Ocongata por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (QPCR).

Para la determinación de la prevalencia, de acuerdo a los resultados obtenidos por PCR amplificaron 4 casos para las toxinas del *Clostridium perfringens_cpa* . Lo que representa el 6.45 % de las muestras analizadas.

5.1.2 Cuantificar las Alpha toxin producing *Clostridium perfringens* (formally *C. perfringens_ spp*) (cpa gene) a partir ADN extraído de sangre alpaca.

El Ct (Ciclo umbral) del control positivo es de 21.44 y el Ct del control negativo no dio señal durante el experimento.

tabla 12. Cuantificación de α toxinas/cpa gen de muestras que amplificaron al PCR.

Muestras	Cuantificación/cpa gen	Ciclo umbral
N°15:	0.144	35.933 ct
N°17:	0.482	36.284 ct
N°27:	0.482	36.84 ct
N°33:	0.897	38.378 ct

Fuente: Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático.

tabla 13. Valorización de la cuantificación de α toxinas producing *Clostridium perfringens* (formally *C. perfringens_spp*) (cpa gene)

MUESTRA	valorizacion
17	
27	
33	
15	

+ Normal, ++ moderado, +++ Alto

5.1.2.1 Validación de Prueba.

Según: Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory de University of Wisconsin – Madison para que el test sea válido los valores de CT debe ser:

- Los valores $< o = 36$ son positivos.
- Resultados de sospechoso, no concluyente o positivo débil con valores de Ct de 37-40

En la tabla 13 observamos la distribución de casos sospechosos de acuerdo a la zona de muestreo donde las comunidades de Lullucha y Palcca registraron 2 casos sospechosos para cada comunidad, siendo estas hembras en ambos.

tabla 14. Número de casos sospechosos según procedencia.

Item	Procedencia	N° de Alpacas	Casos mayor carga.	Sexo
1	Llullucha	40	2	hembras
2	Palcca	10	2	hembras
3	Huacatinco	12	0	0
TOTAL		62	4	hembras

Identificación de casos de Alpha toxin producing *Clostridium perfringens* (formally *C. perfringens_ spp*) (*cpa gene*)

Al Identificar y medir la carga bacteriana de la Bacteria ***Clostridium perfringens*** en las 3 Comunidad Campesina del Distrito de Ocongote

Los animales identificados con mayor carga se dieron en dos puntas las cuales son:

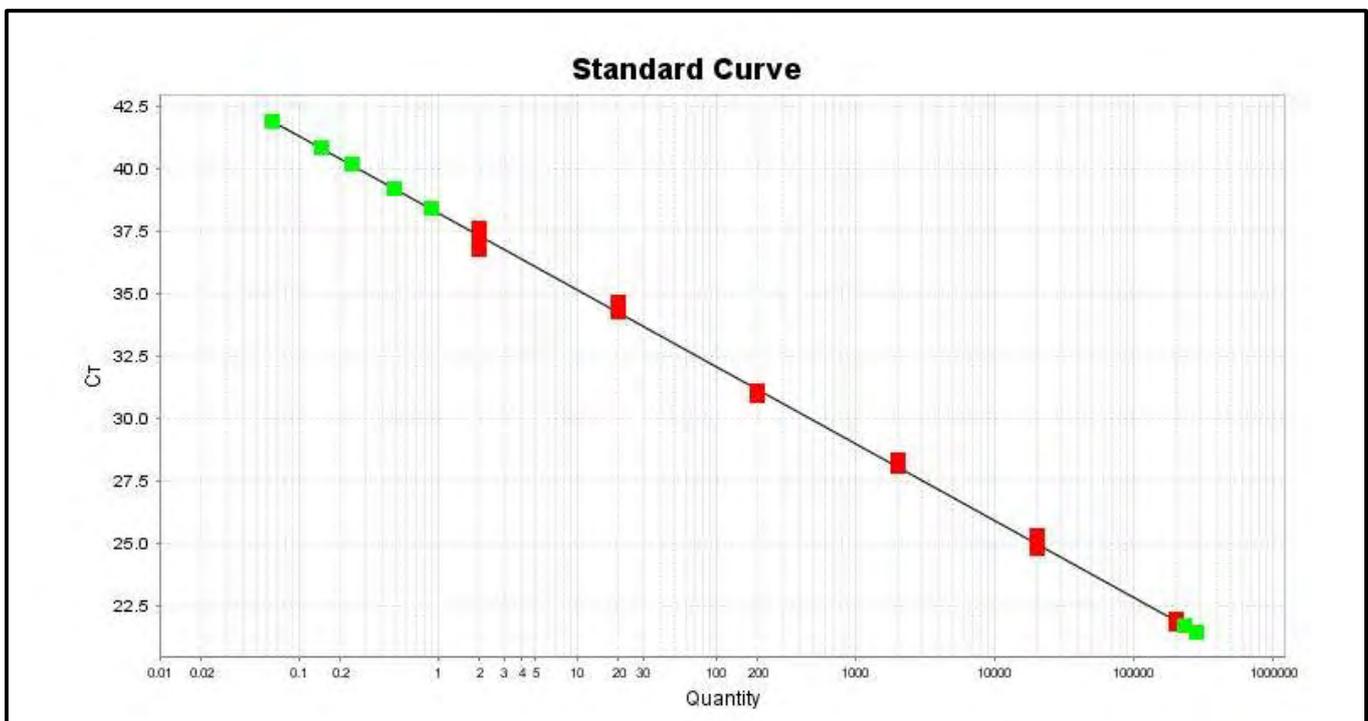
- De la comunidad de Llullucha sector Alianza de propiedad del Sr, Fortunato Huamán Yapura las muestras 15 y 17 siendo ambas hembras dientes de leche de la Raza Huacaya.
- De la comunidad Palcca sector Palcca de propiedad del Sr, Marcial Huisa Condori las muestras 27 y 33 siendo ambos hembras dientes de leche de la Raza Huacaya.

tabla 15. Identificación de casos positivos por localidad

Muestras	Sexo	Categoría	Raza	Comunidad	Sector
15	hembra	A	Huacaya	Llullucha	Alianza
17	hembra	A	Huacaya	Llullucha	Alianza
27	hembra	A	Huacaya	Palcca	Palcca
33	hembra	A	Huacaya	Palcca	Palcca

5.2 Evaluación de la Curva estándar

Grafica 4 Curva estándar para Cuantificación de *Clostridium perfringens*



Fuente: Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático.

