

Rev Inv Vet Perú 2012; 23 (3): 299-306

## EFEECTO PROTECTOR DE UNA VACUNA POLIVALENTE ANTICLOSTRIDIAL SOBRE LA MORTALIDAD NEONATAL EN ALPACAS

### PROTECTIVE EFFECT OF A CLOSTRIDIUM POLYVALENT VACCINE ON NEONATAL MORTALITY IN ALPACAS

Raúl Rosadio A.<sup>1,2,4</sup>, Katherine Yaya L.<sup>2</sup>, Álvaro Véliz A.<sup>2</sup>, Teodoro Quispe<sup>3</sup>

#### RESUMEN

El estudio analiza el efecto beneficioso de una vacuna multivalente a base de componentes bacterianos y toxinas inactivadas (anacultivo) en la prevención de la enterotoxemia en alpacas. La vacuna múltiple, conteniendo mayoritariamente (60%) cepas de *Clostridium perfringens* tipos A y A $\beta$ 2, fue introducida en el año 2001 en una unidad de producción alpaquera en el distrito de Ñuñoa (Melgar, Puno) y utilizada durante seis años consecutivos. El efecto de la vacuna fue analizado comparando las tasas de mortalidad neonatal total y específica por enterotoxemia en el año 2000 con las mortalidades presentadas durante los seis años de vacunación (2001-2006). El estudio contempló vacunar a todas las hembras preñadas y a todas las crías en el primer año (2001) y solamente a las crías en los años siguientes; sin embargo, en el 2003 se vacunó solamente a las madres gestantes. La mortalidad se calculó en base a los reportes administrativos mensuales de mortalidad de crías preparados por el personal sanitario y veterinario responsable de la unidad de producción. Los diagnósticos causales de muertes fueron basados por observaciones de campo y en algunos casos confirmados por análisis de laboratorio. La introducción de la vacuna redujo la mortalidad total de 37.4% (año 2000, sin vacuna) a 25.2, 23.7, 9.4, 12.1, 15.1 y 14.3% en los años 2001 a 2006, y la mortalidad neonatal debido a enterotoxemia de 19.5% (año 2000, sin vacuna) a 7.2, 9.1, 1.0, 0.3, 2.1 y 3.9% para los años 2001 a 2006. El anacultivo (bacteria y exotoxinas inactivadas) polivalente redujo significativamente las tasas de mortalidad neonatal general y específica debido a enterotoxemia.

**Palabras clave:** enterotoxemia, vacuna clostridial, *Clostridium perfringens*, alpaca

#### ABSTRACT

This paper analyse the beneficial effect of a multivalent vaccine in reducing mortality rates due to enterotoxemia in alpaca crias. The programme was implemented in 2001 and ran for six consecutive years (2001-2006) in a cooperative farm in southern Peru (Ñuñoa, Puno) using a multiple anaculture (bacterine and toxoid) containing predominantly (60%)

<sup>1</sup> Unidad de Biología y Genética Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

<sup>2</sup> CONOPA – Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos, Lima

<sup>3</sup> Rural Alianza EPS, Puno

<sup>4</sup> E-mail: rrosadio@gmail.com

two subtypes of *Clostridium perfringens* (A and A $\beta$ 2). During these six years, different vaccination protocols were used including inoculating both mothers and crias in the first year and either mothers (2003) or only crias (2002, 2004-2006). The impact of the vaccination was evaluated by comparing total and specific neonatal mortality rates due to enterotoxemia relative to the same rates recorded for the year prior to initiation of the programme (2000). A reduction in total neonatal mortality was recorded from 33.4% in 2000 with no vaccination, to 25.2, 23.7, 9.4, 12.1, 15.1, and 14.3% in years 2001 to 2006. The vaccine equally reduced the mortality associated with enterotoxemia from 19.5% (2000) to 7.2, 9.1, 1.0, 0.3, 2.1, and 3.9% for 2001 through 2006. The polyvalent anaculture (bacterine and toxoid) significantly reduced total mortality rate as well as neonatal mortality rate due to enterotoxemia.

**Key words:** enterotoxemia, clostridial vaccine, *Clostridium perfringens*, alpaca

## INTRODUCCIÓN

La agroindustria de los camélidos sudamericanos es una actividad única e ideal para las condiciones de producción en las zonas altoandinas del Perú (Brenes *et al.*, 2001); sin embargo, el verdadero potencial productivo y económico de estas especies no se expresa a cabalidad, debido a múltiples factores, pero principalmente a los altos niveles de mortalidad neonatal ocasionados por enfermedades infecciosas (Ramírez, 1987; Ramírez y Ellis, 1988).

