

GENOTIPIFICACIÓN Y SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Clostridium perfringens* AISLADAS EN ALPACAS MUERTAS POR ENTEROTOXEMIA

MOLECULAR GENOTYPING AND SUBTYPING OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATED FROM FATAL ENTEROTOXEMIA IN ALPACAS

David Pérez¹, Lenin Maturrano^{2,4}, Raúl Rosadio^{2,3}

RESUMEN

A pesar de que la enterotoxemia causada por el *Clostridium perfringens* ocasiona elevadas tasas de mortalidad neonatal en alpacas, muy poco se conoce acerca de las toxinas que participan en la patogénesis de la enfermedad. El presente estudio reporta resultados de análisis moleculares de 47 cepas de *C. perfringens* aislados de casos mortales de enterotoxemia en alpacas, basados en la amplificación de los genes *cpa*, *cpb*, *etx* y *iap* codificantes de las toxinas α , β , γ , e $\bar{3}$ (genotipificación), así como la detección de genes secundarios codificantes de la enterotoxina (*cpe*) y toxina β 2 (subtipificación). El ADN bacteriano de las 47 cepas fue sometido a prueba de PCR múltiple evidenciando que 46/47 (97.9%) de los aislamientos correspondieron al genotipo A y de estos, 13/46 (28.3%) contenían adicionalmente el gen β 2 (subtipo *cpe*^{-vo}*cpb*2^{+vo}), mientras que las restantes 33 muestras (71.7%) fueron negativas para ambos genes secundarios (subtipo *cpe*^{-vo}*cpb*2^{-vo}). Solo una de las 47 (2.1%) muestras correspondió al genotipo C y positivo al gen CPE (subtipo *cpe*^{+vo}*cpb*2^{-vo}). Estos resultados sugieren la posible participación de la toxina alfa y beta2 en los casos de enterotoxemia de las alpacas, pero excluyen a la enterotoxina.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, genotipificación, enterotoxemia, alpacas

ABSTRACT

Although enterotoxemia produced by *Clostridium perfringens* causes elevated neonatal mortality in the alpaca, scarce information exists on the virulence factors (toxins) which play an important role in the pathogenesis of the disease. The objective of this study was to genotype and subtype *C. perfringens* isolates from enterotoxemia induced mortalities based on the presence of genes *cpa*, *cpb*, *etx* and *iap* which encode the toxins α , β , γ , and $\bar{3}$, and the genes *cpe* and *cpb*2 which encode the enterotoxin (*cpe*) and β 2-

¹ Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA, Perú

² Unidad de Biología y Genética Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

³ CONOPA – Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos, Perú

⁴ E-mail: lenin.maturrano@gmail.com

toxins, respectively. A total of 47 *C. perfringens* isolates were obtained from the small intestine of neonatal alpaca mortalities which presented clinical signs, as well as gross and histological injuries typical of enterotoxemia. The results showed that 46/47 (97.9%) of the isolates were genotype A, 13 of these 46 (28.3%) also had *cpb2* (genotype A, subtype *cpe⁻cpb2⁺*), while the remaining 33 (71.3%) were negative for both *cpe* and *cpb2* genes (genotype A, subtype *cpe⁻cpb2⁻*) and only 1/47 (2.1%) had the *cpa*, *cpb* y *cpe* genes (genotype C, subtype *cpe⁺cpb2⁻*). The results indicate that both the alpha and beta2 toxins likely play an important role in enterotoxemia aetiology, but excluded participation of the enterotoxin.

Key words: *Clostridium perfringens*, genotyping, enterotoxemia, alpacas

INTRODUCCIÓN

La enterotoxemia en el Perú es la principal enfermedad infecciosa que afecta a las alpacas (*Vicugna pacos*) neonatas. Moro (1966) la describió por primera vez, mencionando al *Clostridium perfringens*, principalmente del tipo A, y en algunos casos al tipo C, como el agente causal. La enfermedad tiene un comportamiento epizootico, alcanzando tasas de mortalidad neonatal de 50% en varios centros de crianza alpaquera del sur del Perú (Carbajal, 1974; Ramírez *et al.*, 1985; Ameghino y DeMartini, 1991). El cuadro clínico corresponde a una toxemia, generalmente de curso fatal (Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987), causando una severa enteritis hemorrágica o necrótica (Ameghino y DeMartini, 1991; Palacios, 2004).