La curva estándar para la cuantificación del *Clostridium perfringens* presentó las siguientes características:

Slope : -3.078

Y-inter: 38.233

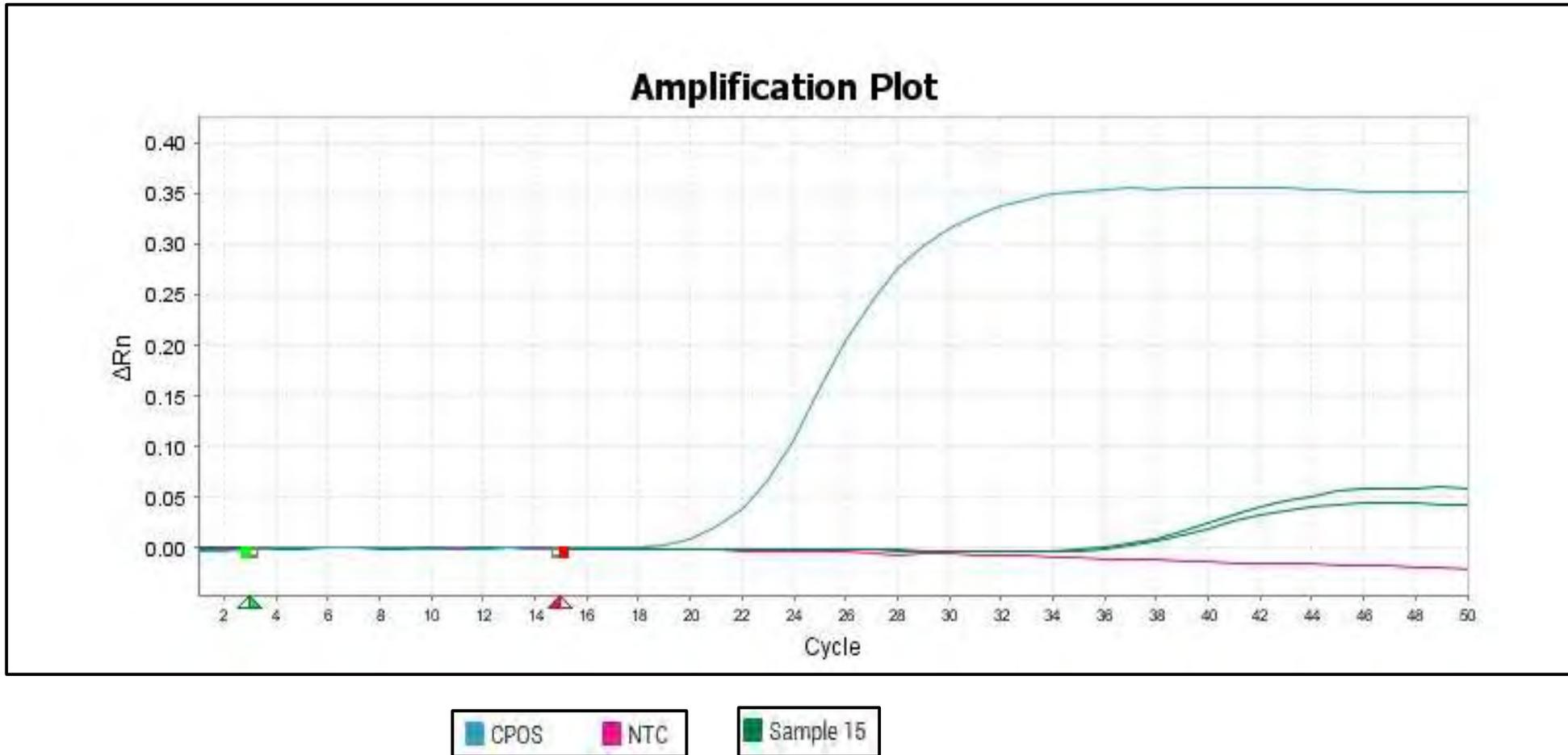
R²: 0.998

Eff%: 111.314

Error: 0.039

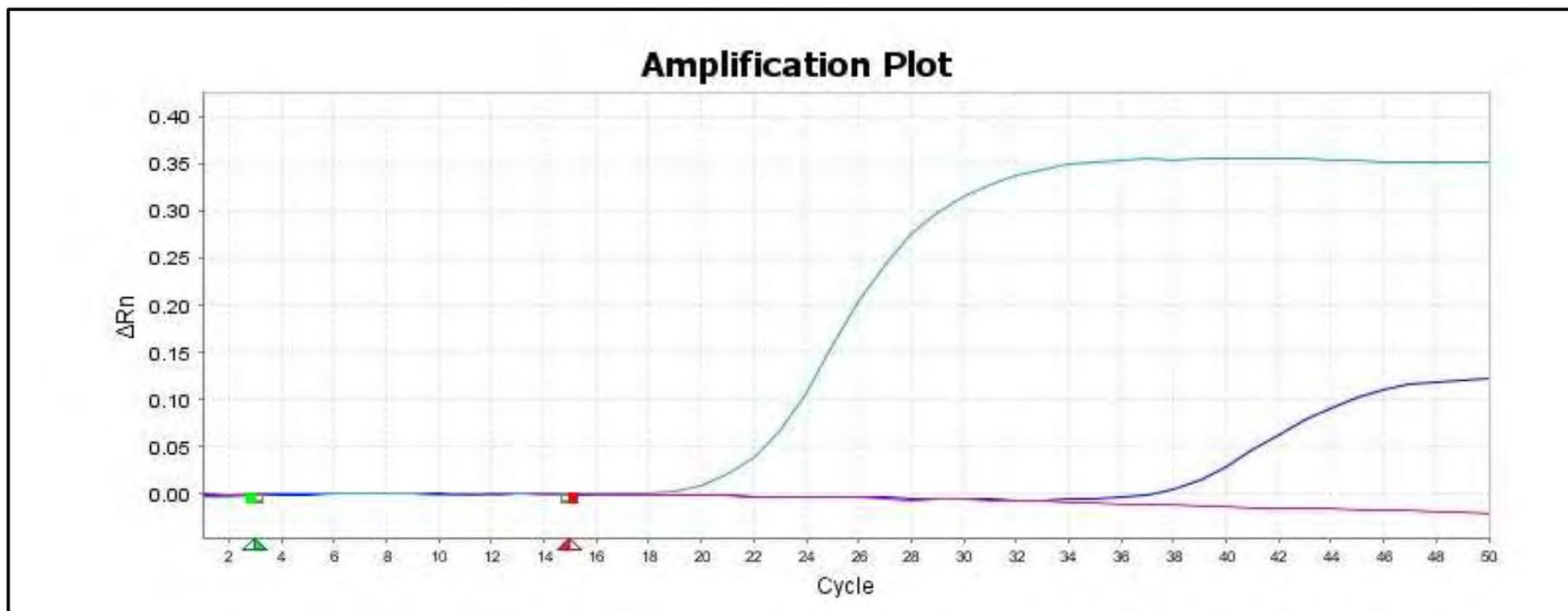
La curva presenta linealidad con una eficiencia de 111.314%, R² de 0.998 y una pendiente de -3.078 que indica las muestras fueron evaluadas correctamente con buena confiabilidad de los resultados y un error bajo de 0.039 a pesar del nivel alto de Ct (38.233).

