

4. RESULTADOS

4.1. Población muestreada.

En la descripción demo--geográfica del aprisco, se registraron datos según el formulario de la Tabla 4, donde se consignaron datos del animal, de la granja y de la muestra.

En la recopilación de la información se reportó:

Fecha de iniciación : 5-II-1975

Fecha de terminación: 10-VII-1975

Intervalo entre los diferentes muestreos: 30 días

No. de formularios procesados : 600

Hacienda : Granja San Jorge ICA

Municipio : Soacha

Departamento : Cundinamarca

Altura : 3.000 m (s.n.m.)

Precipitación : 725.7 m.m. anual

Tipos de explotación : mixta (agrícola y ganadera)

Población animal : 5-II-1975 ; 1150 cabezas de ovinos

10-VII-1975; 1360 cabezas de ovinos

Razas ovinas existentes : Corriedale, Criollo, Rambouillet, Romney March Mestizo,
Romney Marsh Puro

Edad promedio : Primera toma: 2.52; Mediana: 3 días

Sexta toma : 5 meses

Sexo : Hembras 62; Machos 38

Peso : Promedio primera toma 3.6 kg

Promedio sexta toma 19.7 kg

Número de registro : De acuerdo con la raza

Estado de carnes : Bueno = 2, Regular = 1, Malo = 0, Promedio 1.73

Sistema de pastoreo : semi-intensivo

Rotación de poteros : Sí, continua

Tipo de pastos : kikuyo, Ray grass inglés , Ray grass italiano, Orchoro, Triguillo,
Trébol blanco.

Concentrados : No

Sales Minerales : Sí, a libre disposición

Vacunaciones : No

Tratamientos recibidos: Medicamentos antiparasitarios; Derabación; tratamientos con desinfectantes para curación de ombligo. Los datos correspondientes a la muestra en sí, se relacionan posteriormente.

La mortalidad durante el muestreo fue del 3% de los animales seleccionados, los que fueron reemplazados por animales de la misma raza y edad.

En el aprisco engeneral, la mortalidad fue del 2%.

El destete se hizo en promedio a los 120 días.

En la Tabla 5 se mostró ya la distribución por raza y sexo de los 100 ovinos infantiles seleccionados para establecer la prevalencia y cuantificación de C. perfringens en heces.

La muestra por simple azar resultó ser particularmente ricas en hembras (62 VS 38%) con una distribución interna en razas adecuadamente similar (Tabla 5).

En el análisis estadístico de tipo discriminatorio (3) de la población muestreada, la cual fue seguida en el tiempo y tenía la característica de haber nacido durante la misma semana, se presentaron datos particularmente homogéneos, que encajan en la definición en un estudio longituditudinal-cohorte. Es de anotar que el término longitudinal, se refiere al modelo hipotético mientras que el término cohorte se refiere en sí al diseño.

La homogeneidad fue "ensayada" indirectamente por medio del análisis discriminatorio por pasos en las variables demográficas.

Al correr en el programa BMD 07 M (15) el sexo como variable clasificatoria, con respecto al resto de las variables demográficas (edad, raza, peso promedio, incremento de peso, peso inicial, peso final y estado de carnes) se encontró que el riesgo de clasificación correcta fue de 1.53; el chi-cuadrado fue de 1.03

($0.30 < p < 0.40$) y la habilidad clasificatoria fue de 62.90% para machos y 47.38% para hembras. Es decir que la habilidad clasificatoria de las variables demográficas con respecto a sexo fue no significativa, ya que por simple azar se esperarían clasificaciones del orden del 50% (2 sexos, 100 muestras). Por lo tanto los animales de sexo distinto no diferían significativamente en las otras variables. La muestra entonces fue homogénea y los cálculos se presentan en la Tabla 9.

Al estudiar por separado cada una de las variables demográficas con respecto al sexo se encontró lo siguiente: La raza no mostró habilidad discriminatoria alguna (habilidad clasificatoria 53.22% y 52.63%; riesgo relativo 1.26; chi-cuadrado 0.32; $0.40 < p < 0.50$; Tabla 10), mientras que el peso sí indicó un pequeño discriminatorio (habilidad discriminatoria 54.83% y 63.15%; riesgo relativo 2.08; chi-cuadrado 3.05; $0.10 < p < 0.25$; Tabla 11).

Para el estudio del peso se incluyeron los tres tipos de datos obtenidos: peso inicial, peso final e incremento de peso, los tres valores evidente y significativamente ($p < 0.05$) mayores para los machos (Tabla 12). Tal diferencia puede ser la razón para la diferencia bacteriológica entre machos y hembras según se verá más adelante. El gráfico del análisis por computador de la discriminación del peso con respecto al sexo se muestra en la Figura 11.

Se presentan los datos de media y desviación estandar únicamente para el

TABLA 9. Capacidad de clasificación de las variables demográficas con respecto a sexo, en 100 infantes ovinos estudiados para C. perfringens.

		Clasificados		Habilidad Clasificatoria	
		Hembras	Machos		
Muestreados	Hembras	39	23	62	62.90%
	Machos	20	18	38	47.36%
		50	41	100	

$$R.R = \frac{a \times d}{b \times c} = \frac{39 \times 18}{20 \times 23} = 1.5260$$

$$\chi^2_{GL} = \frac{(a \times d - b \times c)^2 \times N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

$$\chi^2_{1*} = \frac{(702 - 460)^2 \cdot 100}{(62)(39)(59)(41)} = 1.02758$$

$$0.30 < p < 0.40$$

* Grados de libertad = (columnas-1) (filas - 1) = (2-1) (2-1) = 1

TABLA 10. Capacidad de clasificación de la raza con respecto a sexo, en 100
infantes ovinos estudiados para C. perfringens.

		Clasificados		Habilidad Clasificatoria	
		Hembras	Machos		
M u e s t r e a d o s	Hembras	33	29	62	53.22%
	Machos	18	20	38	52.63%
		51	49	100	

$$R.R.* = \frac{33 \times 20}{18 \times 29} = \frac{660}{522} = 1.2643$$

$$\chi_{1*}^{2*} = \frac{(660 - 522)^2}{(62)(38)(51)(49)} \cdot 100 = 0.32345$$

$$0.40 < p < 0.50$$

* Ver Tabla 9.

TABLA 11. Capacidad de clasificación del peso (promedio e incremento en seis mediciones) con respecto al sexo, en 100 infantes ovinos estudiados para C. perfringens.

		Clasificados		Habilidad Clasificatoria	
		Hembras	Machos		
M u e s t r e a d o s	Hembras	34	28	62	54.83%
	Machos	14	24	38	63.15%
		48	52	100	

$$R.R^* = \frac{34 \times 24}{14 \times 28} = \frac{816}{392} = 2.0816$$

$$\chi_{1^*}^{2*} = \frac{(816 - 392)^2 100}{(62)(38)(48)(52)} = 3.0571$$

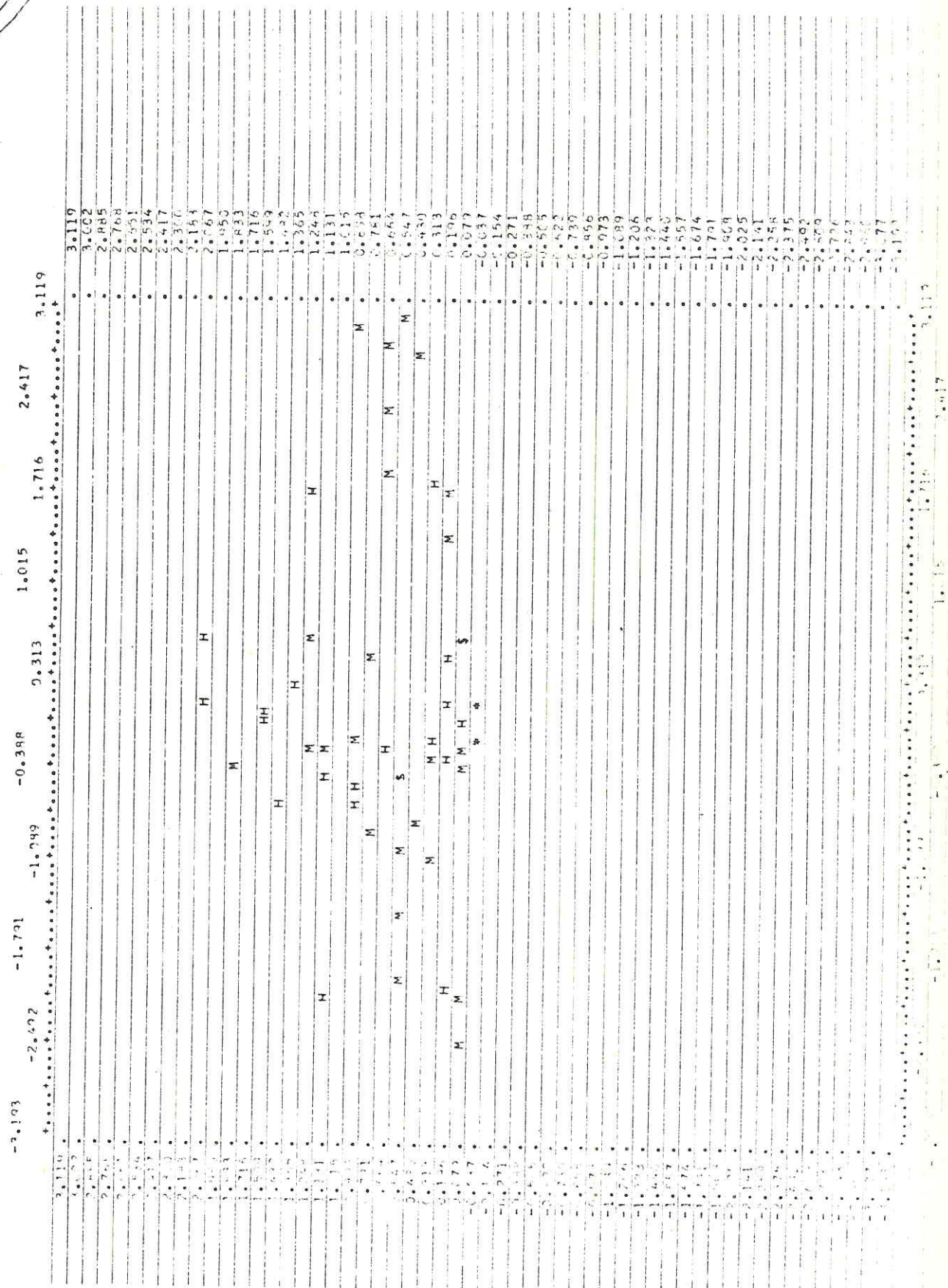
$$0.10 < p < 0.25$$

* Ver Tabla 9

TABLA 12 . Parámetros de Discriminación del peso (inicial, final e incremento) con respecto a sexo.

Variable	Media de las Discriminaciones		Desviación estandar de las discriminaciones	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Peso inicial	3.60483	3.85263	0.76831	0.87294
Peso final	19.48061	20.14209	4.27596	3.53359
Incremento de peso	15.87574	16.28940	3.73344	3.10482

FIGURA 11. Gráfico discriminatorio de la variable peso con respecto a sexo. La variable canónico No. 1 aparece en la abcisa, la No.2 en la ordenada (M = machos; H = hembras).



peso en que fueron medidas de valor real. Sexo (machos 1, hembras 2) y raza (código numérico) fueron valores convencionales ("variables maniquí") sin valor aplicativo alguno.

El gráfico discriminatorio trazado por el computador para todas las variables demográficas se muestra en la Figura 12.

Cuando se utilizó el análisis discriminatorio para las variables bacteriológicas (recuentos de esporos de C. perfringens), si hubo una significancia estadística entre los dos sexos (habilidad clasificatoria 87.09% y 63.15%; riesgo relativo 3.11; chi-cuadrado 5.14; $0.025 < p < 0.05$; Tabla 13). Por lo tanto los infantes ovinos muestreados, tenían diferentes recuentos de C. perfringens en sus heces según el sexo. El gráfico discriminatorio obtenido por el computador se muestra en la Figura 13).

Al mirar los parámetros de tendencia central para los dos sexos en la Tabla 14, se observó que la diferencia fue debida primordialmente al primer muestreo, en el que hubo una marcada diferencia tanto en cuanto a prevalencia (20% para la primera muestra VS 100% para todos los demás) como a la magnitud de los recuentos de C. perfringens.

La habilidad discriminatoria de los (\log_{10}) recuentos de esporos de C. perfringens, también se analizaron con respecto a raza (Tabla 15). Fue particular-

FIGURA 12. Gráfico discriminatorio de las variables demográficas con respecto a sexo. La variable canónica No.1 aparece en la abscisa, la No.2 en la ordenada.