Se tiene un conocimiento limitado sobre las toxinas de *C. perfringens* participantes en la patogenia de la enfermedad. Ramírez (1987) identificó cepas *C. perfringens* tipo A de casos típicos con capacidad de producir una enterotoxina (CPE), que lo condujo a proponer el posible rol patogénico de la CPE. Algunas de esas cepas, inoculadas en llamas, fueron capaces de inducir acumulaciones de fluido intestinal, responsabilizando a la CPE de los cambios observados. Esta propuesta ha sido contrastada por otros investigadores, quienes sugirieron principalmente la participación de las exotoxinas (Fowler, 1998; Prehn *et al.*, 1999) y, tal vez, la presencia de una toxina secundaria, potencialmente patogénica,

la beta2, detectada en algunas cepas aisladas de casos de enterotoxemia en alpacas (Bueschel *et al.*, 2003; Ellis, 2006).

La tipificación del *C. perfringens* ha dependido, tradicionalmente, de inoculaciones de sobrenadantes bacterianos en animales de laboratorio; sin embargo, la disponibilidad de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple, que 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 [genes *cpa* (toxina α), *cpb* (toxina β), *etx* (toxina γ) e *iap* (toxina ζ), incluyendo una subtipificación (gen *cpe* codificante de la enterotoxina y *cpb2* codificante de la toxina β 2) (Songer y Meer, 1996; Yoo *et al.*, 1997; Herholz *et al.*, 1999; Baums *et al.*, 2004). 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).

El presente estudio describe el aislamiento de ADN microbiano de 47 aislamientos de *C. perfringens* obtenidos de alpacas neonatas muertas por enterotoxemia y sometidos a amplificaciones moleculares con el objetivo de genotipificar y subtipificar usando la técnica de PCR múltiple.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se obtuvieron 47 muestras de intestino de alpacas neonatas con diagnóstico de enterotoxemia en el año 2005. Los animales provenían de cuatro hatos alpaqueros localizados sobre los 3500 msnm en los departamentos de Cusco y Puno. El diagnóstico de la enfermedad se hizo de acuerdo a características epidemiológicas, signos clínicos, lesiones anatomopatológicas e histopatológicas. Las muestras consistieron en segmentos de intestino delgado afectado y ligado en sus extremos para ser transportadas a la Unidad de Biología Molecular y Genética (Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos), Lima, en bolsas con tetraborato de sodio como preservante.

Aislamiento e Identificación de *C. perfringens*

Las muestras fueron cultivadas en caldo tioglicolato e incubadas a 45 °C por 48 h en ambiente de anaerobiosis. Luego se tomaron alícuotas del medio para ser sembradas en agar sangre e incubadas bajo las mismas condiciones. Las colonias de *C. perfringens* fueron identificadas en base a características morfológicas de la colonia, patrón hemolítico, coloración Gram y reacción negativa a la catalasa. Estos aislados fueron luego sembrados en agar yema de huevo e incubadas a 37 °C durante 18-24 h bajo anaerobiosis para evidenciar la reacción de Nagler. Finalmente, los aislados positivos fueron reactivados en caldo tioglicolato y conservados a -20 °C para los análisis moleculares.

Extracción de ADN Bacteriano

Para la extracción de ADN bacteriano se utilizó 5 ml de cultivo en caldo tioglicolato. Se les centrifugó a 13000 rpm por 10 min, y el precipitado fue re-suspendido en 800 µl de EDTA 50 mM más 200 µl de lisozima. Se

mezcló suavemente, se incubó a baño maría a 37 °C durante 1-2 h y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El precipitado resultante fue utilizado para la extracción de ADN con el kit comercial "DNA Purification Kit" (Promega, Madison, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN extraído fue almacenado a -20 °C.