Grafica 5 Muestra la amplificación de la muestra N°15 siendo su Ct 35.933



Fuente: Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático.

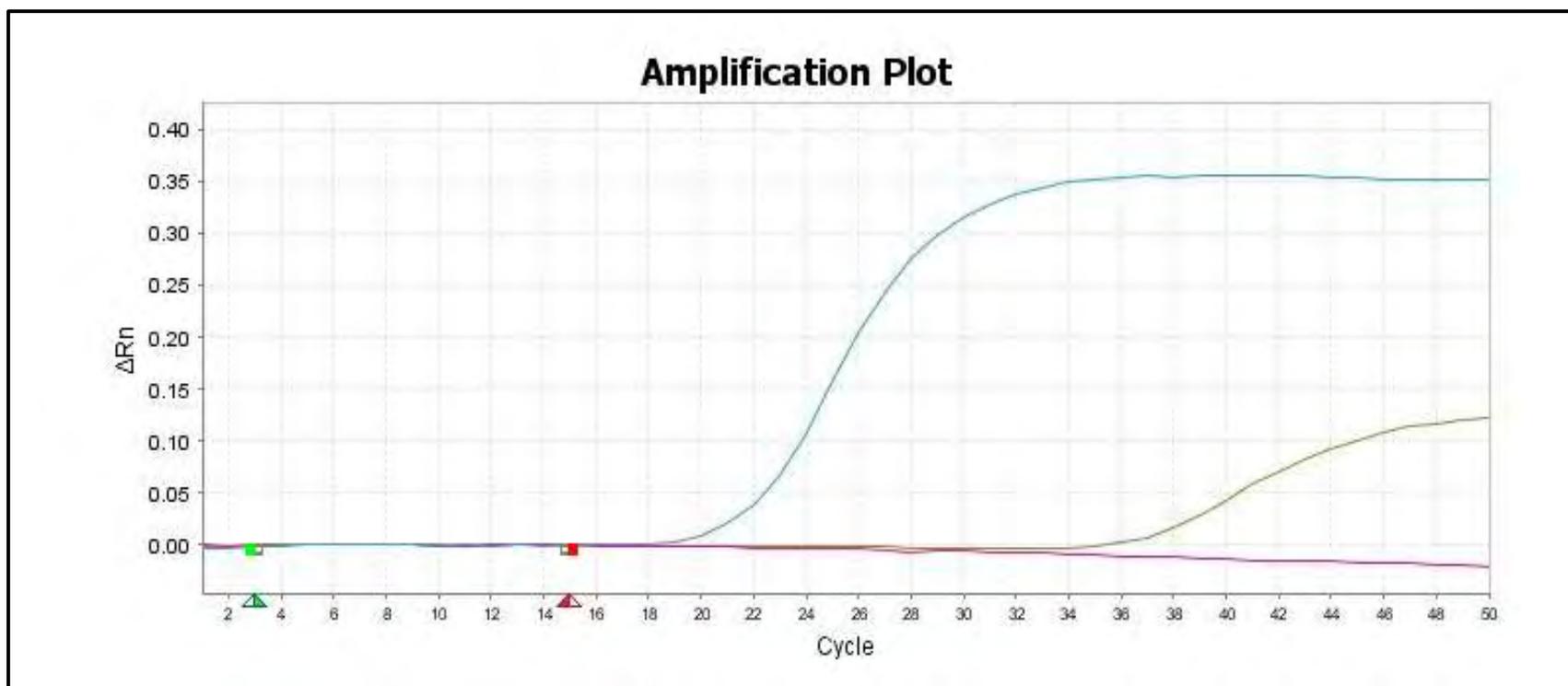
Grafica 6 Muestra la amplificación de la muestra N°17 siendo su Ct 36.284



■ CPOS ■ NTC ■ Sample 17

Fuente: Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático.

Grafica 7. Muestra de amplificación de la muestra N°27 cuyo Ct es 36.284



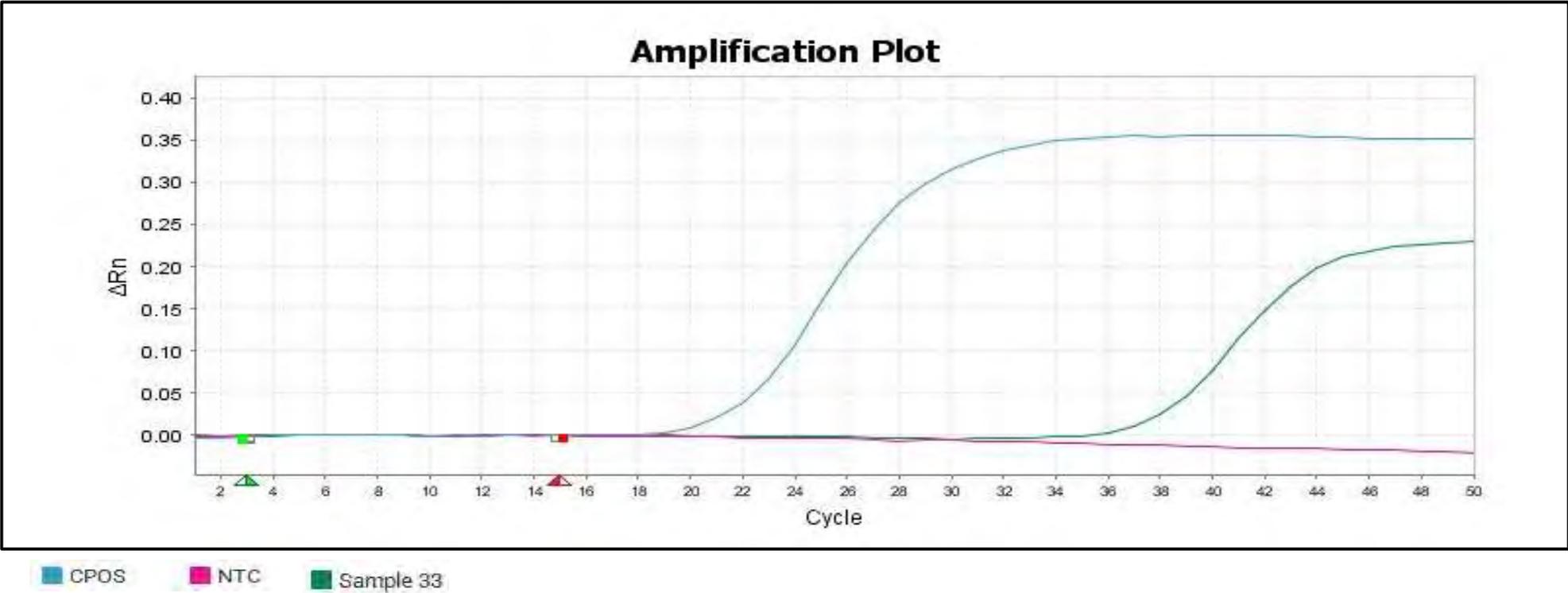
CPOS

NTC

Sample 27

Fuente: Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático.