La enterotoxemia es la enfermedad de mayor impacto sanitario y económico en la producción alpaquera del Perú (Moro, 1987; Ramírez, 1989, 1990; Ameghino y DeMartini, 1991). La enterotoxemia, denominada también diarrea bacilar, es una infección aguda ocasionada por el *Clostridium perfringens*, afectando principalmente a crías entre la segunda y novena semana de edad (Ramírez *et al.*, 1985). El cuadro patológico es consecuencia de un cuadro infeccioso primario a nivel intestinal (yeyuno e íleon), que deriva posteriormente en una toxemia generalizada producto de las exotoxinas del *C. perfringens* tipo A o tipo A $\beta$ 2 (Pérez, 2006). Estas toxinas ocasionan daños irreversibles en el endotelio vascular y sistema nervioso que se traducen en manifestaciones clínicas intestinales y nerviosas de curso rápido que finali-

zan con la muerte súbita del animal (Novoa y Flores, 1991).

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

La prevención de la enterotoxemia en el Perú, se basa en el uso de adecuadas medidas de higiene y manejo y, sobre todo, en asegurarse que el neonato ingiera el calostro dentro de las primeras 12 horas de vida (Moro, 1987); sin embargo, estos programas preventivos raramente involucran el uso de vacunas (Ameghino y DeMartini, 1991). A pesar que inicialmente se ensayó una vacuna anticlostridial convencional para la prevención de la enfermedad en alpacas (Moro, 1987), el uso masivo de biológicos en el país fue dejado de lado debido, entre otras cosas,

a la aseveración de que la presentación de la enfermedad estaba principalmente asociada a la producción de una endotoxina (enterotoxina) durante la fase de esporulación del *C. perfringens* (Ramírez, 1987). Estudios moleculares recientes indican que la mayoría de *C. perfringens* aislados de casos fatales de la enfermedad poseen mayoritariamente genes codificantes de exotoxinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\beta_2$ ) y escasamente el gen de la enterotoxina (Pérez, 2006; Rosadio *et al.*, 2008). Los estudios de genotipificación sugieren la posibilidad de desarrollar y ensayar una vacuna multivalente inactivada a base de cepas clostridiales conteniendo productos bacterianos y exotoxinas (anacultivo) para el control de la enterotoxemia (Yaya y Rosadio, 2005).

Consecuentemente, el presente artículo extiende el análisis del efecto beneficioso de la vacuna convencional (bacterina y toxoide) multivalente ensayada por Yaya y Rosadio (2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

El trabajo se realizó en la unidad de producción Huaripiña de la Empresa de Propiedad Social Rural Alianza, en el distrito de Nuñoa (Melgar, Puno). Esta unidad de producción se ha dedicado a la crianza de alpacas por más de 20 años, manteniendo una población promedio cercana a 3 mil madres anuales manejadas durante la parición en majadas de 250-300 madres preñadas y controladas por un pastor quienes llevan registros de parición, morbilidad y mortalidad semanal. Asimismo, la empresa tenía antecedentes históricos de brotes cíclicos de enterotoxemia pero nunca había vacunado contra esta enfermedad.

### Vacuna

La vacuna aplicada fue diseñada en base a investigaciones realizadas por nues-

tro grupo de investigadores y preparada por un laboratorio comercial. Es una suspensión del *C. perfringens* y sus exotoxinas (anacultivo), inactivadas con formol y adsorbidas en hidróxido de aluminio. Inicialmente, la vacuna estuvo conformada por cepas aisladas de casos de enterotoxemia en ovinos (tipos A, B, C y D) más una cepa Tipo A (Cepa Moro) aislada de casos similares en alpacas. A partir de 2003, las cepas ovinas fueron remplazadas progresivamente por cepas patogénicas aisladas de alpacas. En el 2005, el 80% fueron cepas correspondientes a los tipos A,  $A\beta_2$  y C, manteniendo el 20% restante (cepas tipos B y D) de origen ovino. La vacuna fue mantenida en refrigeración y llevada a temperatura ambiental previa a la aplicación, evitando una exposición larga y directa a rayos solares. Todos los animales vacunados fueron monitoreados durante los primeros tres días postvacunación, buscando alteraciones locales en el sitio de inyección o manifestaciones clínicas generales, así como observando posibles presentaciones de abortos en las madres vacunadas.