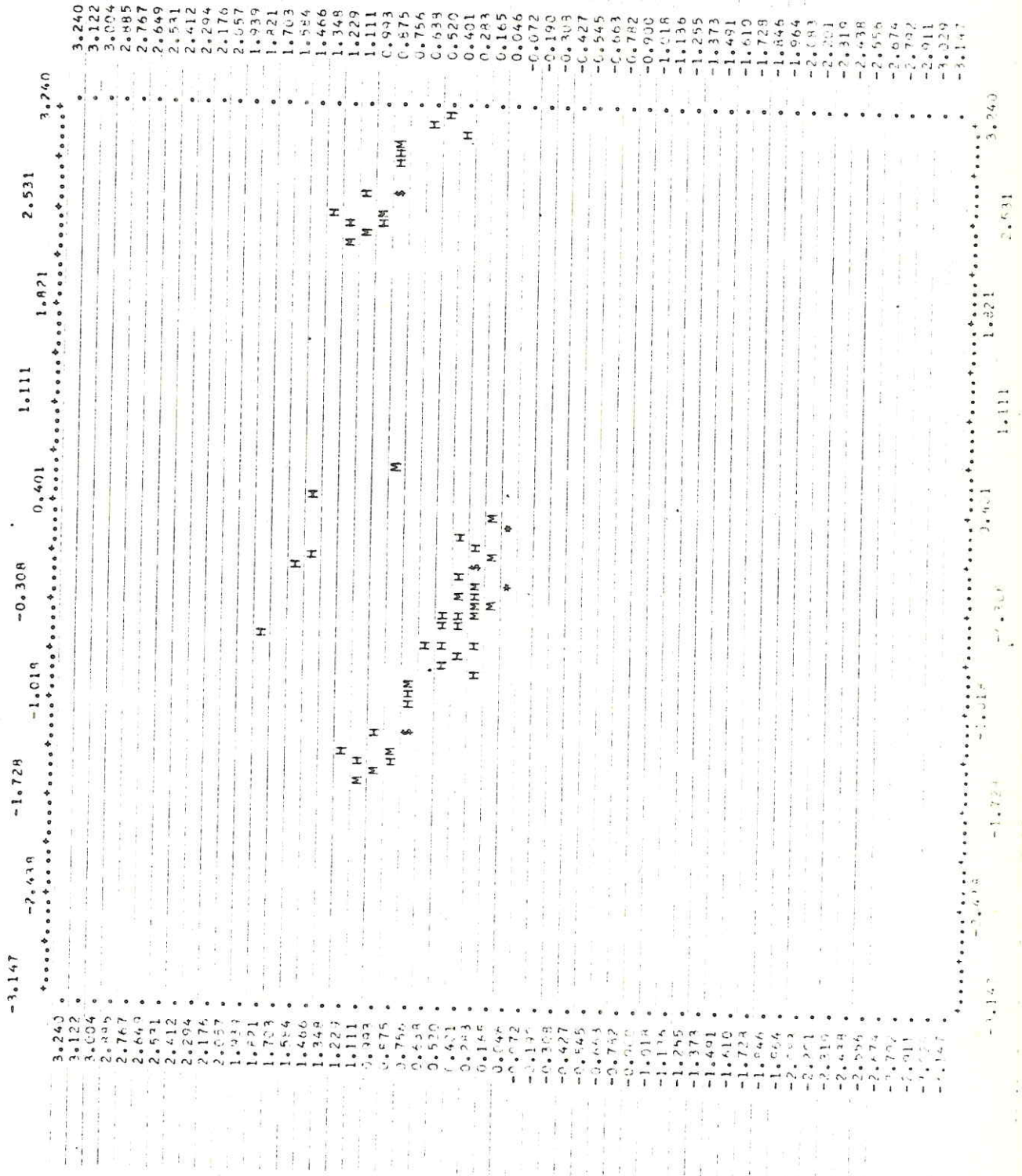


TABLA 13. Capacidad de clasificación de las variables bacteriológicas (C. perfringens en heces) con respecto a sexo, en 100 infantes ovinos estudiados.

		Clasificados		Habilidad Clasificatoria	
		Hembras	Machos		
Muestrados	Hembras	54	8	62	63.15%
	Machos	26	12	38	87.09%
		80	20	100	

$$RR^* = \frac{54 \times 12}{26 \times 8} = \frac{648}{208} = 3.115$$

$$\chi_{1^*}^{2*} = \frac{(648 - 208)^2 \cdot 100}{(62)(38)(20)(80)} = 5.1358$$

$$0.025 < P < 0.05$$

* Ver Tabla 9

FIGURA 13. Gráfico discriminatorio de las variables bacteriológicas (Log₁₀ esporos de *C. perfringens* por gramo de heces) VS. sexo (M = machos; H = hembras). La variable canónica No.1 aparece en la abcisa, la No. 2 en la ordenada.

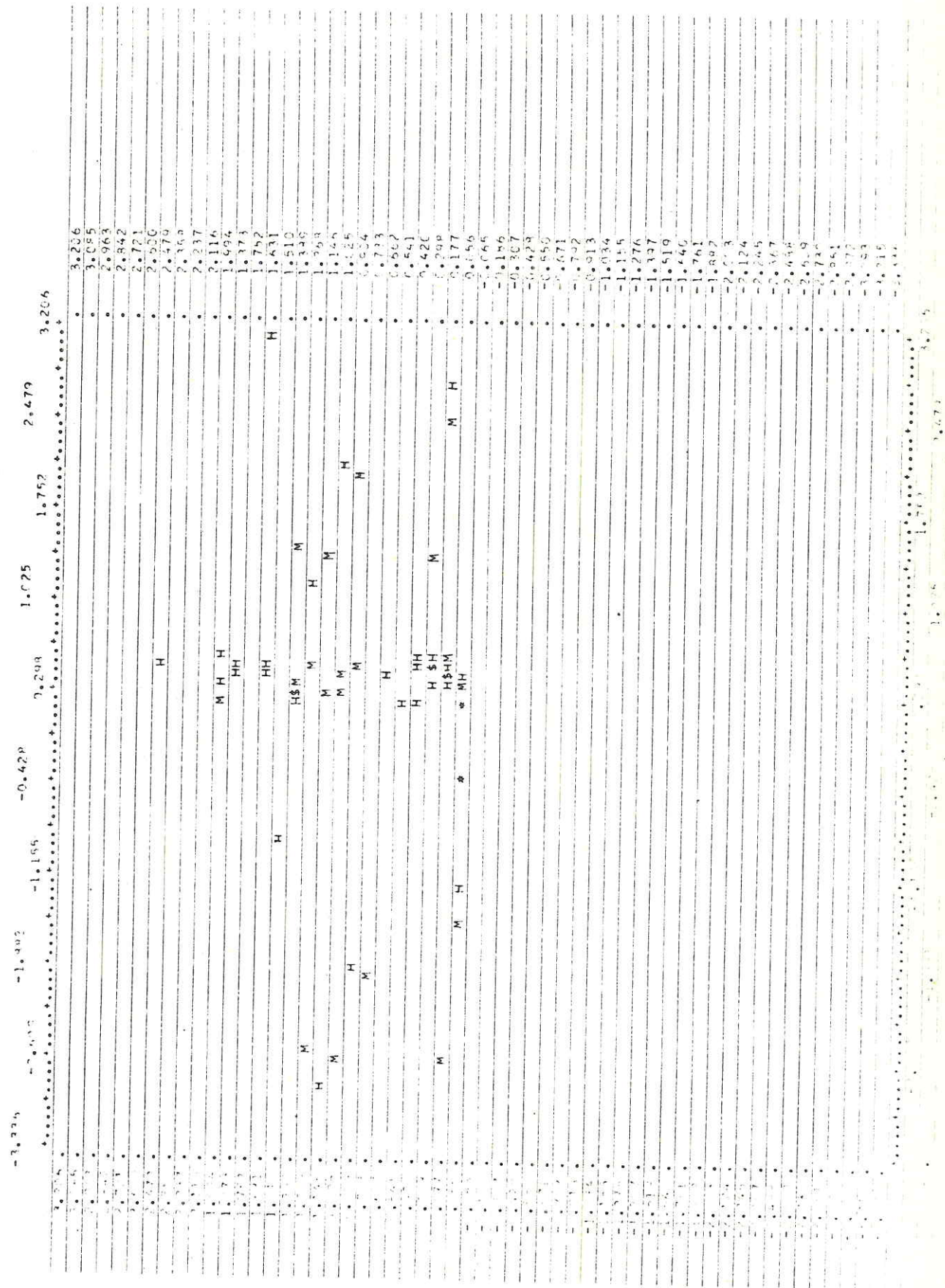


TABLA 14 . Parámetros de Discriminación de las variables Bacteriológicas
(*C. perfringens* en heces) con respecto a sexo.

Variable	Media (log 10) de las discriminaciones		Desviación standar (log 10) de las discriminaciones	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
1	0.19778	0.55921	0.54408	0.34598
2	1.42623	1.41229	0.54286	0.35376
3	1.91362	1.92156	0.39644	0.44949
4	2.19164	2.16695	0.34865	0.43599
5	2.26302	2.22342	0.50976	0.50918
6	2.38150	2.44549	0.47618	0.42514

TABLA 15. Capacidad de clasificación de los recuentos de esporos de C. perfringens con respecto a razas de ovinos.

	C l a s i f i c a d o s					Total	Habilidad Clasific. %
	Rambouillet	Corriedalle	Romney Marsh Puro	Romney Marsh Mestizo	Criollo		
M	5	0	1	0	1	5/7	71.42
u	2	6	5	3	2	6/18	33.33
e	4	3	12	5	0	12/24	50.50
t	4	4	7	13	9	13/37	35.13
r							
e	4	4	7	13	9	13/37	35.13
a							
d							
o	0	0	1	1	12	12/14	85.71
s							

mente exitosa la clasificación, y con una población suficientemente grande en el caso de los ovinos criollos, los cuales dieron generalmente recuentos menores (Tabla 16).

4.2. Caracterización e Identificación de C. perfringens.

Los resultados de los casos (animal-cultivo) que presentaron colonias en MBP, H₂S positivo, lecitinasa positivo, se presentan en la Tabla 17, para cada uno de los muestreos.

En el primer muestreo, se presentó un 20% de casos que reaccionaron positivamente en el medio MBP.

Del 80% de los casos que fueron sembrados en el medio MBP, y no presentaron ningún tipo de crecimiento bacteriano en el medio, un 23% correspondió a casos de animales menores de un día. El material procesado a partir de estos animales, correspondió al tapón digestivo.

Relacionando el primer muestreo con los cinco muestreos posteriores, se presenta un porcentaje bajo de casos presuntivos a C. perfringens en el primer muestreo, mientras que en el muestreo segundo llegó a 96% y en los muestreos 3, 4, 5 y 6, la prevalencia de casos presuntivos de C. perfringens, llegó siempre a 100% éste último dato tiene mayor valor al corresponder a diluciones y consecuentemente

TABLA 16. Parámetros de discriminación de las variables bacteriológicas (*C. perfringens* en heces) con respecto a razas de ovinos.

Muestra No.	Rambouillet	Media (Log_{10}) de las discriminaciones					
		Corriedalle	Romney Marsh			Criollo	
			Puro	Mestizo			
1	0.74253	0.74640	0.19093	0.27830	0.0		
2	1.48545	1.46945	1.38062	1.43909	1.34742		
3	1.73250	1.89429	2.06292	1.90871	1.80763		
4	1.80618	2.12914	1.96455	2.33178	2.41664		
5	1.91438	2.25832	2.21411	2.32886	2.24577		
6	2.32966	2.53448	2.55664	2.41710	1.99008		
1	0.94615	0.86979	0.53812	0.67342	0.0		
2	0.31877	0.58663	0.39884	0.50727	0.48285		
3	0.54825	0.40284	0.42549	0.38430	0.40120		
4	0.31416	0.32657	0.42214	0.31884	0.20080		
5	0.54071	0.43738	0.47344	0.53130	0.56202		
6	0.35163	0.39040	0.35245	0.51389	0.35188		

Desviación estandar (Log_{10}) de las discriminaciones

TABLA 17. Resultado de las pruebas presuntiva en Medio Básico Perfringens + Yema de Huevo y confirmativa en Lactosa Motilidad Nitrato, en los diferentes recuentos.

Muestreo No.	Lecitinas			M B P			NC*	Dilución sem- brada en M B P	L M N Lactosa (AC +, A +) Motilidad (-), Nitrato (to-)**
	+	-	+	H ₂ S					
				-	+	-			
1	20/100		20/100	-			80/100	1:5	15/20
2	96/100		4/100	100/100	-		-	1:5	77/100
3	97/100		3/100	100/100	-		-	1:10	80/100
4	100/100		100/100	-			-	1:10	76/100
5	100/100		100/100	-			-	1:10	75/100
6	100/100		100/100	-			-	1:10	81/100

* No crecimiento.

** Realizado solamente en L (AC+, Gas +) y M (-) en LMN.

a recuentos dos veces mayores.

De los 600 casos sembrados en el medio MBP, 80 (13,33%) no crecieron en dicho medio.

A partir de 520 casos (86.66%) crecidas en el medio MBP, se realizaron sub-cultivos de colonias en el medio LMN. En éste medio se presentaron crecimientos en difusión (motilidad) y reacción de la lactosa positivo (ácido) en número de 116 (22.30%), según la Tabla 18.

Al realizar un pasaje de las cepas que presentaron crecimiento en difusión en el medio LMN, al medio ASO, se observó que 48 cepas (41.37%) presentaron hemólisis alfa y 68 cepas (58.62%) presentaron hemólisis γ (no hemólisis).

El 22.30% de las cepas que presentaron H_2S positivo/lecitinasa positiva, pero de precipitación tenue, no eran ya compatibles en el medio MBP con cepas de C. perfringens, y por lo tanto fueron descartados. El 77.7% en cambio, presentaron en el medio ASO, hemólisis alfa y beta, característica esencial de C. perfringens.

A la prueba de reducción de los Nitratos o Nitritos, de las 404 cepas aisladas de C. perfringens, solamente 207 (51.23%) presentaron reacción positiva en el medio LMN (Tabla 18).

Para confirmar la reacción de los Nitratos/Nitritos se sembraron las 197 ce-

TABLA 18 Resultados de la caracterización de cepas de C. perfringens en medio LMV

Muestreo No	Lactosa		Motilidad negativo	%Conf		Nitratos* Positivo	% Conf		
	AG+G+	AC+		L	M		L	M	N
1	15	5	15/20	75		7/15	46,6		
2	77	23	77/100	77		47/77	61,0		
3	80	20	80/100	80		36/80	45,0		
4	76	26	76/100	76		40/76	52,6		
5	75	25	75/100	75		36/75	48,0		
6	81	19	81/100	81		41/81	50,6		
	-	-	-	77,3		-	50,6		

* Realizado solamente en L (AC + , G +) y Motilidad (-) .

pas (48,77%) en el medio AN; a partir del medio LMN fue tomado del fondo del tubo, material con pipeta Pasteur y pasado a medio AN y se incubó en anaerobiosis a 37 C por 24 horas.