Grafica 8. Muestra la amplificación de la muestra N°33 cuyo Ct es 38.378



Fuente: Laboratorio de Ciencia Animal y Cambio Climático.

5.3 Discusión.

Para el caso de la prevalencia de acuerdo a los resultados obtenidos por PCR amplificaron 4 casos a las toxinas del *Clostridium perfringens*, representando el 6.45% de las muestras analizadas, estos datos son parecidos a lo reportado por Caman (2018), quien determino causas de mortalidad en alpacas y su impacto económico durante el periodo 2010-2016, reportando que las causas fortuitas se ubican en primer lugar con: 9.98 % para tuis, seguido de 6.3 % en crías y 4.5 % para adultos; mientras que la causa con menor porcentaje de mortalidad son las enfermedades infecciosas con 0.75 % para tuis, 0.53 % para crías y 0.18 % para adulto. Por otro lado, estos resultados difieren con Ramírez (1991), donde menciona que la causa con mayor porcentaje de mortalidad son las enfermedades infecciosas, obteniendo 66.5 % para crías, 53.1 % para tuis y 52.4 % para adultos; mientras que la menor causa de mortalidad la presentan las causas fortuitas con 4.0 % en crías, 11.7 % en tuis y 11.4 % en adultos. De igual manera, Apaza y Huanca (2002), observaron tasas de mortalidad; según la clase de alpacas, donde se muestran que las mayores tasas de mortalidad total en crías hembras y machos presenta 37.72 % y 40.32 % respectivamente; mientras en tuis hembras 15.56% y macho 23.20 %.

En caso de la cuantificación para la presencia del *Clostridium perfringens* a partir DNA, se observó un Ciclo umbral dentro del rango de 35.93 a 38.73 y un control positivo de 21.44, siendo estos rangos diferentes a los observados por Burga (2016), quien evaluó la expresión de citoquinas de la respuesta Th2 en mucosa intestinal de crías de alpaca, analizando la expresión del gen GAPDH (Gliceraldehido 3 fosfato

deshidrogenasa) usado como control interno o endógeno reporto que todas las muestras obtenidas expresaron este gen, dentro de un ciclo umbral en un rango de 19.3 a 23.8.

Para el caso se la cuantificación del *Clostridium perfringens* se coincide en su importancia según Uzal 2022 en que menciona que se requiere cuantificar la cantidad de este microorganismo presente en las heces y/o el contenido intestinal.

Rosadio *et al.*, 2008, al realizar la prevalencia de enterotoxemia encontró un 99.6% de 224 aislados de casos fatales de la enfermedad correspondían a *C. perfringens* tipo A y el diferencial al tipo C.

R miserez 1998, al realizar la Detección del *Clostridium perfringens* en Ovinos y caprinos de las muestras de los 52 animales enfermos y las muestras de 13 de los 18 animales sanos (los cultivos de cinco animales sanos fueron negativos para *Clostridium perfringens*), dieron una señal positiva para el gen de la toxina α que es inherente a la especie *Clostridium perfringens* (Fach et al. 1993; Buogo et al. 1995), confirmando así la presencia de *Cl. perfringens* en intestinos de animales sanos, coincidiendo el trabajo de investigación con relación a la evaluación a muestras de animales aparentemente sanos.

Ramos *et al* 2021 en estudios de *Mycoplasmas spp* tuvo como objetivo realizar un estudio molecular e identificación de *Mycoplasma spp hemotrópico*. En Camélidos Sudamericanos domésticos del Sur de Chile. Utilizando la técnica PCR convencional (cPCR) para hemotrópicos *Mycoplasma spp*. Establecido en el gen 16S rRNA (fragmento de 620 pb) en 87 muestras de sangre con EDTA tomadas de 48 llamas (*Lama glama*) y 39 y alpacas (*Vicugna pacos*) de Temuco, región de La Araucanía y Valdivia, región de Los Ríos, Sur de Chile, siendo la única investigación encontrada en la literatura que

coincide con relación al tipo de muestras en este caso sangre, la mayoría de trabajos son en liquido intestinal.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- El *Clostridium perfringens* existe en las comunidades de estudio debido a que se hallaron 4 casos en las comunidades de Llullucha y Palcca, representando el 6.45 % de la población muestreada.
- En caso de la cuantificación a partir del ADN extraído de sangre alpaca para la presencia del *Clostridium perfringens*, se observó un Ciclo umbral dentro del rango de 35.93 a 38.73 y un control positivo de 21.44.
- Se ha podido establecer que existen toxinas producidas por el *Clostridium perfringens* presentes en la sangre de alpaca.

6.2 Recomendaciones

1. Realizar una réplica de este trabajo de investigación en distintos centros de producción de alpacas y en diferentes épocas del año, puesto que se tiene poca o ninguna información en crías de alpacas.
2. Utilizar pruebas de secuenciación para detectar toxinas del *Clostridium perfringens* en sangre de Alpacas.
3. Aumentar el número de réplicas para tener una mayor confiabilidad.
4. Realizar el trabajo con diluciones menores a dos copias para poder detectar mínimas concentraciones.
5. En base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se sugiere realizar programas de vacunación para las comunidades alpaqueras y fomentarlas como políticas sanitarias.
6. Realizar capacitación a los productores alpaqueros del distrito de Ocongate ya que en su mayoría son afectados económicamente con la muerte de las crías.

7 BIBLIOGRAFÍA.

- Al-Khaldi, S. M. (2004b.). *Genotyping of Clostridium perfringens toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization*. Mol Cell Probes; 18:359-367.
- Al-Khaldi, S. V. (2004^a). *Identification and characterization of Clostridium perfringens using single target DNA microarray chip*. Int J Food Microbiol; 91:289-296.
- Ameghino, E. &. (1991). Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigación Tropical y de Altura. . En M. e. Alpaca. Lima Peru: IVITA - UNMSM.
- Barach, J. D. (1974). *Recovery of heat Clostridium perfringens type A spores on selective media*. Appl.Microbiol.28:793-797.
- Baums, C. G., Schotte, Amtsberg, G., & Goethe., R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of Clostridium perfringen isolates. Vet. Microbiol. 100.
- Brooks, G. y. (1998). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick,yAldergerg.16va ed.* Mexico: Editorial El Manual Moderno.
- Bustinza AV, B. P. (2001). *Factores que afectan la supervivencia en jóvenes alpacas (Lama pacos)*.
- Bustinza, J. (2000). *Enfermedades de la alpaca*. Arequipa: 2da ed.Impreso Universidad Nacional del Altiplano.
- CAMAN, S. J. (2018). CAUSAS DE MORTALIDAD EN ALPACAS Y SU IMPACTO ECONOMICO, EN LA SAIS TUPAC AMARU LTDA- N° 1, 2010 – 2016. HUANCAYO – PERU.