### Programa de Vacunación

La evaluación del efecto de la vacuna fue diseñada buscando una “protección de ható” en la unidad experimental, tratando de mantener, por lo menos, el 80% de toda la población (madres y crías) vacunada. El programa de vacunación contempló, en el primer año, vacunar a todas las madres (dos dosis de 2.5 ml/dosis, vía s.c., observando como mínimo 3 semanas de intervalo entre dosis) y la totalidad de las crías (una dosis de 2.0 ml, vía s.c.) a partir de la campaña de parición de 2001 y continuar vacunando, por lo menos, por cinco años consecutivos. Sin embargo, el esquema empleado, y adoptado para las condiciones de manejo y administrativas de la empresa fue el siguiente: Todas las madres y crías fueron vacunadas el primer año (2001), solo las madres en el tercer año (2003) y solo las crías en el 2º, y 4º a 6º año (2002, 2004-2006). Se tuvo especial cuidado de administrar la segunda inoculación a las madres un mes antes del inicio de la cam-

paña de parición, tratando de vacunar a los animales en avanzado estado de gestación y dentro de 2-3 semanas antes del posible parto (observaciones directas del pastor). La vacunación de las crías se realizó progresivamente durante la campaña y generalmente en la segunda semana de vida (10-15 días de edad), identificando con un marcador de ganado a todo animal vacunado. Para facilitar el uso del biológico, se buscó administrar la vacuna en actividades rutinarias ganaderas sin alterar el manejo sanitario de la unidad experimental.

Para evaluar la efectividad de la vacuna se analizaron los reportes de causas de mortalidades, emitidos por los sanitarios o veterinarios de campo, donde semanalmente se anotan las ocurrencias de muerte. En esta rutina, los diagnósticos se sustentan en las principales alteraciones macroscópicas, que son registradas en los formatos que conforman los informes sanitarios administrativos. Los datos mensuales se compilan en informes anuales agrupándose las causas de muertes como infecciosas, orgánicas, muertos al nacer, etc., y específicas, citando a enterotoxemia, diarreas o colibacilosis, neumonías, etc. Para determinar el efecto protector de la vacuna se analizó la tasa de mortalidad anual total y la específica atribuida a enterotoxemia, tomándose la mortalidad del año previo a la vacunación (2000) como referencia para las mortalidades ocurridas durante los seis años de vacunación (2001-2006).

### Datos Meteorológicos

Para evaluar la posible influencia de factores ambientales sobre el efecto de la vacuna en la prevención de la enterotoxemia, se recolectaron datos climatológicos (precipitación pluvial, temperatura y humedad relativa) en la estación meteorológica de Chuquibambilla (70°43'W, 14°47'S, 3971 msnm), único punto geográfico monitoreado por el SENAMHI (Servicio Nacional de

Meteorología e Hidrología del Perú) más cercano (50 km) a la unidad de producción bajo estudio.

### Diagnóstico de Laboratorio

Durante los primeros tres años, se tomaron muestras de intestino de un total de 50 crías sospechosas de haber muerto por enterotoxemia. Las muestras fueron remitidas para la identificación, aislamiento y tipificación bacterial a la Unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Los contenidos intestinales fueron sembrados en cultivos líquidos (caldo carne) y sólidos (agar sangre) e incubados bajo condiciones anaeróbicas. Las cepas aisladas fueron, en los dos primeros años, serotipificadas mediante la seroneutralización biológica e inoculando sobrenadantes resultantes de la centrifugación de soluciones conteniendo cepas de *C. perfringens* de ratones tratados y no tratados con sueros antitoxinas de los principales tipos de Clostridium siguiendo protocolos descritos (Sterne y Batty, 1978; Yaya, 2003). Posteriormente, las cepas clostridiales fueron confirmadas molecularmente, mediante la técnica de PCR múltiple, para detectar genes codificantes de las toxinas mayores ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\tau$ ) y secundarias (cpe y  $\beta_2$ ), e identificar la correcta geno y subtipificación del aislado (Petit *et al.*, 1999; Pérez, 2006).

### Análisis de Datos

Se determinó las tasas de mortalidad neonatal total y por enterotoxemia, utilizando la fórmula de prevalencia con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Para evaluar el efecto de la vacuna, se utilizó la diferencia estadística de proporciones utilizando el paquete estadístico SPSS 17.0. Para observar la posible influencia de tres factores climatológicos (precipitación pluvial, temperatura y humedad relativa), se utilizó el análisis de varianza de una sola vía.