Presentaron reacción positiva a Nitratos 181(91.87%) y 16(8.13%) conservaron su reacción negativa.

El estudio de las características individuales de las colonias que crecieron en el medio MBP, y su relación con el grado de hemólisis en el medio ASO, se hizo según el diseño que se muestra en la Tabla 19.

En el medio MBP, se presentaron diferentes precipitaciones de lecitinasa, en cuanto al tamaño del halo como el grado de precipitación. Se observaron colonias, que no alteraron la lecitina presente en el medio y por lo tanto no la precipitaron. También se observaron diferentes tamaños de puntos de reducción de los sulfatos (H_2S positivo, punto negro), sin embargo se apreciaron en éste medio colonias que no redujeron los sulfatos y que morfológicamente se asociaron a estados bacteriales cocoides.

En el medio ASO, se presentaron diferentes grados de hemólisis, así como también se observaron en dicho medio la presencia de algunas cepas no hemolíticas (Figura 14 y Tabla 20).

TABLA 19 . Cajas (Seleccionadas) de los recuentos en medios MBP para el estudio de características individuales de las colonias.

A	C	C A J A S						76	82
		6							
1	1	1	21	1	21	1	1	21	1
2	2	2	22	2	22	2	2	22	2
3	3	3	23	3	23	3	3	23	3
4	4	4		4	24	4	4	24	4
5	5	5		5	25	5	5	25	5
6	6	6		6	26	6	6	26	6
7	7	7		7	27	7	7	27	7
8	8	8		8	28	8	8	28	8
9	9	9		9	29	9	9	29	9
10	10	10		10	30	10	10	30	10
11	11	11		11		11	11		11
12	12	12		12		12	12		12
13	13	13		13		13	13		13
14	14	14		14		14	14		14
15	15	15		15		15	15		15
16	16	16		16		16	16		16
17	17	17		17		17	17		17
18	18	18		18		18	18		18
19	19	19		19		19	19		19
20	20	20		20		20	20		20

TABLA 20. Relación de las características individuales de las colonias en medios básico perfringens y agar sangre ovino.

Caja	M	L e c i t i n a s					HALO 0 mm, No. precipitación
		HALO 16 mm* precipitación marcada	HALO 12 mm precipitación marcada	HALO 8 mm precipitación tenue	HALO 4 mm precipitación tenue	HALO 1 mm	
B	P	H ₂ S. 2-4mm*	H ₂ S: 2-4 mm	H ₂ S 2-4 mm	H ₂ S 1- 2 mm	H ₂ S 1 mm	
A			2**7,12,16	1,3,4,6,8,9,11,13,14	5,15,17	18,19,20	
C			8,10,12,15,17,18,19	1,7,11,16,20,21	4,5,9,13,14	2,3,6,17,22,23	
6		1,5,8,13,24	4,6,7,14,25	9,15,16,17,18,26	3,19,19,20,27,28,31,32	2,11,12,21,22,23,29,30	
61			1,3,15,18	2,5,6,7,13,19	14,16,17,20,22	4,8,9,18,11,12,21	
76		4	1,6,8,9,18,23	3,10,16,19,21,22	11,12,17,20,24,25,29	2,5,7,13,14,15,26,27,28,30	
82			1,2,8,16,18,19	3,4,5,6,7,9,10,17,20	11,12,13,21	14,15,22,23,24	
Agar Sangre		Hemólisis α : 16 mm* Hemólisis β : 4 mm	Hemólisis α : 12 mm Hemólisis β : 2-4 mm	Hemólisis α : 8 mm Hemólisis β : 2 mm	Hemólisis α : 2-4 mm Hemólisis β : 2 mm	No Hemólisis	

* De diámetro

** No. de colonia.

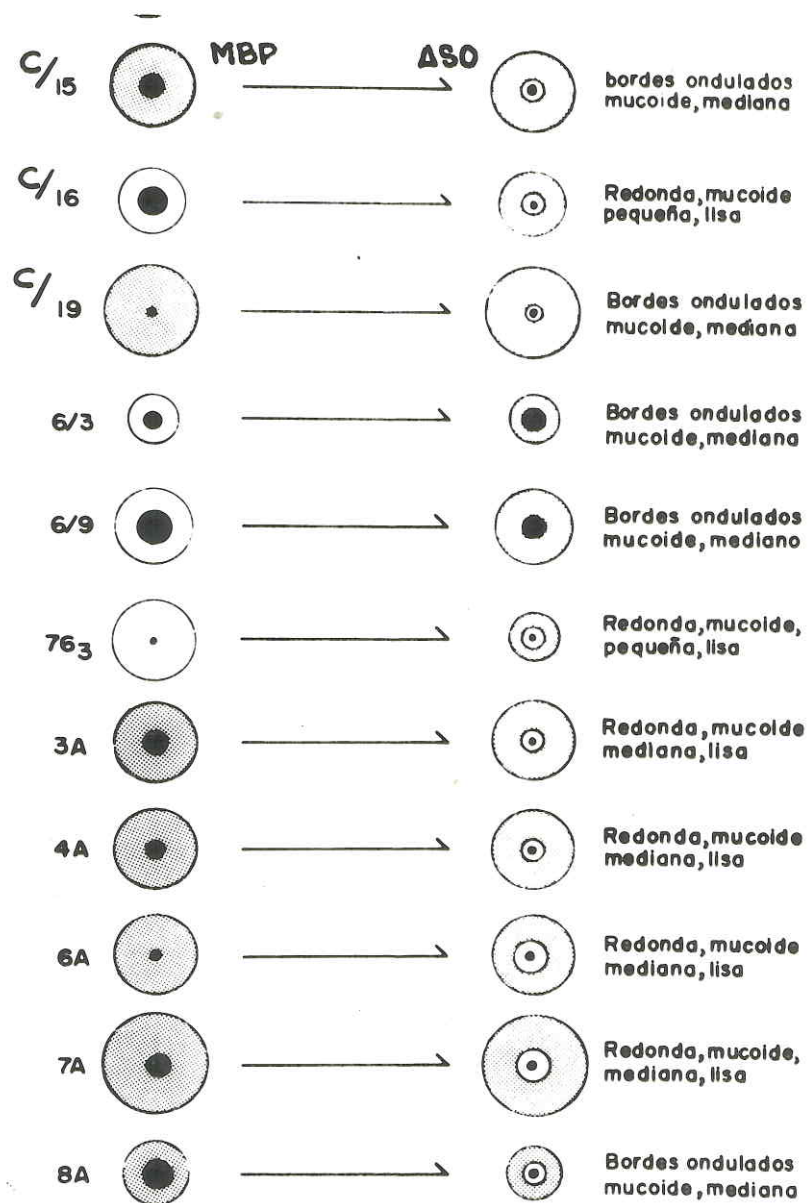


FIGURA 14. Relación directa de las características individuales de las colonias en los medios MBP y ASO.

Para la identificación de tipos de C. perfringens, se analizaron en un estudio piloto 80 cepas, correspondientes aproximadamente al 20% del total de las cepas confirmadas mediante la técnica de sero-toxi-neutralización en ratones de 30 gr de peso. La limitación fue simplemente de carácter operativo ya que cada muestra da lugar a un "árbol" de procedimientos y no hubo originalmente intenciones de muestreo basado en diseño estadístico, y aunque según se verá resultó ser adecuado también desde este punto de vista. En la Tabla 21 se presentan los resultados detallados.

Sobre un total de 80 cepas que se trabajaron, el total de cepas que neutralizaron con antisuero tipo A fue de 51 (63,7%). El total de cepas que neutralizaron con antisuero tipo A y no mataron al ratón control (cepa atóxicas) fue de 26 (32,5%). El total de cepas que no neutralizaron con antisuero tipo A, dando lugar a muerte del ratón inoculado y al control, y por lo tanto clasificados como cepas de C. perfringens diferentes al Tipo A (\bar{A}) fue de 3 (3,75%). Otros tipos quedaron para ser clasificados.

Un resumen de tales resultados se presentan en la Tabla 22.

4.3. Seguimiento prospectivo de una población cohorte de ovinos infantiles con relación al C. perfringens.

Los resultados de los recuentos (\log_{10}) de esporos de C. perfringens por

TABLA 21. Resultados de la Serotoxineutralización en ratones para tipificación del C. perfringens tipo A.

Cepa	Ratón *inyectado con		Cepa	R**	Ratón *inyectado con		Cepa	R**	Ratón *inyectado con		R**
	Antisuero Tipo A	Suero Control			Antisuero Tipo A	Suero Control			Antisuero Tipo A	Suero Control	
A6	-	-	C22	pp	-	-	D60	pp	-	-	pp
A27	+	+	C26	A	-	+	D67	A	-	+	A
A52	-	+	C31	A	+	+	D73	A	-	-	pp
A58	-	+	C33	A	-	+	D78	A	-	+	A
B1	-	-	C35	pp	-	+	D79	A	-	-	pp
B4	-	-	C38	pp	-	+	D81	A	-	+	A
B7	-	-	C39	pp	-	+	D88	pp	-	+	A
B13	-	+	C62	A	-	+	D95	A	-	+	A
B16	-	+	C63	A	-	+	E2	A	-	+	A
B20	-	-	C70	pp	-	+	E19	A	-	+	A
B24	-	+	C78	A	-	+	E22	A	-	+	A
B25	-	+	C80	A	-	+	E27	A	-	-	pp
B28	-	+	C86	A	-	+	E29	A	-	+	A
B69	-	+	C99	A	-	-	E36	pp	-	+	A
B90	-	-	D1	pp	-	-	E42	pp	-	-	pp
B91	-	+	D8	A	-	+	E57	A	-	+	A
B94	-	-	D10	pp	-	+	E61	A	-	+	A
B95	-	+	D14	A	-	+	E76	A	-	+	A
B99	-	+	D21	A	-	+	E82	A	-	+	A
C2	-	+	D30	A	-	-	F31	pp	-	-	pp
C3	-	+	D32	A	-	+	F37	A	-	-	pp
C5	-	+	D34	A	-	+	F46	A	-	+	A
C7	-	+	D38	A	-	-	F52	pp	-	+	A
C8	-	+	D40	A	-	+	F86	A	-	+	A
C10	-	+	D44	A	-	-	F89	pp	-	-	pp
C14	-	-	D53	pp	-	+	F97	A	-	+	A
C18	-	-	D56	pp	-	+		A	-	-	pp

* + = Muerto; - = Vivo

**R; Resultado: A = C. perfringens tipo A \bar{A} = C. perfringens tipo distinto de A (B ó C, ó D, ó E)

pp = C. perfringens atóxico, asimilable a C. paraperfringens (8).

TABLA 22 . Resumen de la tipificación para 80 cepas de C. perfringens aislada de ovinos infantiles.

Muestreo No.	N	Prevalencia %		
		<u>C. perfringens</u> A	<u>C. perfringens</u> A	<u>C. paraperfringens</u>
1	4	50.00	25.00	25.00
2	15	60.00	-	40.00
3	22	68.18	4.54	27.27
4	21	61.90	4.76	33.33
5	11	81.81	-	18.18
6	7	57.14	-	42.85

gramo para cada animal en seis recuentos consecutivos y simultáneos para cada muestreo y a intervalos de 30 días se muestran en la Tabla 23. La Figura 15 muestra histogramas de las distribuciones.

Es evidente que se está frente a una distribución de Log_{10} Poisson en el primer muestreo, en que el "evento raro" es la presencia de C. perfringens (prevalencia 20%).

El ajuste a tal distribución es estadísticamente significativo con más de 90% de certeza (Tabla 24).

A continuación la prevalencia de C. perfringens en los muestreos siguientes es de 100%, que se presentan en un cariz más bien Log_{10} normal con medianas de 1.5, 2.0, 2.0 y 2.5, es decir evidentemente creciente.

Los parámetros de tendencia central para el universo de datos por muestreo, se presenta en la Tabla 25, en la que también se pudo observar una tendencia al incremento. Dicho incremento pudo corroborarse al graficar los datos medios para cada muestra, contra el Log_{10} del número de días correspondiendo al muestreo, Figura 16.

La pendiente de la línea de regresión es estadísticamente distinta de 0 a una significancia de $p < 0.005$.

TABLA 23. Log_{10} de los recuentos por gramo de heces de C. perfringens en infantes ovinos estudiados consecutivamente en seis muestras diferentes con un mes de intervalo.

Registro	M u e s t r e o					
	1	2	3	4	5	6
5001	0.000000	1.589220	1.633470	1.531480	2.698960	1.782510
5003	0.000000	1.611810	1.301030	1.568800	1.581690	2.586260
5004	1.607880	1.494850	2.322220	1.897630	1.649750	2.229530
5005	2.112700	1.184860	1.633470	2.100370	1.519270	2.296910
5007	0.000000	2.000000	2.632020	1.806180	2.322390	2.891900
5008	1.477120	1.508630	1.113940	1.447160	2.368970	2.401340
5010	0.000000	1.008770	1.491360	2.292260	1.259630	2.119180
5818	1.443690	1.323300	1.859070	1.755870	2.297090	2.654380
5822	0.000000	0.698968	2.306160	1.826070	2.150150	2.103140
5823	0.000000	1.506640	1.749570	1.903090	2.197220	2.019740
5824	0.000000	3.412660	1.643450	2.271840	2.930520	1.758090
5825	0.000000	0.707744	1.531480	2.491360	1.756960	2.332820
5826	0.000000	1.221840	1.623250	2.342420	1.568630	2.924270
5827	1.380900	1.026870	2.359840	1.903090	2.079180	2.407920
5829	2.008770	1.485890	1.785330	1.934500	1.974690	2.935750
5830	0.000000	1.510640	1.934500	2.045340	2.181230	2.353730

Continúa/.