- Campos, D. d. (2004). *Clostridium perfringens* tipo A portadores do gene *cpb2* associados à lesões em íleo de coelhos. *Arq Inst Biol São Paulo*; 71:287-292.
- CHIRINOS, C. A. (2017). CUANTIFICACIÓN DEL *Clostridium perfringens* Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE *Eimeria* spp. EN CRÍAS DE ALPACAS SANAS Y MUERTAS CON SÍNDROME HEMORRÁGICO ENTEROTÓXICO EN EL CIP. LA RAYA. Puno Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO.
- Cristina, K. M.-L. (01 de noviembre de 2011). *Obtenido de Primera detección de "Candidatus Mycoplasma haemolae" en camélidos sudamericanos de Suiza y evaluación de prevalencia.* Obtenido de Europa PMC: <https://europepmc.org/article/med/21141277>
- Cruickshan, R. (1965). *Medical microbiology. 11 ed. Great Britain*:. E. & S. Livingstone Limited.
- Dray, T. (2004). *Clostridium perfringens* type A and 2 toxin associated with enterotoxemia in a 5- week-old goat. *Can Vet J* 45: 251-253.
- Duchesnes, C. y. (2005). *Genus Clostridium .Scientific Booklets.* Obtenido de Scientific Booklets European Concerted Action QLK2-CT2001-01267.: <http://www.genusclostridium.net>.
- Engström, B. G. (2003). *typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry.* *Vet.Microbiol.*94:225-235.

Fowler, M. E. (1998). *Medicine and surgery of South American camelids*. 2da ed. Iowa State University Press. Iowa. p166-169.

Garrity, G. D. (2001). Taxonomic outline of the prokaryotic genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: 2da ed. p1-41.

Gholamiandekhordi, A. D. (2006). *Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status*. *Vet Microbiol*; 113:143-152.

Gibert, M. J.-R. (1997). *Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens*. *Gene*; 203:65-73.

Hatheway, C. (1990). *Toxigenic clostridia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:66-98.

Herholz, C. R. (1999). *Prevalence of β -2-toxigenic Clostridium perfringens in horses with intestinal disorders*. *J. Clin. Microbiol.* 37:358-361.

Huanca, T. (1991). *Manual de Sanidad en la Crianza de alpacas*. Puno - Perú: Proyecto de alpacas INIA- CPRPUNO-COTESUI/IC.

INEI. (2012). *IV Censo Nacional Agropecuario*. Obtenido de <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/>

Joclik, W. y. (1991). *Zinsser Microbiología*. Buenos Aires.: 20va ed. Ed. Médica Veterinaria p861-871.

Keyburn, A. J. (2008). *NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by Clostridium perfringens*. *Plos Pathogens*. 4(2):e26.

- Lizana, H. E. (2016). *Asociación de Eimeria macusaniensis y Clostridium perfringens en proceso diarreicos en crías de Alpaca (vicugna pacos) en la comunidad de Santa Bárbara - Huancavelica*. Obtenido de Universidad Nacional de Huancavelica: <http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/1159>
- Lucas JR, M. S. (2016). Patógenos involucrados en caso fatales de diarrea en crías de alpaca de la sierra central del Perú . *Rev Inv Vet Perú* .
- Madigan, M. J. (2001). *Biología de los microorganismos*. 8va ed. PrenticeHall.España.p725-727.
- Maximiliano, J., Maturrano, L., Castillo, H., Guzmán, K., Pérez, D., Luna, L., . . . Rosadio, R. (2018). *Concentraciones de inmunoglobulina G sérica en alpacas Neonatas muertas por enterotoxemia*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*.
- Meli, M. L. (27 de mayo de 2010). *Obtenido de Desarrollo y aplicación de un ensayo qPCR TaqMan(®) en tiempo real para la detección y cuantificación de 'Candidatus Mycoplasma haemolae' en camélidos sudamericanos*. Obtenido de <https://europepmc.org/article/MED/21095509>
- Melo, M., Median, G., Sánchez, C., Condemayta, Z., & Soto., A. (1999). Influencia del manejo de un brote de enterotoxemia en crías de alpaca del CE la Raya - UNA Puno. Cusco Perú: Res. II Cong. Mun. Sobre Camélidos.
- Moro, M. (1971). *Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas*. Lima Perú: Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Invetigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) UNMSM.

- Moro, M. (1987). *Enfermedades Infecciosas de las Alpacas. Diarrea basilar o Enterotoxemia de las crias de alpacas*. Rev Camelidos Sudamericanos 4 :8-13.
- Muñoz, J. (2007). Caracterización morfométrica de un rebaño de alpacas Huacaya. En h. dle/2250/133187, *Tesis de titulación, Universidad de Chile*.
- Nauerby, B. P. (2003). *Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among Clostridium perfringens isolates from chickens*. Vet Microbiol; 94: 257-266.
- Nicolet, J. (1986). *Compendio de bacteriología médica veterinaria*. España: Editorial Acribia S.A.
- Novoa C, F. A. (1991). *Producción de rumiantes menores: alpacas*. Lima: Resumen 358.
- Ortiz, S. (1988). *Tesis Evaluacion de algunos metodos de control de la mortalidad en crias de alpacas (lama pacos) en explotaciones familiares*. Lima: UNMSM.
- Palacios C, T. N. (2004). Eimeriosis en crías de alpacas: . En e. a. histopatológico. Rev Inv Vet Perú.
- Pérez D, M. L. (2012). *Genotipificación y subtipificación molecular de cepas de Clostridium perfringens aisladas en alpacas muertas por enterotoxemia*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 23(3):.
- Petit, L. (1999). *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype*. Trends Microbiol 7: 104-110.
- Petit, L. G. (1999). *Clostridim perfringens.: Toxinotype and genotype*. Rev. Trends in Mirobiology Vol. 7 N°3. .

- Prehn, N. y. (1999). *Estudios microbiológicos y clínicos de enterotoxemia por Clostridium perfringens en camélidos sudamericanos*. Cusco, Perú.p140.: Res.IICong.Mun.Sobre Camélidos.
- R. Miserez, J. F. (1998). *Detection of aa - and oo - toxigenic Clostridium perfringens Type D in sheep and goats using s DNA amplification technique PCR*. Switzerland: Institute for Veterinary bacteriology and Institute of Animal Paphology.
- Ramirez. (1991). *Enfermedades Infecciosas Avances y perspectivas del conocimiento de los camelidos sudamericanos*. Santiago de Chile: FAO.
- Ramirez, A. (1987). *Alpacas Clostridium perfringens type A Enterotoxemia: Purification and assays of the enterotoxin. In partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy*. Colorado: State University Colorado 201.
- Ramirez, A. (1990.). *Aplicación de la enterotoxemia de Clostridium perfringens tipo A en el diagnostico y control de la enterotoxemia en camelidos sudamericanos.. En Avances sobre investigacion en salud animal CSA*. Univ. Nac Mayor de San Marcos Bol Div.
- Ramírez, A. R. (1988). *Nuevos conceptos sobre la enterotoxemia y colibacilosis en alpacas*. Lima 6:9-17: Rev.Camélidos Sudamericanos.
- Ramirez, A., Huamán, D., & R.P., E. (1985). *Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigacion en rumientes menores*. Lima 63: 1 . 17: Serie Reporte Tecnico.