PCR Múltiple

Para determinar los genotipos y subtipos de los aislados de *C. perfringens*, se utilizó la técnica de PCR múltiple descrita por Baums *et al.* (2004) con algunas modificaciones: la mezcla de PCR múltiple consistió en 15 µM de los cebadores CPA5L y CPA5R, 9 µM de los cebadores CPBL y CPBR, 5.3 µM de los cebadores CPEL y CPER, 7.5 µM de los cebadores CPETXL y CPETXR, 7.5 µM de los cebadores CPIL y CPIR, 9 µM de los cebadores CPB2L y CPB2L, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris·Cl (pH 8.3), 1.5 mM de MgCl₂, 250 µM de cada dNTP, 3.8 U de *Taq* polimerasa (Promega, Madison, USA) y 50 ng de ADN bacteriano. La amplificación se hizo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems) a través de una desnaturalización inicial de 4 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 1.5 min a 72 °C, y finalmente una etapa de extensión de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio. Las bandas amplificadas fueron visualizadas y fotografiadas bajo iluminación UV. Para la estandarización de la técnica se utilizaron como controles positivos cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *C. perfringens* tipo A (CECT 563) y *C. perfringens* tipo C (CECT 820), mientras que *C. septicum* y *C. chauvoei* sirvieron como controles negativos.

Genotipificación y Subtipificación

La genotipificación de *C. perfringens* (tipos A, B, C, D, y E) se realizó en base a la presencia de los genes *cpa*, *cpb*, *etx* e *iap*, según la clasificación establecida por Petit *et*

Cuadro 1. Determinación de genotipos y subtipos de cepas de referencia (*Clostridium perfringens* CETC 563 y CECT 820) y controles negativos (*C. chauvoei* y *C. septicum*) según la presencia (+) y ausencia (-) de genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* y *cpb2*

Cepas de referencia	<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	Genotipo	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>	Subtipo
<i>C. perfringens</i> tipo A (CECT 563)	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻
<i>C. perfringens</i> tipo C (CECT 820)	+	+	-	-	C	-	-	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻
<i>C. chauvoei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. septicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 2. Frecuencias y porcentajes de los genotipos y subtipos de *C. perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia en el Perú (2005)

Genotipo		A	C				
Genes		<i>cpa</i>	<i>cpa</i> , <i>cpb</i>				
Aislados	N.º	46	1				
	%	97.9	2.1				
Subtipo		<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁺ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁺ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺
Aislados	N.º	33	--	13	--	1	--
	%	71.7	--	28.3	--	100.0	--

al. (1999). La subtipificación se realizó detectando la presencia de los genes *cpe* y *cpb2*, según lo descrito por Garmory *et al.* (2000).

RESULTADOS

Se logró aislar *C. perfringens* en las 47 muestras intestinales de crías muertas por enterotoxemia. Todos los aislados fueron positivos a la tinción Gram, presentaron una doble hemólisis, fueron catalasa negativa y, mayoritariamente (42/47), fueron positivas a la Reacción de Nagler.

Los resultados obtenidos por la PCR múltiple de las cepas de referencia de *C. perfringens* tipo A y C amplificaron genes correspondieron a los tipos A y C, respectivamente, mientras que las cepas de *C. chauvoei* y *C. septicum* no evidenciaron amplicones similares (Cuadro 1). La amplificación genética determinó que el 97.9% (46/47) de los aislamientos de *C. perfringens* fueron del genotipo A y el restante (2.1%) correspondió al genotipo C. El 71.7% (33/46) de los aislamientos de *C. perfringens* con genotipo A que no tenían los genes secundarios *cpe* y $\beta 2$ correspon-

dieron al subtipo *cpe*^{-vo}*cpb2*^{-vo} y el 28.3% (13/46) restante correspondió al subtipo *cpe*^{vo}*cpb2*^{+vo} (presencia del gen *cpb2*). El único *C. perfringens* genotipo C aislado presentó el gen de la enterotoxina (subtipo *cpe*^{+vo}*cpb2*^{-vo}) (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