Cuadro 1. Mortalidad neonatal total y específica por enterotoxemia en una empresa alpaquera del departamento de Puno, Perú, donde se aplicó una vacuna anticlostridial durante los años 2001-2006

Años	Crías nacidas (n)	Mortalidad total		Mortalidad por enterotoxemia	
		%	IC <sup>1</sup>	%	IC <sup>1</sup>
2000 <sup>2</sup>	3,224	37.4	35.73- 39.07	19.5	17.26 – 21.74
2001 <sup>3</sup>	2,952	25.2	23.63 - 26.77	7.2	5.39 – 9.06
2002 <sup>4</sup>	2,647	23.7	22.08 – 25.32	9.1	6.85 – 11.35
2003 <sup>5</sup>	2,760	9.4	8.31 – 10.49	1.0	-0.21 – 2.21
2004 <sup>4</sup>	2,600	12.1	10.85 – 13.35	0.3	-0.29 – 0.91
2005 <sup>5</sup>	2,470	15.1	13.69 – 16.51	2.1	0.64 – 3.56
2006 <sup>5</sup>	2,326	14.3	12.88 – 15.72	3.9	1.82 – 5.98

<sup>1</sup> Intervalo de confianza al 95%

<sup>2</sup> Año sin vacunación

<sup>3</sup> Se vacunó a las madres y a las crías

<sup>4</sup> Se vacunó únicamente a las crías

<sup>5</sup> Se vacunó únicamente a las madres

## RESULTADOS

La aplicación de la vacuna produjo ligeras reacciones inflamatorias (mayormente eritema) en el lugar de inoculación sin producir reacciones generales indeseables, ni incrementar las tasas de abortos (aproximadamente 1.2%) durante las seis campañas de parición (2001-2006).

El uso de la vacuna redujo las tasas de mortalidad total y específica por enterotoxemia (Cuadro 1) durante las campañas de parición. La tasa de mortalidad por enterotoxemia disminuyó de 19.5% en el año que no se vacunó (2000, año base para efectos de comparación) hasta niveles de 7.2% en el primer año de vacunación y de 0.3% en el cuarto año.

Los resultados muestran una notable diferencia biológica y estadística en las tasas de mortalidad total y mortalidad específica por enterotoxemia por efecto de la vacunación ( $p < 0.05$ ), principalmente a partir del año 2003. Asimismo, el análisis de varianza de una sola vía determinó la existencia de homogeneidad estadística entre los valores de precipitación pluvial (123.1-145.3 mm), temperatura media (8.4-9.5 °C) y humedad relativa (69.0-80.0%) durante las siete campañas de parición evaluadas en este estudio.

Todas las muestras analizadas fueron positivas a *C. perfringens*. Estas cepas fueron patogénicas para animales de laboratorio (ratones) y en el análisis molecular evidenciaron mayoritariamente (99%) tener genes *cpa* codificante de la toxina  $\alpha$  (tipo A); además, algunas (8%) tenían la toxina nobel  $\beta 2$  (tipo A $\beta 2$ ) (Rosadio *et al.*, 2010).

## DISCUSIÓN

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

La evaluación de la vacuna, inicialmente realizada a los tres años después de su introducción (Yaya y Rosadio, 2005), fue extendida hasta el sexto año, pues la enfermedad usualmente se presenta en brotes epizooticos cada 4-5 años (Ramírez, 1990). Debe mencionarse que durante los seis años de evaluación ocurrieron, por lo menos, dos brotes de enterotoxemia en los años 2006 y 2007 en áreas colindantes y aún en la misma empresa (D. Pérez, comunicación personal), y esto tal vez explique el incremento no significativo de las tasas de mortalidad total y específica observada en la unidad de producción vacunada durante los dos últimos años (2005 y 2006).

Los resultados de esta evaluación permiten inferir que la vacuna convencional (anacultivo) anticlostridial, controla eficientemente la enterotoxemia en alpacas neonatas. Sin embargo, la reducción de la mortalidad neonatal debido a enterotoxemia fue relevante cuando la vacuna fue aplicada a madres gestantes (años 2001 y 2003) (Cuadro 1). Todo programa ideal de vacunación contra la enterotoxemia debe asegurar que las madres gestantes primerizas reciban las

dos dosis de vacuna, y que la segunda dosis sea administrada 2-3 semanas antes de la fecha probable de parición para asegurar la cantidad y calidad de anticuerpos maternos que se transmitirá a las crías mediante el calostro (Tizard, 2002). Una vez introducida la vacuna y para mantener el programa, las futuras madres deben ser revacunadas con una sola dosis y siempre en fechas cercanas a la posible fecha de la parición. La aplicación de la vacuna a animales gestantes no produjo alteraciones sistémicas en los animales vacunados ni incrementaron la tasa de abortos aliviando el temor de los criadores de una posible asociación abortigénica y aplicación vacunal en madres gestantes.