- Rojas M, M. A. (2016). Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (Vicugna pacos). En i. t. Highland. J Infect Dev Ctries.
- Rood, J. (1998). *Virulence genes of Clostridium perfringens*. Annu. Rev. Microbiol 52:333–360.
- Rosadio R, L. P. (2010). Eimeria macusaniensis associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. Vet Parasitol.
- Sawires, S. S. (2005). *Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of Clostridium perfringens*. Anaerobe; 11:262-272.
- Smedley, J. a. (2004). *The enterotoxins of Clostridium perfringens*. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 152:183–204.
- Songer, J. (1996). *Bacterial Phospholipases and their role in virulence*. trends Microbiol.
- Songer, J. G., & Meer, R. R. (1996). Genotyping of Clostridium perfringens by polymerase chain reaction is a useful to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. Anaerobe.
- Titball, R. N. (1999). *The Clostridium perfringens α -toxin*. Anaerobe; 5:51-64.
- Uzal Francisco A, G. F. (20 de junio de 2022). *Universidad de California*. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/12/1590/htm>
- Waters, M. a. (2003). *Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with gastrointestinal disease in piglets*. J. Clin. Microbiol. 41:3584-3591.

- Wheeler, J. (1995). Origen, evolución de atatus actual. En: Fernández-Baca S (ed). En *Avances y perspectivas del conocimiento de los camelidos sudamericanos*. Santiago de Chile: FAO.
- Yoo, H. S., Lee, S. U., Park, K. Y., & Park, Y. H. (1997). Molecular Typing and epidemiological survery of prevalence of Clostridium *perfringens* types by multiplex. PCR. J Clin Microbiol 35.

8 ANEXOS

8.1 Registro fotográfico.

Fotografía 1 Carretera de ingreso a las comunidades de estudio



Fotografía 2 Reunión de coordinación.



Fotografía 3 *Dormidero de alpacas en CC. de Huacatinco*



Fotografía 4 *Dormidero de alpacas en Cc der Huacatinco*



Fotografía 5 *Dormidero de alpacas en Cc de Palcca*



Fotografía 6 *Colecta de muestras biológicas (sangre)*



Fotografía 7 *Colecta de muestras biológicas (sangre)*



Fotografía 8 *Cabina molecular Nivel II BioBase*



Fotografía 9 *Medición de la concentración de ADN con Nanodrop*



Fotografía 10 *Procesamiento de muestras en Termociclador*



tabla 16. Registro de alpacas muestreadas como material biológico.

REGISTRO DE ALPACAS MUESTREADAS						
Productor	Muestra	Sexo	Cat	Raza	Comunidad	Sector
Mariano Qeshuallpa Ttito	1	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	2	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	3	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	4	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	5	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	6	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	7	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	8	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	9	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Mariano Qeshuallpa Ttito	10	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Fortunato Huaman Yapura	11	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Fortunato Huaman Yapura	12	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Fortunato Huaman Yapura	13	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Fortunato Huaman Yapura	14	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Fortunato Huaman Yapura	15	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Fortunato Huaman Yapura	16	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Fortunato Huaman Yapura	17	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Fortunato Huaman Yapura	18	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	ALIANZA
Marcial Huisa Condori	19	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	20	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	21	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	22	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	23	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	24	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	25	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA

Tabla 16A. Registro de alpacas muestreadas como material biológico.

REGISTRO DE ALPACAS MUESTREADAS						
Productor	Muestra	Sexo	Cat	Raza	Comunidad	Sector
Marcial Huisa Condori	26	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	27	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	28	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	29	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	30	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	31	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	32	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Marcial Huisa Condori	33	HEMBRA	A	HUACAYA	PALCCA	PALCCA
Isaias Quispe Cansaya	34	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	35	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	36	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	37	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	38	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	39	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	40	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	41	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	42	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	43	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Isaias Quispe Cansaya	44	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Hilaria Gonzales Quesuallpa	45	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Hilaria Gonzales Quesuallpa	46	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Hilaria Gonzales Quesuallpa	47	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Hilaria Gonzales Quesuallpa	48	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Hilaria Gonzales Quesuallpa	49	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Hilaria Gonzales Quesuallpa	50	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA

Tabla 16B. Registro de alpacas muestreadas como material biológico.

REGISTRO DE ALPACAS MUESTREADAS						
Productor	Muestra	Sexo	Cat	Raza	Comunidad	Sector
Hilaria Gonzales Qesuallpa	51	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Hilaria Gonzales Qesuallpa	52	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Hilaria Gonzales Qesuallpa	53	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Antolin Quispe Condori	54	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	55	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	56	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	57	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	58	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	59	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	60	MACHO	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	61	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	62	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	63	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	64	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	65	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	66	MACHO	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	67	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	68	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	69	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	70	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	71	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	72	MACHO	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	73	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	74	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO
Antolin Quispe Condori	75	HEMBRA	A	HUACAYA	HUACATINCO	HUACATINCO

Tabla 16C. Registro de alpacas muestreadas como material biológico.

REGISTRO DE ALPACAS MUESTREADAS						
Productor	Muestra	Sexo	Cat	Raza	Comunidad	Sector
Hilaria Gonzales Quesuallpa	51	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PATACHAHUANA
Agripino Ttito Yucra	76	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	77	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	78	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	79	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	80	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	81	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	82	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	83	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	84	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	85	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	86	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	87	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	88	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Agripino Ttito Yucra	89	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	90	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	91	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	92	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	93	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	94	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	95	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	96	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	97	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	98	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	99	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Icnacio Qeshuallpa Ttito	100	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA

Tabla 16D. Registro de alpacas muestreadas como material biológico.

REGISTRO DE ALPACAS MUESTREADAS						
Productor	Muestra	Sexo	Cat	Raza	Comunidad	Sector
Ignacio Qeshuallpa Ttito	101	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Ignacio Qeshuallpa Ttito	102	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Ignacio Qeshuallpa Ttito	103	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Ignacio Qeshuallpa Ttito	104	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Ignacio Qeshuallpa Ttito	105	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	106	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	107	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	108	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	109	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	110	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	111	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	112	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	113	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	114	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Clicerio Ttito Yucra	115	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	116	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	117	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	118	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	119	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	120	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	121	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	122	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	123	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Claudio Qeshuallpa Ttito	124	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	PUCCACCASA
Luis Qeshuallpa Ttito	125	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA

Tabla 16E. Registro de alpacas muestreadas como material biológico.