La técnica de PCR múltiple permitió el geno y subtipificación de los 47 aislados de *C. perfringens* obtenidos de casos confirmados de enterotoxemia en neonatos de alpacas, evidenciando ser una herramienta de diagnóstico rápida y confiable (Petit *et al.*, 1999; Baums *et al.*, 2004), contrastando con el método de tipificación clásico de la prueba de seroneutralización *in vivo*, basada en la letalidad de ratones o por dermatonecrosis en cobayos. Estas ventajas han permitido a la PCR múltiple ser empleada en forma exitosa en este estudio y por otros investigadores interesados en elucidar la participación de las toxinas de *C. perfringens* en procesos entéricos en lechones (Kanakaraj *et al.*, 1998; Garmory *et al.*, 2000; Waters *et al.*, 2003), enteritis necrótica en pollos (Engstrom *et al.*, 2003; Gholamiandekhordi *et al.*, 2005), enterotoxemia en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001; Kalender *et al.*, 2005), enterotoxemia en ciervos (Embury-Hyatt *et al.*, 2005), tiflocolitis en caballos (Herholz *et al.*, 1999) y en intoxicación de origen alimentaria en humanos y diarreas asociadas a antibióticos en humanos (Sparks *et al.*, 2001).

El 97.9% de los aislamientos correspondieron al genotipo A, concordando con otros resultados (Moro, 1987; Ramírez, 1987), quienes mediante la seroneutralización determinaron al tipo A del *C. perfringens* como el principal agente causal de la enterotoxemia en alpacas. Los aislados pertenecientes al genotipo A y de acuerdo a la presencia de genes secundarios fueron agrupados en subtipos, siguiendo la clasificación propuesta por Garmory *et al.* (2000), determinando que el 71.7% fueron del subtipo *cpe*^{-vo}*cpb2*^{-vo}, es decir, cepas incapaces de producir

enterotoxina o toxina β_2 , mientras que los 13 restantes correspondieron al subtipo *cpe*^{vo}*cpb2*^{+vo}, con sólo la capacidad de producir la toxina β_2 .

En ninguno de los 46/47 aislados se logró amplificar el gen *cpe* productor de enterotoxina, sugiriendo que la enterotoxina de *C. perfringens* no participaría en el desarrollo de la enterotoxemia de las alpacas. Estos resultados son similares a otros estudios donde no se detectó la presencia del gen *cpe* en aislamientos de *C. perfringens* provenientes de alpacas con problemas entéricos (Garmory *et al.*, 2000; Bueschel *et al.*, 2003; Baums *et al.*, 2004; Ellis, 2006), e incluso asociados a casos de muertes súbitas (Sawires y Songer, 2006). La ausencia del gen *cpe* también ha sido demostrado en reportes de casos de enterotoxemia de terneros, cabras, venados y corderos (Manteca *et al.*, 2002; Dray, 2004; Embury-Hyatt *et al.*, 2005; Kalender *et al.*, 2005), así como en cuadros descritos como disentería hemorrágica en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001), enteritis necrótica en pollos (Engstrom *et al.*, 2003; Gholamiandekhordi *et al.*, 2005), enteritis necrótica en lechones (Kanakaraj *et al.*, 1998; Garmory *et al.*, 2000, Waters *et al.*, 2003) y tiflocolitis en caballos (Herholz *et al.*, 1999). La ausencia del gen *cpe* llama enormemente la atención, pues la enterotoxina fue siempre considerada como el principal factor de virulencia del *C. perfringens* en la patogénesis de la enterotoxemia en las alpacas (Ramírez, 1987), pese a que no se descartaron en dichos estudios la presencia de otras toxinas (toxinas y β_2).

Por otro lado, el efecto patogénico de la enterotoxina no encaja con los cuadros de enterotoxemia descritos en alpacas, pues la producción de esta toxina está frecuentemente asociada a problemas de intoxicación alimentaria que ocasionan diarreas profusas, esporádicas y autolimitantes en individuos inmunocompetentes (McClane, 2000; Sparks *et al.*, 2001). Los casos clásicos de enterotoxemia en alpacas raramente se observan o se asocian con diarreas y cuando

ocurren son generalmente a consecuencia de infecciones mixtas por *E. coli* (Ameghino y DeMartini, 1991).