TABLA 23.
(Continuación)

Registro	M u e s t r e o					
	1	2	3	4	5	6
5831	1.698960	1.236570	2.586990	1.961650	2.912840	2.550030
5833	1.864330	1.079180	2.542620	2.133540	2.355650	2.783980
5835	1.552840	1.575580	1.799340	1.633470	1.706260	2.705500
5837	1.828060	1.782510	1.447160	2.558790	2.209250	2.829850
5839	1.657570	1.499390	1.332560	2.746630	2.762630	2.684720
5409	0.000000	1.415660	2.424810	2.658010	2.888690	2.856310
5410	0.000000	1.740360	1.314250	1.806180	2.654760	2.911270
5411	0.000000	1.916580	2.037430	2.107200	1.649570	1.838630
5414	0.000000	1.309800	1.819540	2.245510	2.374440	2.970030
5415	0.000000	1.619780	2.658960	1.681240	2.204110	2.592510
5416	0.000000	1.468520	1.826070	2.086360	2.633210	3.029670
5418	0.000000	1.675480	1.000000	1.301030	2.342780	1.828060
5420	0.000000	1.485890	1.322220	2.049220	2.468520	2.823900
5421	0.000000	1.698960	2.538110	1.977720	2.698960	2.187080
5423	0.000000	0.920818	1.568200	2.049220	1.686130	2.590870
5424	0.000000	1.633570	2.390060	1.707570	2.623240	2.893230
5425	0.000000	0.716698	2.517200	1.556300	2.519180	2.860200
5426	0.000000	1.346780	1.579780	1.623250	1.196500	1.881900

Continúa/.

TABLA 23.
(Continuación)

Registro	M u e s t r e o					
	1	2	3	4	5	6
5427	1.330990	1.684720	2.346350	2.428090	2.662750	2.328300
5428	0.000000	0.749579	2.243040	1.806180	2.852940	2.835180
5429	0.000000	1.907450	1.690200	2.660510	1.610830	2.411720
5430	0.000000	1.703820	2.585460	2.799340	2.330990	2.679220
5431	0.000000	1.778150	1.690200	1.146130	1.706260	2.728250
5432	0.000000	1.394330	2.100370	1.851260	2.000000	3.173350
5434	0.000000	1.963010	2.434150	1.778150	2.283990	2.124930
5435	2.114630	1.332540	2.000000	1.301030	1.416420	1.964280
5436	0.000000	1.309800	1.948840	2.053080	2.288720	2.546350
5438	0.000000	1.226700	2.221840	2.404830	2.363170	2.787390
5442	0.000000	1.212300	2.346350	2.495540	2.784680	2.764470
5645	0.000000	1.863520	2.225310	2.070580	1.301020	2.663390
5646	0.000000	0.721246	2.243670	2.276460	2.382700	2.625540
5648	0.000000	1.000000	1.832510	1.919080	2.567460	2.480120
5650	1.136670	0.721246	2.201400	2.127100	2.113940	2.559600
5651	1.904420	1.000000	2.626340	2.450640	2.778150	3.508090
5653	0.000000	1.477120	2.000000	2.546540	3.051150	2.486660

Continua/.

TABLA 23.
(Continuación)

Registro	M u e s t r e o					
	1	2	3	4	5	6
5655	1.795880	1.008770	1.929960	2.500010	2.986120	2.442350
5657	0.000000	1.000000	1.736750	2.577920	3.034760	3.077510
5658	0.000000	1.193820	1.652660	2.362820	2.113940	3.146120
5659	0.000000	1.689420	2.025550	2.320050	2.242430	2.913810
5660	0.000000	0.707744	1.920810	2.029380	2.187080	2.862130
5662	0.000000	1.193820	2.300990	1.968480	2.703160	2.615420
5664	0.000000	1.552840	2.164550	2.776700	2.586740	2.796690
5665	0.000000	0.661543	1.000000	2.592070	1.756960	2.827940
5666	0.000000	1.017720	2.623710	2.033420	1.455930	1.942000
5668	0.000000	1.198360	2.166690	2.601030	2.442140	2.544060
5669	0.000000	1.568630	1.845120	2.542620	2.141800	1.477120
5670	2.227660	1.503940	1.449770	1.869230	1.427900	2.266660
5678	2.190810	1.716690	2.179880	2.826070	2.365150	2.954240
5680	0.000000	1.406710	2.826450	2.671170	2.120820	1.905570
5684	0.000000	1.000000	1.890850	2.037430	3.099480	2.066940
5685	0.000000	1.636170	1.819100	1.903090	1.778150	2.759660
5686	0.000000	1.522870	1.677780	2.169750	2.504580	1.615280
5688	0.000000	0.725842	1.657570	2.301020	3.055040	2.516620

Continua /.

TABLA 23.
(Continuación).

Registro	M u e s t r e o					
	1	2	3	4	5	6
5690	0.769551	1.907450	2.183390	2.314600	1.439690	2.692230
5692	0.000000	1.393610	2.092400	2.512410	2.839420	2.781500
5694	0.000000	1.561790	1.716690	1.633470	1.296700	1.615280
5696	0.000000	1.503990	1.677780	1.903080	1.439690	1.773820
5698	0.000000	1.221840	2.217760	2.113940	2.947720	1.669580
5700	0.000000	1.576750	2.060480	2.544060	2.060480	1.912840
5710	0.000000	3.527734	2.194860	2.778150	2.532020	2.166330
5712	0.000000	0.707744	1.920810	2.249870	1.597730	2.740360
5714	0.000000	1.940290	2.291980	2.534150	2.944690	2.884600
5716	0.000000	1.597730	1.886490	2.162260	2.072550	2.249870
5718	0.000000	1.681240	1.908490	2.139880	2.388980	3.227500
5720	0.000000	1.420210	1.939520	2.714330	2.113940	2.775060
5722	0.000000	1.217040	1.380210	2.816240	2.702860	2.229530
5204	0.000000	1.817270	1.672640	2.565840	2.658351	1.702600
5206	0.000000	2.008770	1.558040	2.675120	2.602050	2.749660
5208	0.000000	1.904110	1.167490	1.954240	2.455930	1.560660
5216	1.408930	1.477120	1.359020	1.875060	2.243670	2.376750
5218	0.000000	1.689420	2.155340	2.386850	2.852070	2.036210

Continua /.

TABLA 23.
(Continuación)

Registro	M u e s t r e o					
	1	2	3	4	5	6
5226	0.000000	1.594670	1.000000	2.475970	1.953690	2.244710
5228	0.000000	1.415660	1.826070	2.335530	1.000000	1.565430
5231	0.000000	1.613990	1.000000	2.679410	2.598940	1.580870
5234	0.000000	1.420210	1.944480	2.312020	1.263600	1.494850
5236	0.000000	1.000000	2.110590	2.271820	2.698960	2.557960
5238	0.000000	1.944040	1.977720	2.283300	2.204310	2.417530
5239	0.000000	1.638270	1.505150	2.609060	2.651540	1.886050
5240	0.000000	1.589820	2.344490	2.411720	2.509510	1.532630
5241	0.000000	1.154900	1.769550	2.874480	2.538690	1.792500
5242	0.000000	0.725842	1.943090	2.352860	2.659260	2.305620
5247	0.000000	1.484120	1.657570	2.060860	2.569530	2.545740
5249	0.000000	1.366530	2.053080	2.478060	2.140810	2.141320
5253	0.000000	1.226700	2.019740	2.301030	1.800420	2.059760

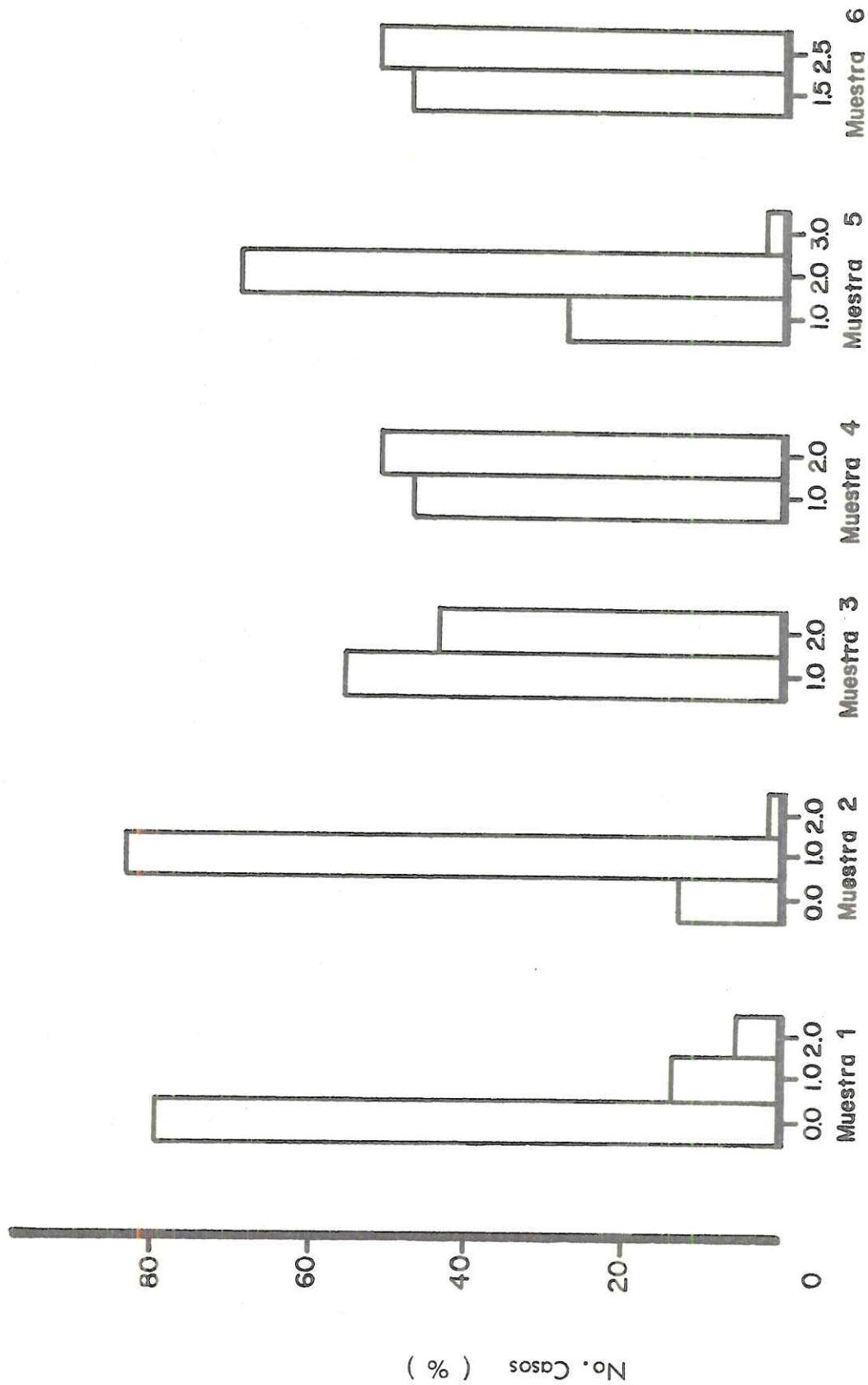


FIGURA 15. Histogramas obtenidos por computador (BMD-0.5 D) de los diferentes recuentos de C. perfringens.

TABLA 24. Ajuste de la distribución de recuentos de esporas (Log_{10}) de C. perfringens del primer muestreo en ovinos neo-natos.

Observado				Calculado	$\frac{(O - E)^2}{E}$	
X	F	F/X	F.X			
0	80	0.80	0	$P^*(0) =$	0.76338	0.0479708
1	13	0.13	13	$P^*(1) =$	0.20611	0.0281064
2	7	0.07	14	$P^*(2) =$	0.02782	0.063924
3,4,5	0	0.00	0			
o más						
$P < 0.10$					0.14	

$\bar{X} = F \sum X/n = 27/100 = 0.27$ Mediana calculada aritméticamente para distribución normal

$$P(X) = \frac{m^x e^{-m}}{x!}$$

X:

$$P(0) = e^{-m}$$

$$\text{Ln } q/r = \text{Ln } 80/100 = -m$$

$$m = \text{Ln } 100/80 = 0.223143 = \text{Media calculada estadísticamente para Poisson.}$$

Según Armitage (3).

TABLA 25 . Parámetros de distribución normal de recuentos de esporas de C. perfringens (Log_{10}) para cada una de las seis muestras sucesivas en los 100 infantes ovinos muestreados.