REGISTRO DE ALPACAS MUESTREADAS						
Productor	Muestra	Sexo	Cat	Raza	Comunidad	Sector
Luis Qeshuallpa Ttito	126	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	127	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	128	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	129	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	130	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	131	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	132	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	133	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	134	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	135	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	136	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	137	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	138	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	139	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	140	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	141	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	142	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	143	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	144	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	145	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	146	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	147	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	148	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	149	MACHO	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA
Luis Qeshuallpa Ttito	150	HEMBRA	A	HUACAYA	LLULLUCHA	QUISCAPATA

tabla 17. Medidas de Concentración de ADN Por NANO DROP ONE°

NANO DROP ONE°								
Muestras	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280	Factor de ácido nucleico	Corrección de línea base (nm)	Absorbancia de línea base
1	16,529	1,408	0,354	0,331	0,235	50,00	340	0.087
2	18,352	1,370	0,364	0,367	0,268	50,00	340	0.08
3	10,758	1,406	0,291	0,215	0,153	50,00	340	3.343
4	9,184	1,431	0,314	0,184	0,128	50,00	340	0.091
5	14,713	1,459	0,511	0,294	0,202	50,00	340	0.041
6	14,633	1,565	0,543	0,293	0,187	50,00	340	0.075
7	13,608	1,528	0,356	0,272	0,178	50,00	340	0.049
8	12,939	1,700	0,693	0,259	0,152	50,00	340	0.074
9	11,495	1,606	0,459	0,230	0,143	50,00	340	0.091
10	11,485	1,534	0,464	0,230	0,150	50,00	340	0.078
11	20,565	1,349	0,366	0,411	0,305	50,00	340	0.525
12	19,661	1,313	0,392	0,393	0,299	50,00	340	0.463
13	20,851	1,509	0,599	0,417	0,276	50,00	340	0.045
14	20,845	1,581	0,620	0,417	0,264	50,00	340	0.054
15	25,201	1,469	0,552	0,504	0,343	50,00	340	0.302
16	25,238	1,447	0,537	0,505	0,349	50,00	340	0.292
17	16,952	1,426	0,438	0,339	0,238	50,00	340	0.061
18	15,653	1,392	0,365	0,313	0,225	50,00	340	0.726
19	13,371	1,477	0,460	0,267	0,181	50,00	340	-0.001
20	11,128	1,648	0,531	0,223	0,135	50,00	340	-0.035
21	29,822	1,408	0,404	0,596	0,424	50,00	340	0.826
22	28,244	1,400	0,400	0,565	0,404	50,00	340	0.715
23	15,924	1,439	0,279	0,318	0,221	50,00	340	0.096
24	16,529	1,408	0,354	0,331	0,235	50,00	340	0.087
25	15,691	1,452	0,488	0,314	0,216	50,00	340	0.038

Tabla 17A. Medidas de Concentración de ADN Por NANO DROP ONE°

NANO DROP ONE°								
Muestras	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280	Factor de ácido nucleico	Corrección de línea base (nm)	Absorbancia de línea base
26	15,756	1,501	0,499	0,315	0,210	50,00	340	0.057
27	13,645	1,418	0,371	0,273	0,192	50,00	340	0.037
28	13,548	1,440	0,405	0,271	0,188	50,00	340	0.069
29	11,128	1,205	0,287	0,223	0,185	50,00	340	0.083
30	10,777	1,252	0,291	0,216	0,172	50,00	340	0.082
31	9,175	1,162	0,187	0,183	0,158	50,00	340	0.046
32	8,539	1,241	0,243	0,171	0,138	50,00	340	0.056
33	5,507	1,213	0,204	0,110	0,091	50,00	340	0.069
34	5,854	1,200	0,225	0,117	0,098	50,00	340	0.065
35	5,586	1,147	0,208	0,112	0,097	50,00	340	0.053
36	7,057	1,146	0,272	0,141	0,123	50,00	340	0.066
37	6,390	1,184	0,237	0,128	0,108	50,00	340	0.084
38	14,331	1,212	0,189	0,287	0,237	50,00	340	0.15
39	15,207	1,217	0,212	0,304	0,250	50,00	340	0.21
40	7,308	1,068	0,116	0,146	0,137	50,00	340	0.165
41	6,929	1,094	0,117	0,139	0,127	50,00	340	0.242
42	9,267	1,283	0,188	0,185	0,144	50,00	340	0.164
43	8,800	1,229	0,181	0,176	0,143	50,00	340	0.171
44	2,747	0,962	0,123	0,055	0,057	50,00	340	0.043
45	2,680	0,868	0,116	0,054	0,062	50,00	340	0.024
46	3,884	0,973	0,097	0,078	0,080	50,00	340	0.066
47	4,137	1,150	0,124	0,083	0,072	50,00	340	0.076
48	8,097	0,993	0,112	0,162	0,163	50,00	340	0.301
49	7,790	1,142	0,111	0,156	0,136	50,00	340	0.289
50	4,959	1,075	0,110	0,099	0,092	50,00	340	0.184

Tabla 17B. Medidas de Concentración de ADN Por NANO DROP ONE°

NANO DROP ONE°								
Muestras	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280	Factor de ácido nucleico	Corrección de línea base (nm)	Absorbancia de línea base
51	4,987	1,106	0,109	0,100	0,090	50,00	340	0.185
52	6,778	1,047	0,122	0,136	0,129	50,00	340	0.241
53	6,466	1,095	0,117	0,129	0,118	50,00	340	0.26
54	2,259	0,726	0,092	0,045	0,062	50,00	340	0.076
55	1,880	0,674	0,102	0,038	0,056	50,00	340	0.041
56	9,857	1,042	0,167	0,197	0,189	50,00	340	0.165
57	9,542	1,065	0,177	0,191	0,179	50,00	340	0.086
58	9,293	1,040	0,172	0,186	0,179	50,00	340	0.088
59	16,301	1,130	0,199	0,326	0,289	50,00	340	0.23
60	15,717	1,115	0,206	0,314	0,282	50,00	340	0.169
61	9,982	1,175	0,253	0,200	0,170	50,00	340	15
62	9,036	1,085	0,252	0,181	0,167	50,00	340	0.139
63	7,581	1,141	0,203	0,152	0,133	50,00	340	0.128
64	6,450	1,226	0,213	0,129	0,105	50,00	340	0.054
65	5,694	1,384	0,233	0,114	0,082	50,00	340	0.065
66	11,294	1,315	0,245	0,226	0,172	50,00	340	0.174
67	11,875	1,267	0,257	0,237	0,187	50,00	340	0.166
68	8,370	1,292	0,205	0,167	0,130	50,00	340	0.113
69	7,976	1,328	0,209	0,160	0,120	50,00	340	0.088
70	14,840	1,305	0,264	0,297	0,227	50,00	340	0.143
71	14,331	1,320	0,266	0,287	0,217	50,00	340	0.146
72	17,224	1,321	0,294	0,344	0,261	50,00	340	0.168
73	16,624	1,364	0,319	0,332	0,244	50,00	340	0.181
74	10,771	1,367	0,283	0,215	0,158	50,00	340	0.118
75	10,936	1,309	0,298	0,219	0,167	50,00	340	0.094