La alta frecuencia de *C. perfringens* genotipo A subtipo *cpe*^{vo} y *cpb2*^{vo} (71.7%) tiende a señalar que solamente la presencia del gen *cpa* y su expresión (toxina α) sería suficiente para la producción de la enfermedad. Similares resultados fueron encontrados en estudios de genotipo y subtipificación de *C. perfringens* aislados de casos de enteritis necrótica en pollos y en cerdos (Kanakaraj *et al.*, 1998; Engstrom *et al.*, 2003; Gholamiandekhordi *et al.*, 2005; Kalender y Ertas, 2005), enterotoxemia en corderos y terneros (Songer, 1996; Dennison *et al.*, 2005; Kalender *et al.*, 2005) y gastroenteritis hemorrágica en perros (Songer, 1996).

Este trabajo reporta por primera vez en el Perú la presencia de *C. perfringens* genotipo A subtipo β 2-toxigénico aislados de casos de enterotoxemia de alpacas, evidenciando la posible participación de esta toxina en la etiopatogénesis de la enfermedad. Similares hallazgos han sido reportados por otros investigadores, quienes detectaron la presencia del gen *cpb2* en 18.6% (8/43) de los *C. perfringens* aislados de alpacas con problemas entéricos (Bueschel *et al.*, 2003).

La presencia del gen *cpb2* ha sido asociada con problemas entéricos en varias especies; por ejemplo, cerca del 90% de *C. perfringens* β 2 aislados en lechones se encuentran asociados con enteritis necrótica, mientras que en aislamientos de cerdos clínicamente sanos el gen *cpb2* no está presente o no ha sido detectado (Garmory *et al.*, 2000; Bueschel *et al.*, 2003). Similarmente, se reporta que el 50 a 75% de los aislamientos de *C. perfringens* β 2 de casos de tiflocolitis en potros (Herholz *et al.*, 1999; Garmory *et al.*, 2000), así como en cuadros de enterotoxemia en terneros, cabras y venados (Manteca *et al.*, 2002; Dray, 2004; Embury-Hyatt *et al.*, 2005) y disentería hemorrágica en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001) demuestran una posible asociación patológica con cepas *cpb2* positivas.

En el presente estudio, se aisló solamente una cepa (2.1%) perteneciente al genotipo C, corroborando la eventualidad de su presencia en casos patológicos (Moro, 1987). Curiosamente, este genotipo fue también el único subtipo enterotoxigénico (*cpe*^{vo}*cpb2*^{vo}). No se lograron aislar los genotipos B ni D como los descritos en Chile (Prehn *et al.*, 1999) y en EEUU (Fowler, 1998), respectivamente.

CONCLUSIONES

- El *C. perfringens* genotipo A y subtipo *cpe*^{vo}*cpb2*^{vo} (no enterotoxigénico ni β 2-toxigénico) es el genotipo y subtipo más prevalente en casos de enterotoxemia en alpacas.
- Se reporta por primera vez en el Perú, la presencia del gen *cpb2* y la casi ausencia del gen codificante de la enterotoxina.
- Los resultados apuntan básicamente a la toxina a y, posiblemente, a la toxina b2 como los principales factores de virulencia asociados en la enterotoxemia de las alpacas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los médicos veterinarios y criadores que participaron en la toma de muestras en los hatos alpaqueros localizados en la zona sur del Perú. El estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación (CONCYTEC) (Desarrollo de vacunas de nueva generación para prevenir enterotoxemia en alpacas), el Consejo Superior de Investigaciones de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (CSI-UNMSM), INCAGRO (Identificación y selección de marcadores moleculares de resistencia genética a enterotoxemia y neumonía en crías de alpacas) y CONOPA – Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos.