El programa de vacunación, en la unidad de producción, contempló inicialmente inyectar a madres y crías, pero debido a las dificultades de manejo administrativo en el campo solamente se vacunaron a las crías en 4 de los 6 años evaluados (el primer año se vacunaron madres y crías y en el 2003 sólo se vacunó a las madres). A pesar de estas limitaciones, los resultados sugieren que en condiciones de campo y una vez introducida la vacuna, bastaría con vacunar a las nuevas poblaciones neonatales para mantener las tasas de coberturas de vacunaciones deseadas y buen grado de protección contra la enfermedad en toda explotación alpaquera.

Las bondades de la vacuna convencional (anacultivo) en el control de infecciones clostridiales no es ninguna novedad, pues estos tipos de vacunas son excelentes biológicos ampliamente usados en la protección contra el complejo enterotoxigénico en las explotaciones ovejeras en muchos países, incluyendo el Perú (Rosadio y Ameghino, 1999). Es muy posible que el mantenimiento de coberturas de vacunaciones superiores al 80%, simularían la denominada “inmunidad masal” adecuada para controlar similares infecciones patogénicas (Tizard, 2002) y habría contribuido en forma importante en la disminución de las tasas de mortalidad por enterotoxemia en la unidad en estudio.

Los resultados del aislamiento y análisis molecular de las cepas de *C. perfringens* corroboran que la patogenicidad clostridial involucra principalmente a la acción de exotoxinas mayores ( $\alpha$  y  $\beta$ 2), descartando indirectamente el rol principal atribuido a la endotoxina (enterotoxina) en la patogenia de la enterotoxemia (Rosadio *et al.*, 2010). Asimismo, el análisis de los parámetros climáticos indicó que fueron constantes, y por lo tanto, no influyeron sobre las tasas de mortalidad.

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

## CONCLUSIONES

El anacultivo (bacteria y exotoxinas inactivadas) polivalente reduce significativamente los índices de mortalidad neonatal general y específica debido a enterotoxemia.

## LITERATURA CITADA

1. **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. Bol Divul IVITA. p 71-80.
2. **Brenes E, Madrigal K, Perez F, Valladares K. 2001.** El clúster de los camélidos en Perú: Diagnóstico competitivo y recomendaciones estratégicas. [Internet]. Disponible en: <http://www.caf.com/attach/4/default/CamelidosPeru.pdf>
3. **Moro M. 1987.** Enfermedades infecciosas de las alpacas. Rev Camélidos Sudam 4: 7- 31.
4. **Novoa C, Flores A. 1991.** Producción de rumiantes menores: alpacas. Lima: RERUMEN. 311 p.
5. **Ortiz S. 1988.** Evaluación de algunos métodos de control de la mortalidad en crías de alpaca (*Lama pacos*) en explotaciones familiares. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 58 p.
6. **Pérez D. 2006.** Genotipificación y subtipificación de cepas de *Clostridium perfringens* de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 91 p.
7. **Petit L, Gilbert M, Popoff M. 1999.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol 7: 104-110.
8. **Ramírez A. 1987.** Alpaca *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia: purification and assays of the enterotoxin. PhD Thesis. USA: Colorado State University. 201 p.
9. **Ramírez A. 1989.** Enfermedades infecciosas en camélidos sudamericanos. XII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima: APPA. p 85-105.
10. **Ramírez A. 1990.** Avances sobre investigación en salud animal – Camélidos sudamericanos. Bol Div IVITA 23: 11-19.
11. **Ramírez A, Ellis R. 1988.** Nuevos conceptos sobre la enterotoxemia y la colibacilosis en alpacas. Rev Camélidos Sudam 6: 9-14.
12. **Ramírez A, Huamán D, Ellis R. 1985.** Enterotoxemia de la alpaca. Reporte Técnico N.º 63. Lima: INIPA y SR-CRSP. 56 p.
13. **Rosadio R, Ameghino E. 1999.** Enfermedades de los ovinos en el Perú. Publ Téc FMV-UNMSM Vol 40. 81 p.
14. **Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L. 2010.** *Eimeria*

- macusaniensis* associated lesions in neonatos alpacas dying from enteroxemia. *Vet Parasitol* 168: 116-120.
15. **Sterne M, Batty I. 1978.** Clostridios patógenos. Zaragoza: Acribia. 167 p.
16. **Tizzard I. 2002.** Inmunología veterinaria. 6° ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 517 p.
17. **Yaya K, Rosadio R. 2005.** Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. *Rev Inv Vet, Perú* 16: 49-55.
18. **Yaya K. 2003.** Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 35 p.