Muestra No.	Media (log_{10}) de los recuentos	Desviación estandar (log_{10}) de los recuentos
1	0.35512	0.69351
2	1.42093	0.47791
3	1.91664	0.41517
4	2.18225	0.38221
5	2.24798	0.50733
6	2.40581	0.45633

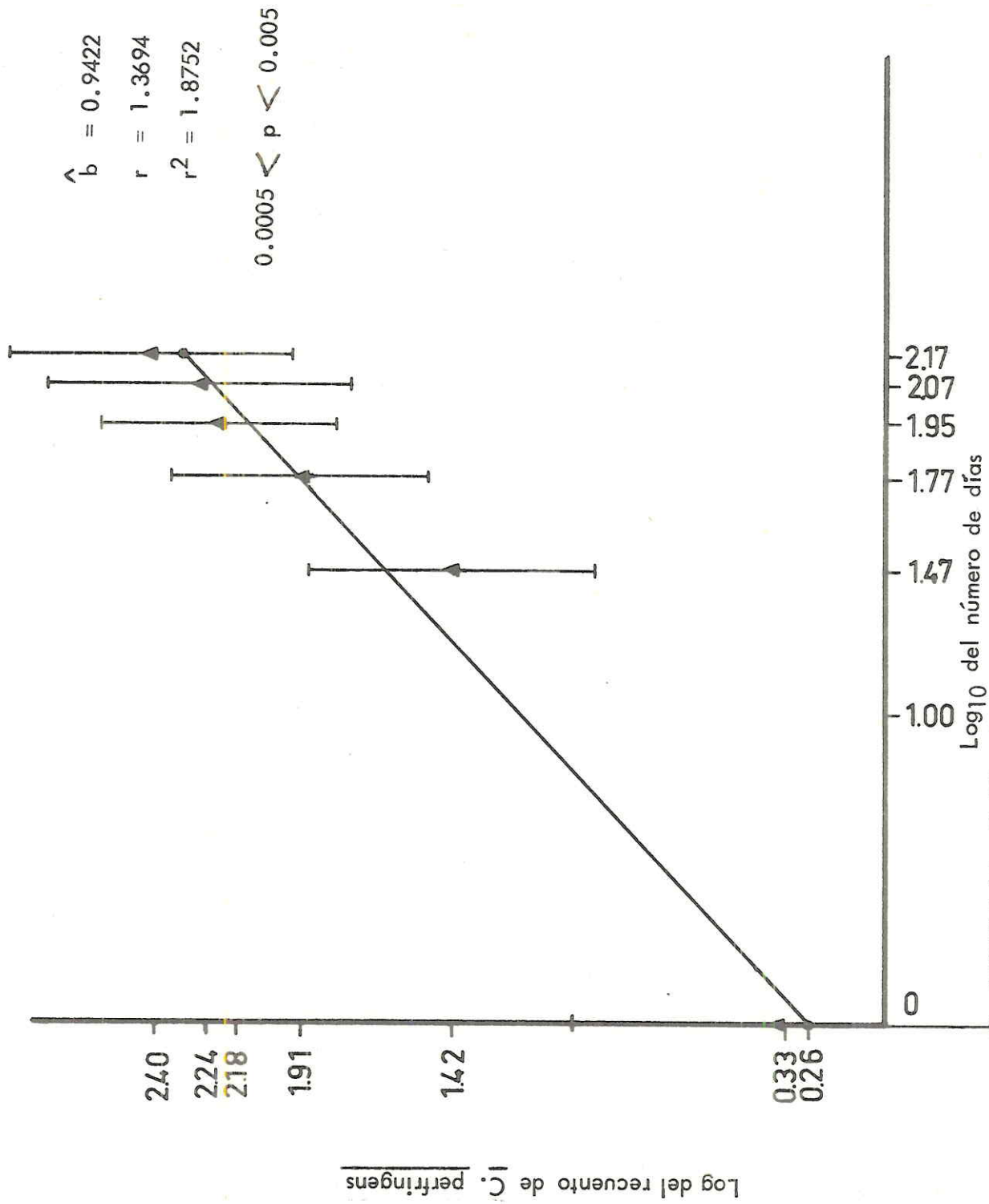


FIGURA 16. Gráfico de la curva de regresión entre los datos medios para cada muestra, contra el Log₁₀ del número de días correspondientes al muestreo.

Buscando otro enfoque a la hipótesis de recuentos de C. perfringens incrementales en los 100 ovinos infantiles muestreados seis veces cada uno, se hizo por el programa BMD-02-R una correlación múltiple entre los diferentes muestreos. El resultado en términos de coeficientes de regresión (r) y sus cuadrados (r^2) se muestran en la Tabla 26. Como era de esperarse en forma confirmatoria a la hipótesis incremental, la correlación entre los datos Log_{10} de recuentos de C. perfringens son no significativas: Las r y r^2 mayores solo llegan a 27%, 7%, mientras que las menores descienden a 8.6% y 0.02%, respectivamente.

Se utilizó también el programa 02-R para en una regresión múltiple por pasos, ver la posible habilidad predictiva de cada uno de los cinco primeros recuentos con respecto al sexto. Los resultados de dicho enfoque se presentan en la Tabla 27. Los coeficientes de regresión en base a interceptos \bar{a} , calculados fue muy pobre: Un máximo de 32% y un mínimo de 17%, con solamente cinco pasos, siendo posibles. El orden de entrada a la regresión de la variable fue de 5, 1, 2, 3.

Los coeficientes de correlación fueron también deficientes (un máximo de 18% y un mínimo de 5%), así como lo fueron los valores F para la proporción regresión/residual. La máxima significancia fue de 10% y la mínima de 25%.

El efecto de graficar los residuales VS. cada uno de los recuentos de C. perfringens, utilizando el sexto muestreo como variable dependiente, se muestra en

TABLA 26 . Matriz de coeficientes de correlación (r) y su cuadrado (r^2) entre los recuentos de C. perfringens encontrados en seis muestras consecutivas.

Muestra No.	1	2	3	4	5	6
r	1.00000	- 0.04900	0.02900	- 0.11600	- 0.08600	0.16500
r^2	1.00000	0.00241	0.00084	0.01345	0.00739	0.02722
r		1.00000	0.06300	0.06100	0.01500	0.01690
r^2		1.00000	0.00396	0.00372	0.00022	0.02856
r			1.00000	0.04500	0.15300	0.16700
r^2			1.00000	0.00202	0.02340	0.02788
r				1.00000	0.27000	0.02400
r^2				1.00000	0.07290	0.00057
r					1.00000	0.17400
r^2					1.00000	0.03027
r						1.00000
r^2						1.00000

TABLA 27. Habilidad del recuento de C. perfringens de las muestras (1, 2, 3, 4, 5) para predecir la sexta.

Orden de entrada de las variables	Coeficiente de regresión, b		Coeficiente de correlación, r		Valor F Reagr/Resid.		Significancia P	
	\bar{A}	Intercepto	\bar{A}	Intercepto	\bar{A}	Intercepto	\bar{A}	Intercepto
5		0.1743	-	0.05680		3.0700		0.10
1		0.2510		0.18344		3.3776		0.10
2		0.2995	-	0.17473		2.8187		0.10
3		0.3243		0.14440		1.6385		0.25
-		- *		-		-		-

* Valor F demasiado bajo para inclusión en regresión por pasos.

la Figura 17.

En un grupo de 10 animales ovinos jóvenes, que fueron sometidos a confinamiento y alimentados con pasto de corte (kikuyo), se realizaron diferentes muestreos de materias fecales con intervalos de 15 días, los resultados se presentan en la Tabla 28.

Para tener algún punto de referencia de datos y realizar una posterior interpretación, se tomaron como datos arbitrariamente iniciales, los resultados de los recuentos efectuados a los mismos animales en el sexto muestreo. En la época en que se realizó esta parte del trabajo, los animales se encontraban entre los 8 y los 10 meses de edad.

Durante los diferentes muestreos realizados a los 100 ovinos, se tomó también materia fecal, para exámenes parasitarios, con el objeto de seguir la evolución del parasitismo desde el momento del nacimiento hasta la terminación del experimento y su posible relación con el incremento bacteriano de la flora intestinal de los ovinos. Los resultados de dichos exámenes se relacionan en la Tabla 29, donde se aprecia un aumento del parasitismo de acuerdo con la edad del animal, y donde se observa la aparición de diferentes tipos de parásitos a diferentes edades en los animales jóvenes.

FIGURA 17. A-C. Gráfico por computador de cada uno de los recuentos de C. perfringens (abcisa) VS los residuales (ordenada), utilizando el muestreo No.6 como variable dependiente.

PLLOT OF RESIDUALS (Y-AXIS)
 VS. VARIABLE 5 (X-AXIS)

	1.000	1.428	1.857	2.285	2.714	3.142	..
	1.214	1.643	2.071	2.500	2.928		..
-0.91				1			..
					1		..
			1				..
-0.73	1			1			..
					1		..
				1	1		..
						1	..
-0.55	1	1		1			..
		1			1		..
		1		1	1	1	..
				1	1		..
-0.36		1		1		1	..
	1		1	1	1	1	..
		1		1	1		..
-0.18		1			1		..
	1						..
				1	1		..
0.00			1	1	1	1	..
			1	1	1		..
				1	1	1	..
				1	1		..
0.18					1		..
		1		1	1	1	..
		2				1	..
0.37		1		1	1		..
	1		1	1		1	..
		1		1	1		..
0.55		1		1	1	1	..
				1	1		..
		1			1		..
0.73				1	1		..
					1		..
						1	..
							..
	1.000	1.428	1.857	2.285	2.714	3.142	..
	1.214	1.643	2.071	2.500	2.928		..

TABLA 28 . Logaritmo de los recuentos (Log₁₀) en 10 ovinos muestreados entre los 8 y 10 meses de edad, con inter-
valos de 15 días.

Días	5007	5008	5226	5253	5425	5659	5669	5680	5818	5827
150*	2.8919	2.40134	2.244710	2.05976	2.86020	2.91381	1.47712	1.90551	2.65438	2.40792
240	2.96094	2.81557	2.8739	2.76641	2.94151	3.01029	2.77232	2.65896	2.81881	2.5998
255	2.8921	2.9590	2.6335	3.079	2.7076	3.0453	3.36172	3.61278	3.59106	3.3979
270	3.70757	3.61278	3.43136	3.3802	3.14612	3.2787	3.5563	3.77815	3.73239	3.89782
285	3.75587	3.44715	3.63346	3.11391	3.716	3.36172	3.65321	3.65321	3.72427	3.78532

* Resultado de los recuentos en el sexto muestreo.

TABLA 29 . Resultado de los exámenes parasitarios de los diferentes muestreos.

Muestreo No.	Trichostrongylidos	Trichuris	O. Eimeria	Moniezia Espansa	Fasciola Hepática	Dictyocaulus Filaria	Otros
1	0*	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	6	0	28	10	0	0	0
4	20	90	110	120	0	0	0
5	86	138	468	270	0	0	0
6	1.200	120	2.400	400	14	0	0

* Huevos por gramo de heces (pool).

4.4. Localización cualitativa y cuantitativa del C. perfringens en el sistema digestivo ovino.

Los resultados cualitativos y cuantitativos de C. perfringens en el sistema digestivo de seis ovinos sacrificados, se muestran en las Tablas 30 y 31.

En la Tabla 32 se presentan las variaciones de pH de las diferentes porciones del sistema digestivo.

En las porciones anteriores del sistema digestivo se presentan concentraciones de C. perfringens preferencialmente en el intervalo de 4-300; en cambio en las porciones posteriores del intestino y muy especialmente a partir del ciego la concentración del intervalo es más alto, siempre por encima de 400, y en Log_{10} hasta de 3 o más.

Las variaciones del C. perfringens guardaron una relación directa con la concentración de iones H^+ (pH), haciendo una excepción notable en boca y esófago en donde la estratificación se rompe quizá porque la presencia allí de C. perfringens está no relacionada con la fisiología del animal tanto como con el ambiente.

En las Figuras 18, 19, 20, 21, se presentan en forma bastante objetiva, los grados de concentración del C. perfringens en las diferentes porciones del sistema digestivo, mediante la utilización del medio MBP.

TABLA 30. Estratificación del sistema digestivo de ovinos para ubicación cuantitativa de C. perfringens por intervalos de 3×10^n .

No. registro caso	5507		5008		5226		5425		5659		5680	
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
Cavidad bucal		2		2	0			2		1		0
Esófago		2		2	0			2		1		0
Panza		3		3		3		3		3		3
Bonete		3		3		3		3		3		3
Librillo		3		3		3		3		3		3
Cuajar		3		3		3		3		3		3
Hígado		2		2		1		1		1		2
Bilis		1		1	0		0		0			1
Intestino delgado porción 1		3		3		3		3		3		3
	2	3		3		3		3		3		3
	3	3		3		3		3		3		3
	4	3		3		3		3		3		3
	5	3		3		3		3		3		3
	6	3		3		3		3		3		3
Ciego		4		4		4		4		4		4
Intestino grueso porción 1		4		4		4		4		4		4
	2	4		4		4		4		4		4
	3	4		4		4		4		4		4
	4	4		4		4		4		4		4
	5	4		4		4		4		4		4
	6	4		4		4		4		4		4

P = Se aísla C. perfringens
 N = No se aísla C. perfringens
 1 = 1-3/g

2 = 4-30/g
 3 = 31-300/g
 4 = 300/g

TABLA 31. Log_{10} de los recuentos por gramo de C. perfringens en las estratificaciones del sistema digestivo de ovinos.

No. de registro caso	5007	5008	5226	5425	5659	5680	
Cavidad bucal	0.6989	1.0000	0.0000	1.4771	1.1761	0.0000	
Esófago	1.6021	1.7782	0.0000	1.9542	1.0000	0.0000	
Panza	2.4472	2.1139	2.8250	2.4698	2.2430	2.1461	
Bonete	2.5798	2.0212	2.5119	2.0792	2.4843	2.0000	
Librillo	2.4232	2.2672	2.4624	2.5250	2.5378	2.4983	
Cuajar	2.2041	2.3118	2.3891	2.4232	2.0212	2.3118	
Hígado	0.0000	0.6989	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
Bilis	0.0000	0.0000	0.6989	0.0000	0.0000	0.0000	
Intestino	*						
Delgado porción	1	1.6021	2.2041	1.6989	2.2788	2.2304	1.9031
	2	2.0414	2.2304	2.0000	2.3617	2.2553	1.9542
	3	2.2304	2.2788	1.9030	2.3424	2.3010	1.7782
	4	2.1461	2.3800	2.0414	2.4913	2.4150	1.7782
	5	2.2553	2.5061	2.1671	2.4624	2.7324	1.9542
	6	2.4624	2.6334	2.7634	2.5315	2.8325	2.3517
Ciego		2.7076	2.6532	2.7993	2.5682	2.9191	2.5061
Intestino	*						
grueso porción	1	2.8921	2.6335	2.9590	2.7076	3.0453	2.7076
	2	2.9191	2.8195	3.1206	2.9138	3.2014	2.6721
	3	2.9498	2.8513	3.1553	2.8633	3.2355	2.7634
	4	2.9777	2.8921	3.1732	2.8129	3.1847	3.0043
	5	2.9345	2.9136	2.9868	2.6092	3.0864	2.8692
	6	2.6721	2.4914	2.9345	2.6982	3.1038	2.8388

* En orden descendente.