Tabla 17C. Medidas de Concentración de ADN Por NANO DROP ONE°

NANO DROP ONE°								
Muestras	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280	Factor de ácido nucleico	Corrección de línea base (nm)	Absorbancia de línea base
76	14,918	1,338	0,309	0,298	0,223	50,00	340	0.101
77	14,719	1,338	0,344	0,294	0,220	50,00	340	0.095
78	27,632	1,290	0,355	0,553	0,428	50,00	340	0.627
79	27,467	1,297	0,354	0,549	0,424	50,00	340	0.622
80	11,212	1,521	0,441	0,224	0,147	50,00	340	0.098
81	10,080	1,475	0,423	0,202	0,137	50,00	340	0.106
82	32,771	1,391	0,326	0,655	0,471	50,00	340	1.008
83	31,397	1,431	0,427	0,628	0,439	50,00	340	0.922
84	13,206	1,239	0,092	0,264	0,213	50,00	340	0.434
85	12,674	1,263	0,117	0,253	0,201	50,00	340	0.504
86	9,014	1,158	0,157	0,180	0,156	50,00	340	0.205
87	9,068	1,136	0,157	0,181	0,160	50,00	340	0.148
88	15,034	1,101	0,170	0,301	0,273	50,00	340	0.252
89	15,007	1,106	0,171	0,300	0,271	50,00	340	0.283
90	10,740	1,308	0,138	0,215	0,164	50,00	340	0.106
91	10,134	1,277	0,154	0,203	0,159	50,00	340	-0.542
92	9,496	1,326	0,215	0,190	0,143	50,00	340	0.204
93	8,370	1,292	0,205	0,167	0,130	50,00	340	0.113
94	7,976	1,328	0,209	0,160	0,120	50,00	340	0.088
95	14,840	1,305	0,264	0,297	0,227	50,00	340	0.143
96	14,331	1,320	0,266	0,287	0,217	50,00	340	0.146
97	17,224	1,321	0,294	0,344	0,261	50,00	340	0.168
98	27,632	1,290	0,355	0,553	0,428	50,00	340	0.627
99	2,680	0,868	0,116	0,054	0,062	50,00	340	0.024
100	8,539	1,241	0,243	0,171	0,138	50,00	340	0.056

Tabla 17D. Medidas de Concentración de ADN Por NANO DROP ONE°

NANO DROP ONE°								
Muestras	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280	Factor de ácido nucleico	Corrección de línea base (nm)	Absorbancia de línea base
76	14,918	1,338	0,309	0,298	0,223	50,00	340	0.101
101	4,137	1,150	0,124	0,083	0,072	50,00	340	0.076
102	8,097	0,993	0,112	0,162	0,163	50,00	340	0.301
103	7,790	1,142	0,111	0,156	0,136	50,00	340	0.289
104	28,244	1,400	0,400	0,565	0,404	50,00	340	0.715
105	15,924	1,439	0,279	0,318	0,221	50,00	340	0.096
106	16,529	1,408	0,354	0,331	0,235	50,00	340	0.087
107	15,691	1,452	0,488	0,314	0,216	50,00	340	0.038
108	15,756	1,501	0,499	0,315	0,210	50,00	340	0.057
109	13,645	1,418	0,371	0,273	0,192	50,00	340	0.037
110	13,548	1,440	0,405	0,271	0,188	50,00	340	0.069
111	11,128	1,205	0,287	0,223	0,185	50,00	340	0.083
112	10,777	1,252	0,291	0,216	0,172	50,00	340	0.082
113	9,175	1,162	0,187	0,183	0,158	50,00	340	0.046
114	8,539	1,241	0,243	0,171	0,138	50,00	340	0.056
115	14,918	1,338	0,309	0,298	0,223	50,00	340	0.101
116	5,854	1,200	0,225	0,117	0,098	50,00	340	0.065
117	13,608	1,528	0,356	0,272	0,178	50,00	340	0.049
118	12,939	1,700	0,693	0,259	0,152	50,00	340	0.074
119	11,495	1,606	0,459	0,230	0,143	50,00	340	0.091
120	11,485	1,534	0,464	0,230	0,150	50,00	340	0.078
121	20,565	1,349	0,366	0,411	0,305	50,00	340	0.525
122	15,756	1,501	0,499	0,315	0,210	50,00	340	0.057
123	13,645	1,418	0,371	0,273	0,192	50,00	340	0.037
124	13,548	1,440	0,405	0,271	0,188	50,00	340	0.069
125	11,128	1,205	0,287	0,223	0,185	50,00	340	0.083

Tabla 17E. Medidas de Concentración de ADN Por NANO DROP ONE°

NANO DROP ONE°								
Muestras	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280	Factor de ácido nucleico	Corrección de línea base (nm)	Absorbancia de línea base
126	10,777	1,252	0,291	0,216	0,172	50,00	340	0.082
127	9,175	1,162	0,187	0,183	0,158	50,00	340	0.046
128	8,539	1,241	0,243	0,171	0,138	50,00	340	0.056
129	14,918	1,338	0,309	0,298	0,223	50,00	340	0.101
130	5,854	1,200	0,225	0,117	0,098	50,00	340	0.065
131	13,608	1,528	0,356	0,272	0,178	50,00	340	0.049
132	17,224	1,321	0,294	0,344	0,261	50,00	340	0.168
133	16,624	1,364	0,319	0,332	0,244	50,00	340	0.181
134	10,771	1,367	0,283	0,215	0,158	50,00	340	0.118
135	10,777	1,252	0,291	0,216	0,172	50,00	340	0.082
136	14,918	1,338	0,309	0,298	0,223	50,00	340	0.101
137	14,719	1,338	0,344	0,294	0,220	50,00	340	0.095
138	27,632	1,290	0,355	0,553	0,428	50,00	340	0.627
139	27,467	1,297	0,354	0,549	0,424	50,00	340	0.622
140	8,539	1,241	0,243	0,171	0,138	50,00	340	0.056
141	5,507	1,213	0,204	0,110	0,091	50,00	340	0.069
142	5,854	1,200	0,225	0,117	0,098	50,00	340	0.065
143	13,608	1,528	0,356	0,272	0,178	50,00	340	0.049
144	11,128	1,205	0,287	0,223	0,185	50,00	340	0.083
145	10,777	1,252	0,291	0,216	0,172	50,00	340	0.082
146	5,507	1,213	0,204	0,110	0,091	50,00	340	0.069
147	8,370	1,292	0,205	0,167	0,130	50,00	340	0.113
148	10,777	1,252	0,291	0,216	0,172	50,00	340	0.082
149	14,719	1,338	0,344	0,294	0,220	50,00	340	0.095
150	8,370	1,292	0,205	0,167	0,130	50,00	340	0.113