LITERATURA CITADA

1. **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. Bol Divul IVITA, Perú: 128 p.
2. **Baums CG, Schotte U, Amtsberg G, Goethe R. 2004.** Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol 100: 11-16.
3. **Bueschel DM, Jost BH, Billington SJ, Trinh HT, Songer JG. 2003.** Prevalence of *cpb2*, encoding beta 2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. Vet Microbiol 94: 121-129.
4. **Carbajal M. 1974.** Determinación de las causas de mortalidad en crías de alpaca en el departamento de Puno en las campañas ganaderas de 1972 y 1973. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ Nacional del Altiplano. 44 p.
5. **Dennison AC, Van Metre DC, Morley PS, Callan RJ, Plamplin EC, Ellis RP. 2005.** Comparison of the odds of isolation, genotypes, and *in vivo* production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. JAVMA 227: 132-138.
6. **Dray T. 2004.** *Clostridium perfringens* type A and β 2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. Can Vet J 45: 251-253.
7. **Ellis RP. 2006.** *Clostridium perfringens* enteritis. In: The complete alpaca book. 2nd ed. Hoffman E (ed). California: Bonny Doun Press. p 464-467.
8. **Embury-Hyatt CK, Wobeser G, Simko E, Woodbury MR. 2005.** Investigation of a syndrome of sudden death, splenomegaly, and small intestinal hemorrhage in farmed deer. Can Vet J 46: 702-708.
9. **Engström BE, Fermér C, Lindberg A, Saarinen E, Baverud V, Gunnarsson A. 2003.** Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. Vet Microbiol 94: 225-235.
10. **Fowler ME. 1998.** Medicine and surgery of South American camelids. 2nd ed. Iowa: Iowa State University Press. 549 p.
11. **Garmory HS, Chanter N, French NP, Bueschel D, Songer JG, Titball RW. 2000.** Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. Epidemiol Infect 124: 61-67.
12. **Gholamiandekhordi AR, Ducatelle R, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Immerseel FV. 2005.** Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. Vet Microbiol 113: 143-152.
13. **Gkiourtzidis K, Frey J, Bourtzis-Hatzopoulou E, Iliadis N, Sarris K. 2001.** PCR detection and prevalence of α -, β -, β 2-, σ -, $\bar{3}$ - and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. Vet Microbiol 82: 39-43.
14. **Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Popoff M, Gubert M, Gerber H, Straub R. 1999.** Prevalence of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. J Clin Microbiol 37: 358-361.
15. **Kalender H, Ertas HB, Ceninkaya B, Muz A, Aíslan N, Kilic A. 2005.** Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. Vet Med-Czech 50: 439-442.
16. **Kalender H, Ertas HB. 2005.** Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). Turk J Vet Anim Sci 29: 847-851.

17. **Kanakaraj R, Harris DL, Songer JG, Bosworth B. 1998.** Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and swine feed. *Vet Microbiol* 63: 29-38.
18. **Manteca C, Daube G, Jauniaux T, Linden A, Pirson V, Detilleux J, Ginter A, et al. 2002.** A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet Microbiol* 86: 191-202.
19. **McClane BA. 2000.** *Clostridium perfringens* enterotoxin and intestinal tight junctions. *Trends Microbiol* 8: 145-146.
20. **Moro M. 1966.** Enfermedades infecciosas de las alpacas. Enterotoxemia, diarrea bacilar producida por el *Clostridium welchii* tipo A. *Rev Fac Med Vet, UNMSM*.18-20: 85-87.
21. **Palacios C. 2004.** Caracterización anatomopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ Nacional Mayor de San Marcos. 164 p.
22. **Petit L, Gibert M, Popoff M. 1999.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 7: 104-110.
23. **Prehn N, Saez S, Arraigada M. 1999.** Estudios microbiológicos y clínicos de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* en camélidos sudamericanos. II Cong. Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú. p 140.
24. **Ramírez A, Huamán D, Ellis RP. 1985.** Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. INIPA y SR-CRSP. Reporte Técnico N.º 63. Lima. 17 p.
25. **Ramírez A. 1987.** Alpaca *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia: Purification and assays of the enterotoxin. PhD Thesis. USA: Colorado State University. 201 p.
26. **Sawires SY, Songer JG. 2006.** *Clostridium perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe* 12: 23-43.
27. **Songer JG, Meer RR. 1996.** Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe* 2: 197-203.
28. **Songer JG. 1996.** Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 9: 216-234.
29. **Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA. 2001.** Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J Clin Microbiol* 39: 883-888.
30. **Waters M, Savoie A, Garmory HS, Bueschel D, Popoff MR, Songer JG, Titball RW, et al. 2003.** Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal disease in piglets. *J Clin Microbiol* 41: 3584-3591.
31. **Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. 1997.** Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 35: 228-232.