TABLA 32. Variaciones del pH en el contenido del sistema digestivo de los ovinos estudiados para C. perfringens.

No. registro caso	5007	5008	5226	5425	5669	5680
Cavidad bucal	7.6	7.6	7.4	7.6	7.6	7.4
Esófago	7.4	7.2	7.0	7.4	7.2	7.0
Panza	6.6	6.4	6.4	6.6	6.4	6.6
Bonete	6.8	6.6	6.8	6.8	6.6	6.6
Librillo	6.8	6.6	6.2	6.8	6.6	6.6
Cuajar	6.4	6.4	6.6	6.2	6.2	6.4
Hígado	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
Bilis	6.8	6.6	6.6	6.6	6.4	6.4
Intestino delgado						
1	6.4	6.4	6.6	6.4	6.4	6.4
2	6.6	6.4	6.6	6.6	6.4	6.4
3	6.6	6.6	6.8	6.8	6.6	6.6
4	6.6	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
5	6.8	7.0	6.8	7.0	7.0	7.0
6	7.0	7.2	7.0	7.0	7.2	7.2
Ciego	7.2	7.2	7.2	7.0	7.2	7.2
Intestino grueso						
1	7.2	7.0	7.2	7.2	7.2	7.2
2	7.2	7.0	7.2	7.2	7.2	7.2
3	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
4	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
5	7.2	7.2	7.2	7.4	7.2	7.2
6	7.2	7.2	7.2	7.4	7.2	7.2

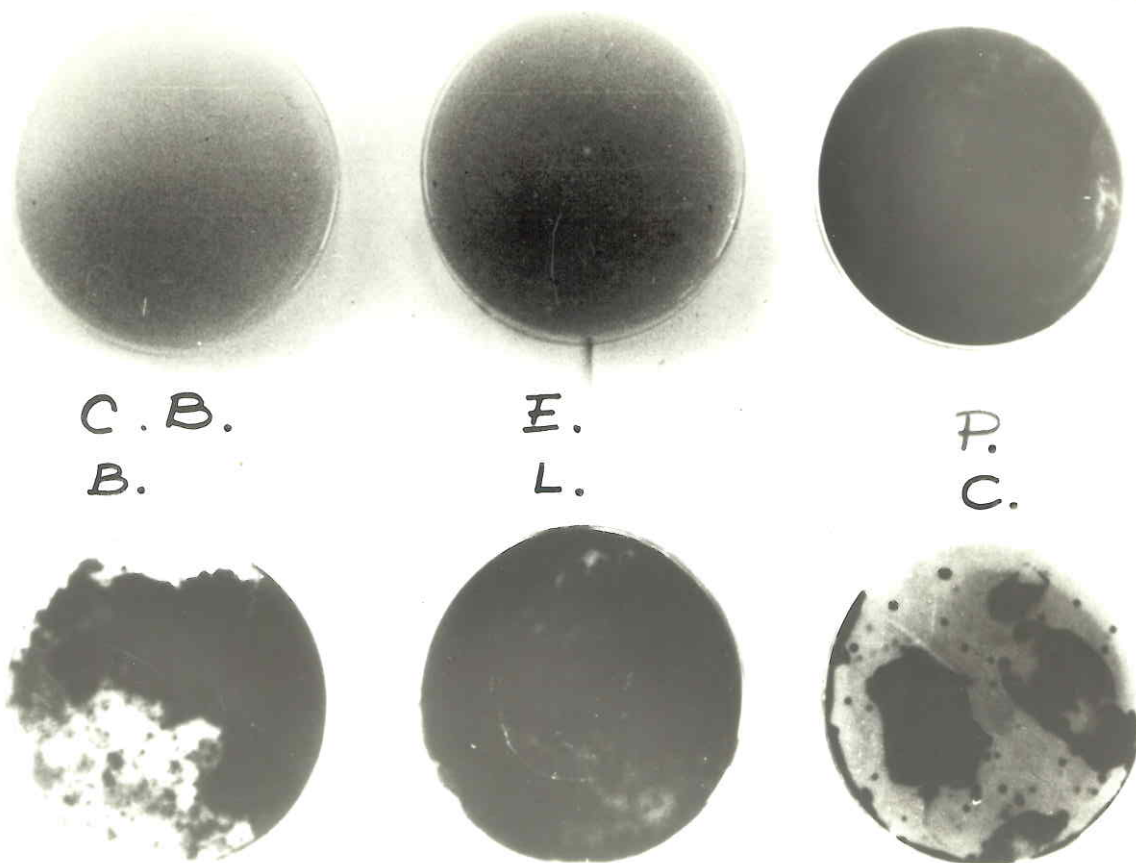


FIGURA 18. Localización del C. perfringens en cavidad bucal, esófago, panza, bonete, librillo y cuajar, utilizando el Medio Básico Perfringens.

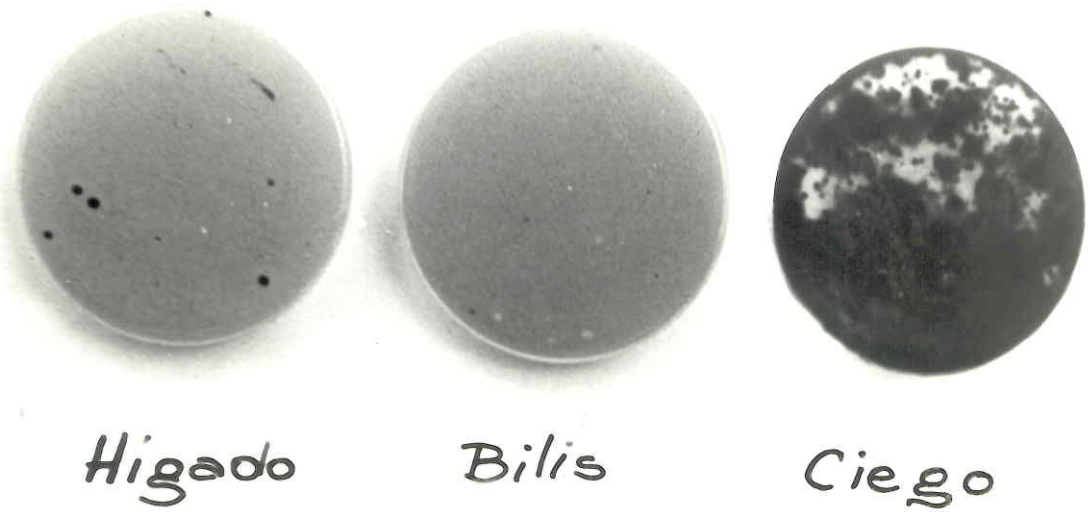


FIGURA 19. Localización del C. perfringens en hígado, vesícula biliar y ciego; utilizando el medio básico perfringens.

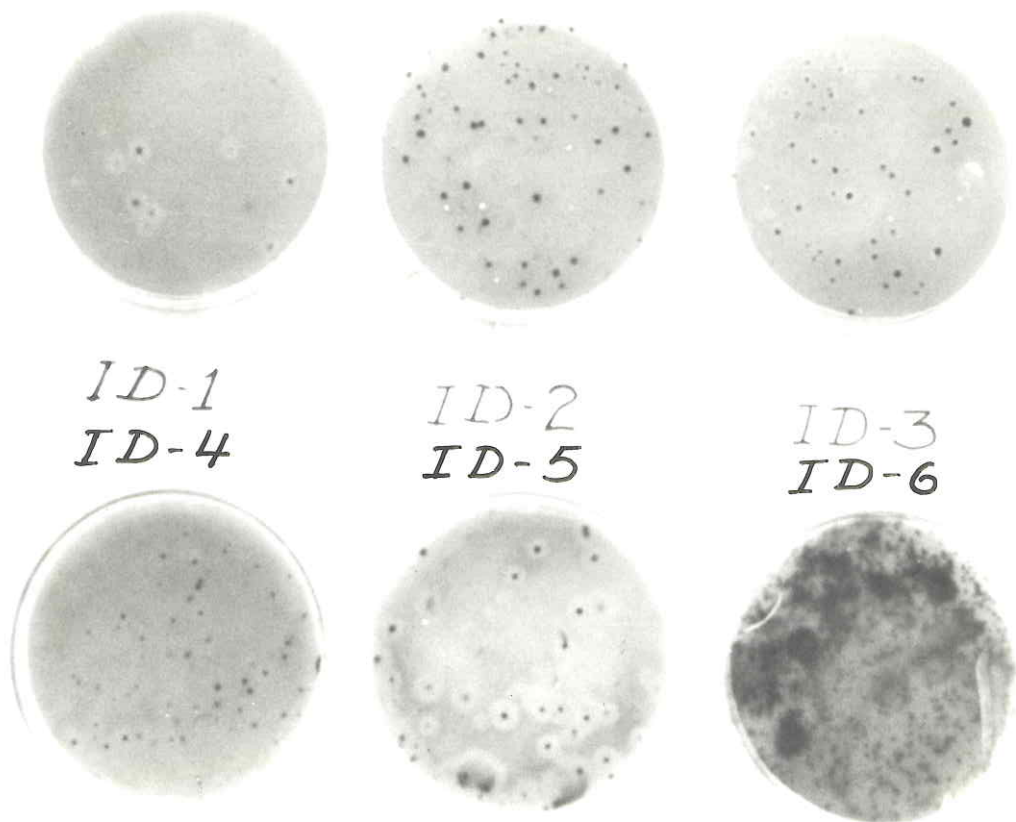


FIGURA 20. Localización del C. perfringens en seis porciones diferentes (descendentes) del intestino delgado; utilizando el medio básico perfringens.

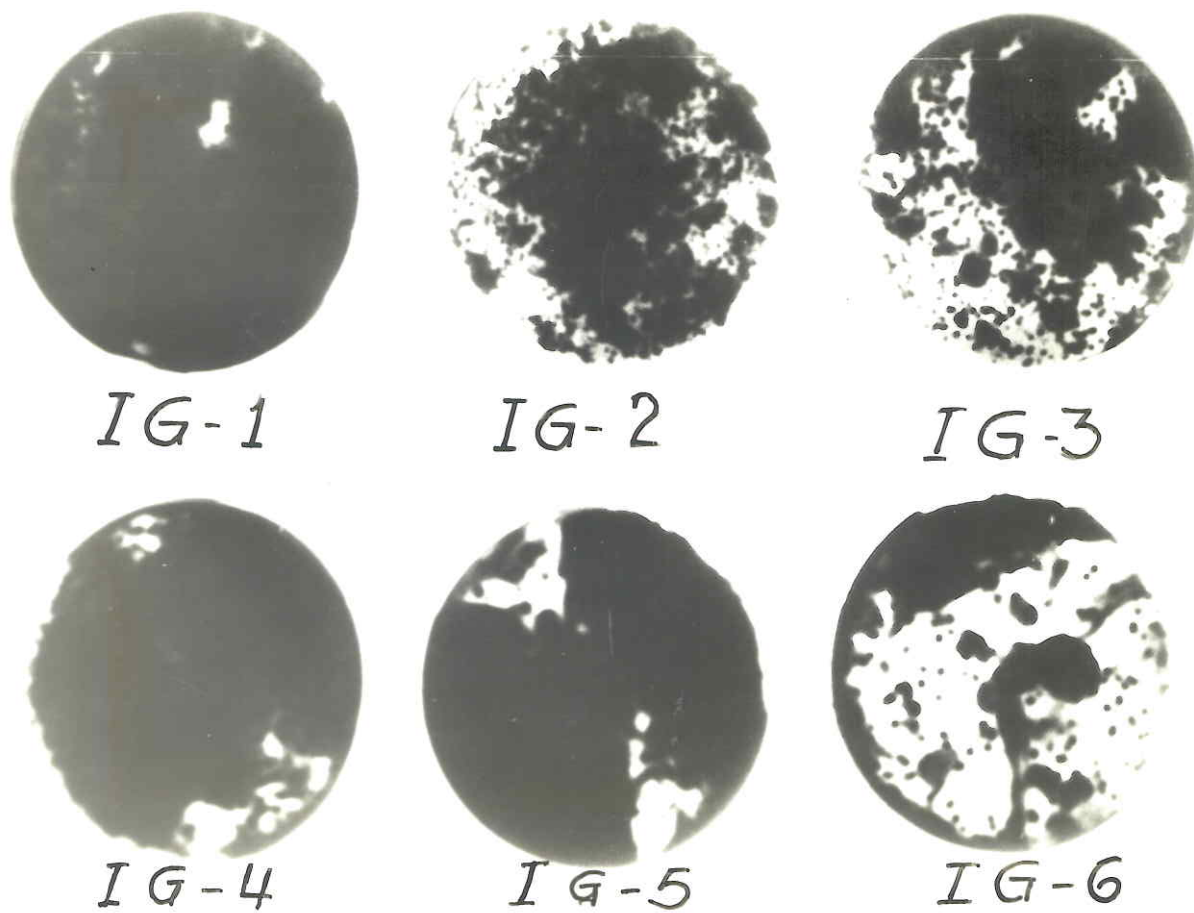


FIGURA 21. Localización del C. perfringens en seis porciones diferentes (descendente) del intestino grueso; utilizando el medio básico perfringens.

4.5. Lesiones producidas por cepas de C. perfringens mediante el empleo de la técnica quirúrgico-histológica del asa intestinal ligada en ovinos.

En la Tabla 33 se muestran los resultados de las lesiones producidas por diferente cepas de C. perfringens inoculados intraluminalmente en asas ligadas de intestino ovino.

Total de cepas inoculadas: 80 (tomadas al azar).

Total de ovinos intervenidos: Cuatro .

Total de cepas inoculadas por animal con su respectivo control: 20

Total de cepas que produjeron lesiones microscópicas: 60 (75%).

Total de cepas que no produjeron lesiones microscópicas: 20 (25%).

El animal sacrificado a las seis horas post-inoculación, presentó en las asas intestinales ligadas, un ligero aumento del volumen del contenido.

De las 20 cepas inoculadas en este animal, 14 (70%) no alteraron las capas del intestino; 6 cepas (30%), indujeron estados congestivos y presentación de edema en mucosa y submucosa respectivamente.

El animal sacrificado a las doce horas post-inoculación, presentó un aumento del volumen del contenido intestinal de las asas, 2 veces la cantidad inoculada.

De las 20 cepas inoculadas en este animal, 18 (90%) produjeron lesiones

TABLA 33 . Resultado de las lesiones producidas por diferentes cepas de C. perfringens mediante la técnica quirúrgica-histológica en asas intestinales ovinas.

Sacrificio	MUCOSA				SUBMUCOSA				MUSCULAR				ADVENTICIA	
	DE	N	CH	IC	E	C	H	IC	E	IC	E	CH	IC	IC
6 horas	0/20	2/20	1/20	2/20	6/20	8/20	0/20	3/20	1/20	2/20	4/20	17/20		
12 horas	12/20	10/20	13/20	19/20	16/20	10/20	8/20	8/20	3/20	2/20	1/20	18/20		
18 horas	16/20	15/20	18/20	15/20	16/20	20/20	4/20	8/20	1/20	0/20	5/20	19/20		
24 horas	18/20	18/20	9/20	17/20	12/20	19/20	5/20	6/20	1/20	2/20	5/20	19/20		

D.E. = Descamación epitelial, N = Necrosis, C = Congestión, H = Hemorragia, E = Edema

IC = Incremento Celular

en mucosa y submucosa en forma moderada, dos cepas no produjeron lesiones microscópicas. No se observaron invasiones bacteriales en la mucosa intestinal.

El animal sacrificado a las 18 horas, presentó un aumento en el volumen del contenido intestinal de las asas, 4 veces la cantidad inoculada; no todas las cepas produjeron acúmulo de líquido. Se apreció un mayor acúmulo del contenido intestinal en las asas adyacentes al ileon.

De las 20 cepas inoculadas a este animal, 19 (95%) indujeron la producción de lesiones microscópicas en mucosa, submucosa y adventicia de tipo moderado. No se observaron invasiones bacteriales en la mucosa intestinal, ni en la submucosa.

El ovino sacrificado a las 24 horas, presentó un aumento del volumen del contenido de las asas hasta de 8 veces la cantidad inoculada, en la mayoría de las asas, siendo más marcado el acúmulo de líquido hacia las regiones del ileon y yeyuno.

De las veinte cepas inoculadas, 18 (90%) cepas produjeron lesiones microscópicas en mucosa, submucosa, muscular y adventicia; 2 (10%) cepas no produjeron lesiones microscópicas. No se observaron invasiones bacteriales en los tejidos intestinales procesados.

Los animales sacrificados a las 18 y 24 horas, presentaron ligeras lesiones

en mucosa y submucosa en los controles, sin embargo no presentaron éstos, aumentos en el volumen del contenido intraluminal.

En las Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27 se presentan diferentes tipos de lesiones provocadas por la inoculación de cepas de C. perfringens.



FIGURA 22. Caso experimental. Intestino ligado de oveja 18 horas post-inoculación. Apariencia macroscópica de asas intestinales inoculadas con diferentes cepas de C. perfringens; nótese los distintos grados de dilatación en los segmentos ligados.

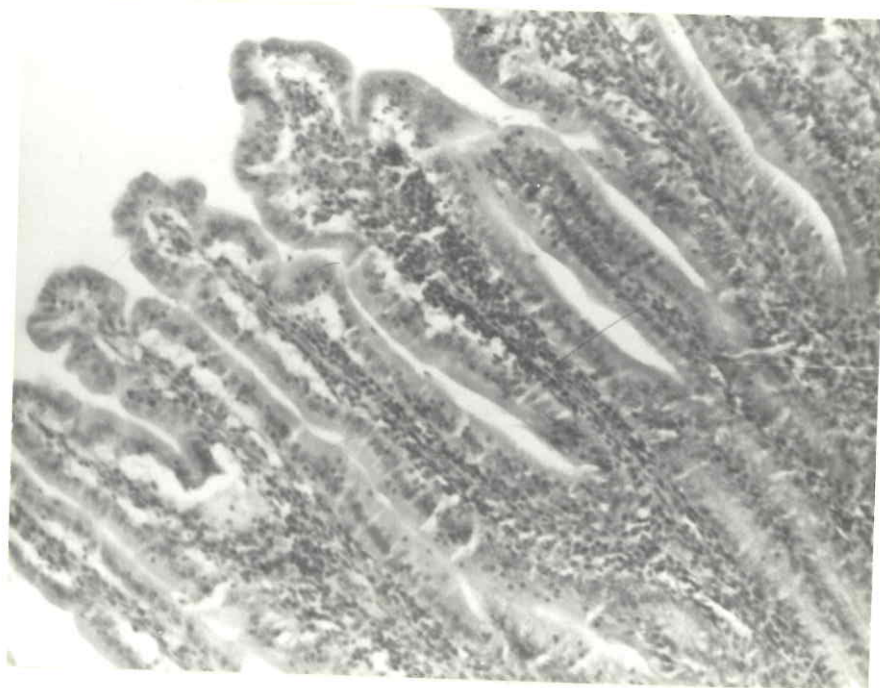


FIGURA 23. Caso experimental. Intestino ligado de oveja. Control. Mucosa intestinal normal, el epitelio de revestimiento y la lámina propia, no presenta ninguna alteración morfológica. Hematoxilina-Eosina 600x.

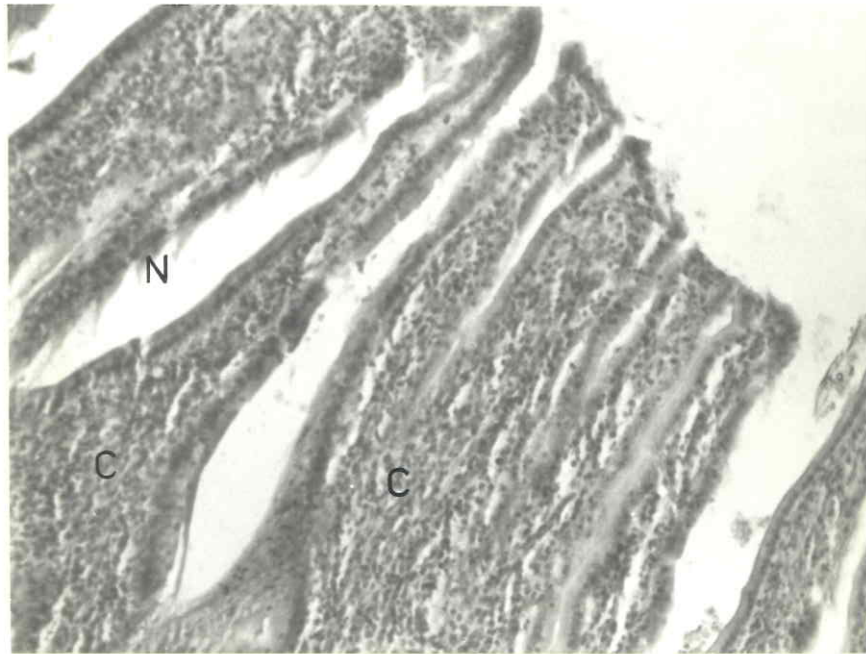


FIGURA 24. Caso experimental. Intestino ligado de oveja 18 horas post-inoculación: Necrosis de coagulación del epitelio (N) y aumento de celularidad en la lámina propia (C). Hematoxilina-Eosina 600 x.

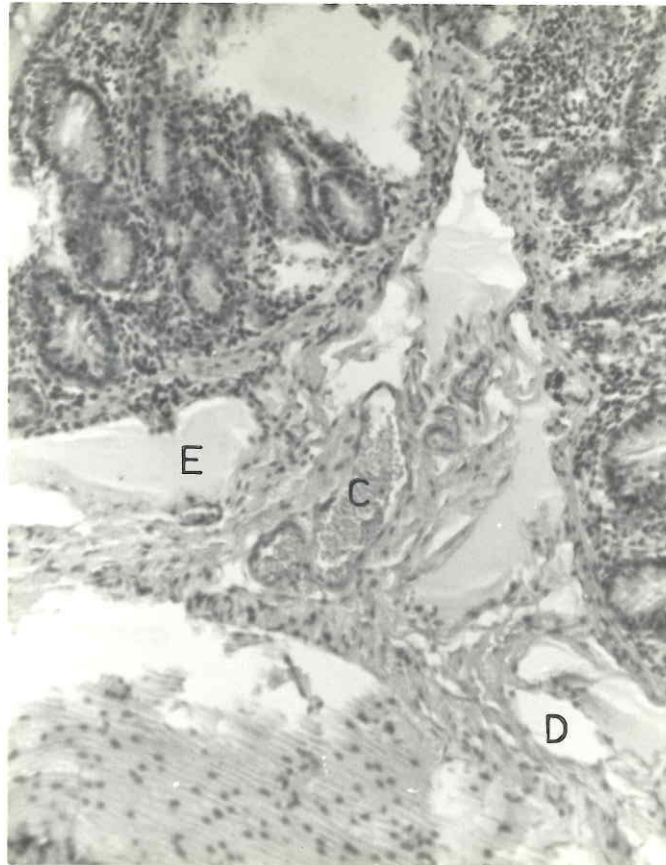


FIGURA 25. Caso experimental. Intestino ligado de oveja 18 horas post-inoculación. Dilatación de los vasos linfáticos (D) y edema de la submucosa (E). Ligera congestión de vasos sanguíneos (C). Hematoxilina-Eosina 600x.



FIGURA 26. Caso experimental. Intestino ligado de oveja 18 horas post-inoculación: Necrosis de coagulación (N) y descamación epitelial de las vellosidades intestinales (D). Hematoxilina-Eosina 600x.

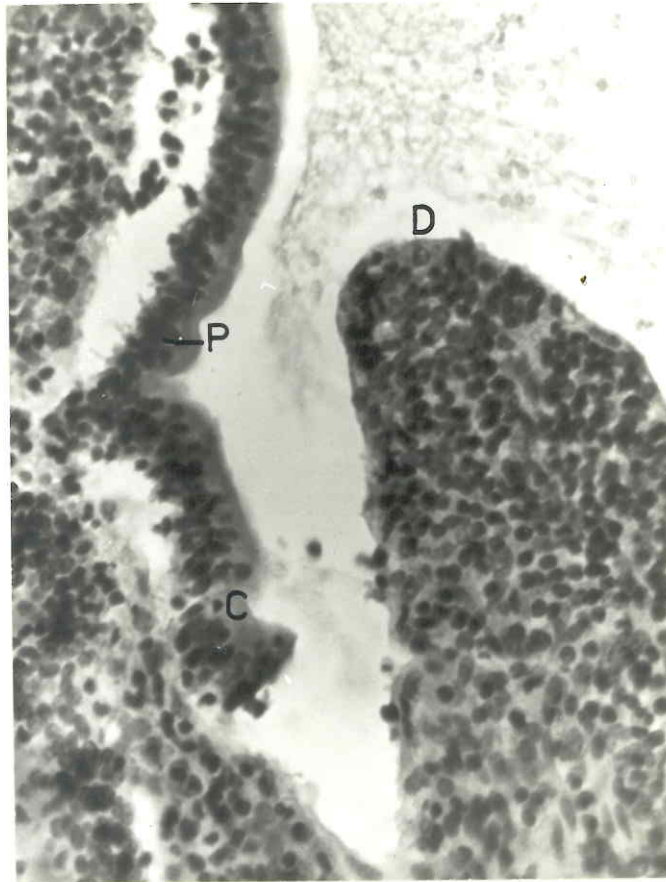


FIGURA 27. Caso experimental. Intestino ligado de oveja 24 horas post-inoculación: Necrosis de coagulación del epitelio de revestimiento; nótese la picnosis nuclear (P) y pérdida del contorno celular (C). Desca - mación epitelial de una vellosidad intestinal (D). Hematoxilina-Eosina 2.000x.

5. DISCUSION

5.1. Población muestreada.

Durante el tiempo de los muestreos, se tomaron una serie de datos demográficos para la detección de alguna causa incrementable o discriminable de la población de C. perfringens en la flora intestinal de los ovinos y su posible patogenización como causal de enfermedad.

Es de anotarse que el peso (inicial, final e incremento) fue el único conjunto de variables que tuvo habilidad discriminatoria con respecto al sexo. Por lo tanto podría hipotetizarse que la diferencia en recuentos de C. perfringens entre machos y hembras se relacionó con el mayor equipamiento de los machos para empezar su vida post-uterina, incluyendo quizá un más rápido paso a la alimentación extra-láctea. Tal hipótesis queda bien sustentada al observar que a mayor edad y cuando la diferencia en peso es menos marcada, los recuentos de C. perfringens en heces se nivelan tanto para machos como para hembras.

Referente a la habilidad discriminatoria en los recuentos de C. perfringens con respecto a la raza, criollos sobre todo, se diría que la rusticidad del animal criollo presenta un ambiente intestinal menos propicio para el crecimiento de un posible patógeno.

No se presentaron muertes de animales en forma súbita y los animales que

murieron, se asociaron directamente con estados de fuertes parasitosis gastrointestinales.

En los chequeos de las materias fecales de los diferentes muestreos, se encontró un aumento de parásitos del tipo Moniezia, Trichuris, Trichostrongylidos, Ooquistes de Eimeria, a partir del tercer mes de edad. Hacia el quinto mes de edad se detectó presencia de Fasciola hepática y el incremento del parasitismo fue tan marcado que se hizo indispensable un tratamiento masivo con antiparasiticidas para evitar pérdidas en el grupo cohorte.

Las infestaciones masivas de parásitos en el animal, traen serias consecuencias en el estado de salud y crean posiblemente áreas propicias dentro del sistema digestivo para la virulentación de microorganismos potencialmente patógenos, en las porciones donde se presentan laceraciones de tejido causadas por las mordeduras y penetraciones de los parásitos en la pared intestinal.

La rotación de potreros permite que los suelos no se sobresaturen de microorganismos, y con una administración a libre disposición de sales minerales, se evita que los animales tengan tendencia a ingerir tierras o elementos minerales, lo que ayudaría a tener una población de la flora intestinal microbiana mas o menos estable.

En los animales que son sometidos a estabulación y se alimentan con pas-

tos de corte o con alimentos concentrados, se logró alterar en varios logaritmos los recuentos de C. perfringens, indicando que cualquier cambio en el manejo y el sistema de alimentación de los animales, altera factores del medio interno intestinal, provocando un ambiente propicio para el aumento de las poblaciones microbianas. Sin embargo, el organismo del animal logra adaptarse a dichos cambios sin que se afecte la salud.

Como lo reporta la literatura (37, 38, 40), en casos de sobrecargas alimenticias con alimentos ricos en proteína y en estabulación, se favorece el incremento de las poblaciones de C. perfringens que logran patogenizarse y causar alteraciones del estado de salud del animal, llegando a dar lugar a enfermedad y en muchos casos muerte toxémica de los animales.

5.2. Caracterización e identificación de C. perfringens.

Analizando los resultados de los recuentos bacteriales se encuentra que se presentó un porcentaje bajo (20%) de casos positivos en el medio MBP, lo que puede indicar que los animales nacen libres de C. perfringens y que adquieren en su flora intestinal dicho microorganismo, al encontrar éste, su habitat en el sistema digestivo de los ovinos tan pronto nacen.

Es evidente que como primera fuente de contaminación de los recién nacidos, actúa el primer contacto con el medio ambiente (aire, suelo), donde existen

formas esporuladas de C. perfringens y que son inhalados y a la vez ingeridos al momento de la lactancia.

El incremento de C. perfringens en la flora intestinal de los ovinos, se realiza a partir del primer día de nacidos y continua aumentando, dependiendo de la alimentación, manejo y estado de salud del animal.

No todas las cepas que crecieron en el medio MBP fueron compatibles con C. perfringens, lo que concuerda con una reciente observación de Hauschild et al. (29) que resultó en la clasificación de un nuevo Clostridium fecal (C. celatum sp. nov.). También concuerda esta observación con la clasificación que presentó el Manual Bergey (8), última edición sobre el C. paraperfringens, un Clostridium con características morfo-fisiológicas similares a C. perfringens y que es aislado de materias fecales y de heridas (Tabla 1).

Con el empleo de medioLMN, la reacción de la reducción de los Nitratos, no dió una alta confiabilidad. En el presente trabajo el grado de seguridad de dicha reacción fue de 51.23%. Sinembargo, las solas reacciones L y M (Figura 3) son suficientes y de altísima confiabilidad para la prueba confirmativa del C. perfringens y C. paraperfringens.

En el 48.76% de las cepas que presentaron reacción negativa a Nitratos en el medio LMN, al ser confirmadas mediante el empleo de otro medio capaz de

detectar en mejor forma la reacción de reducción de los Nitratos, la positividad subió a 91%; relacionando los datos presentados en las Tablas 1, 16 y las reacciones posteriores realizadas como pruebas confirmatorias, se apreció, que no todas las cepas bacteriales que crecieron en anaerobiosis, presentando H_2S positivo y precipitación tenue o ninguna precipitación de Lecitina se clasifican como C. perfringens. Interesante fue el observar que no todas las cepas de C. perfringens reducen los nitratos, estando de acuerdo con trabajos anteriores (8, 11, 12, 16, 43, 51, 58) donde se reportaron reacciones positivas y negativas, dependiendo del medio de cultivo base. Sin embargo es evidente que una buena mayoría, cercana a la totalidad, de las cepas ovinas si son nitratos positivos.

Comparado los resultados de las características individuales de las diferentes colonias estudiadas en los medios MBP y ASO, se presentó una relación directa entre el mayor halo de Lecitinasa y su mayor precipitación, con las mayores zonas de hemólisis alfa y beta. Colonias que presentaron halos de precipitación de Lecitinasa tenue, presentaron hemólisis alfa (Figura 4).

Colonias que en el medio MBP presentaron solamente producción de H_2S en el medio ASO fueron no hemolíticas, y morfológicamente resultaron cocos, no compatibles con especies de Clostridium .

Por lo tanto compatibles con C. perfringens aparecen evidentemente tres categorías de producción de toxina alfa medida según dos parámetros distintos pero equiva-

lentes (precipitación de lecitinasa y hemólisis α): alta, mediana y baja. Su correspondencia a una categorización real queda a ser investigada más allá pero parece ser un hecho. En cambio la hemólisis β (quizá asignable más que todo a toxina θ) es muy uniforme sea cual sea el grado de α - toxigenicidad. Esto es válido para cajas inmediatamente salgan de incubación. Reposo posterior hará que la hemólisis β sea la dominante al cabo del tiempo.

El 20% de las cepas de C. perfringens estudiadas por la prueba de la sero-toxinización revelaron que existen cepas toxigénicas de C. perfringens tipo A, y que son éstas las dominantes en el tracto intestinal del ovino joven.

En menor número, se encontraron proporcionalmente muy pocas cepas diferentes al Tipo A, son ellas de alto y variado poder toxigénico y pueden por lo tanto considerarse como cepas definitivamente patógenas.

Se presentaron 26 (32.5%) cepas de C. perfringens que no demostraron un poder toxigénico, pudiendo considerarse como cepas atóxicas y que de acuerdo con el Manual Bergey (8) podrían clasificarse con el grupo, identificado como C. paraperfringens, es decir: gérmenes atóxicos, no patógenos para los animales de laboratorio, que se aíslan de las heridas y heces, presentando propiedades morfo-bioquímicas muy similares al C. perfringens (Tabla 1).

Es de anotarse, que aunque el muestreo del 20% no correspondió en principio

a una decisión estadística sino simplemente funcional, al haber un porcentaje de 60% de hallazgos tipo A, se puede decir con certeza del 95% que tal porcentaje reproduce adecuadamente lo que sucedería en el universo de muestras.

5.3. Seguimiento prospectivo de una población cohorte de ovinos infantes con relación al C. perfringens.

La hipótesis UNO (H_1) de trabajo se basó en que la infección por C. perfringens en el intestino del infante ovino sigue una tendencia incremental lineal VS la edad.

Una subhipótesis UNO (SH_1), fue la de que tal infección es afectada por otras variables (demográficas y nutricionales).

Evidentemente se encontró una regresión marcada de tipo log-log, lo que cinéticamente indicaría una reacción de segundo orden. Es decir que la H_1 queda demostrada sugiriendo que el aumento en recuentos intestinales en ovinos infantes y destetos está regido por más de un factor, y quizá por muchos más que dos determinantes.

La hipótesis DOS (H_2) se refería a la poca habilidad que podría tener cada uno de los recuentos de cada uno de los muestreos con respecto a los demás. Tal hipótesis quedó demostrada con la ausencia de correlación y de habilidad predictiva que demostraron los diferentes recuentos entre sí y con respecto a la predicción de los hallazgos de la última muestra.

5.4. Localización cualitativa y cuantitativa del C. perfringens en el sistema digestivo de los ovinos.

La hipótesis TRES (H_3) para esta porción del trabajo, fue que el C. perfringens presenta un patrón definido de estratificación en su número a lo largo del tubo digestivo. Por tal razón era importante separar esta posibilidad, de la de una posible estratificación de la esporulación lo que hizo que se hicieran recuentos totales de C. perfringens, y no de esporos, para esta parte del trabajo.

El C. perfringens no solamente es un habitante normal de las últimas porciones intestinales, del ovino, sino que se encontró presente en todo el sistema digestivo en diferentes concentraciones.

La localización del C. perfringens en boca y esófago, se pueden considerar de tipo accidental, provocada por la ingestión de piensos que no lograron ser completamente ingeridos en el momento del sacrificio, o que lograron esta localización por una regurgitación alimenticia o durante la ruminación. De todos modos es la primera vez que se informa sobre su presencia en tracto gastrointestinal supraestomacal.

El C. perfringens habita a diferentes pH provocados por los jugos gastrointestinales, no siendo afectados en lo más mínimo como para pensar en que sea uno solo el sitio de localización o de su predilección en el tubo digestivo. Particular-

mente interesante esta observación al basarse en recuentos totales y no de esporos, estos últimos de bien conocida resistencia a los agentes químicos.

La concentración de C. perfringens en los cuatro estómagos permaneció mas o menos constante. En cambio, a partir de la primera porción del intestino delgado se presentó un incremento de la población bacteriana llegando a presentarse su climax en las últimas porciones del intestino grueso. El pH alto en estas porciones quizá favorezca un ambiente para el mejor desarrollo de dicho germen, asegurando in vivo una tendencia bien conocida in vitro. Todos los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo fueron de pH 7.5 o más.

Como dato especial, se demostró la localización de C. perfringens en el hígado y vesícula biliar, en animales aparentemente sanos y que no presentaron ninguna alteración en este órgano.

5.5. Lesiones producidas por cepas de C. perfringens mediante la utilización de la técnica quirúrgico-histológica en el asa intestinal de los ovinos.

La técnica quirúrgico-histológica del asa intestinal ligada de los ovinos es muy útil para evaluar el poder toxipatogénico de cepas de C. perfringens aisladas en el campo.

El acúmulo de líquido intraluminal en las asas ligadas, es un buen indica-

dor de cepas productoras de esporotoxina, teniendo en cuenta que las lecturas en ovinos deben realizarse después de las 12 horas de inoculación y las inoculaciones deben hacerse en las porciones posteriores del intestino delgado en especial yeyuno y aun mejor el ileon.

Las lesiones producidas por las diferentes cepas de C. perfringens toxipatógenicas, se reflejan en una alteración de la mucosa intestinal, donde ocasionan descamaciones epiteliales, necrosis de las vellosidades, congestión y hemorragia, con incremento de la celularidad; en la submucosa originan especialmente edema y congestión; en muscular ligeros incrementos celulares lo mismo que en la capa adventicia.

El 25% de las cepas de C. perfringens inoculadas, no produjeron alteraciones microscópicas en el tejido intestinal a diferentes tiempos de inoculación, lo que confirma la existencia de cepas de Clostridium diferentes al C. perfringens que son no patógenas y atóxicas y que se pueden considerar como cepas de C. paraperfringens.

Las cepas de C. perfringens estudiadas mediante la técnica de las asas intestinales, no presentaron invasión de la mucosa intestinal, confirmando así que las lesiones microscópicas son producidas por las toxinas elaboradas por el germen.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los ovinos inician su vida extra-uterina como libres de Clostridium perfringens y de C. paraperfringens, microorganismos estos que encontrarán un hábitat en el sistema digestivo del lactante y del desteto donde llegan a ser importantes partícipes de la flora intestinal. Se evidenció que la primera fuente de contaminación de los recién nacidos se encuentra en el medio ambiente donde existen formas esporuladas de dichos gérmenes, ingeridos al momento de la lactancia.

La infección de C. perfringens y C. paraperfringens y su presencia en la flora intestinal ovina se inicia a partir del momento de nacer ($\bar{X} \log_{10}$ esporas = 0/gramo) y continúa aumentando en asociación con el sexo ($\log_{10} \bar{X}$ esporos; machos 1.80; hembras 1.72) y el peso (incremento machos = 16.3 kg; hembras = 15.9 kg) y quizá con alimentación, el estado de salud, el manejo de los animales y otras variables no bien definidas. Los $\bar{X} \log_{10}$ esporos subieron a 2.41 al cabo de los seis meses del estudio. Es la primera vez que se informa sobre C. paraperfringens en ovinos.

El C. perfringens y el C. paraperfringens colonizan la boca (posiblemente como consecuencia de la rumiación) hasta del recto. La estratificación anatómica descendente mostró un marcado incremento cuantitativo en la misma dirección alcanzando recuentos de C. perfringens y C. paraperfringens (vegetativos) hasta $\log_{10} \geq 3$, a las porciones inferiores.

En el tracto intestinal de los ovinos, existe un 64% de cepas de C. perfringens tipo A, 4% de cepas de C. perfringens diferentes al tipo A y un 32% de cepas de C. paraperfringens.

Para los estudios bioestadísticos de cualquier tipo de población, los programas 01D, 05D, 02R y 07M de la serie BMD, implementados en un computador IBM por primera vez en el país, se adaptaron muy bien a los análisis bacteriológicos y epidemiológicos del presente estudio y se adaptarán con éxito sin duda a estudios similares en otras especies.

En el laboratorio el Medio Básico Perfringens (MBP) con yema de huevo se comportó como una excelente medio selectivo que se recomienda para ser utilizado en los recuentos de C. perfringens y C. paraperfringens y como prueba bioquímica presuntiva para el diagnóstico de dichos microorganismos de origen gastrointestinal.

El medio lactosa Motilidad Nitrato (LMN) utilizado en el presente trabajo, como prueba bioquímica confirmativa, se encontró como de gran confiabilidad por los criterios de Lactosa (ácido +, gas +) Motilidad (-), . De otra parte, la detección de la reducción de los nitratos en este medio es poco confiable lo que hace necesario la utilización del medio Agar Nitrato (AN). La prueba de los nitratos parece perder importancia práctica según los hallazgos del presente trabajo, ya que los criterios de Lactosa y Motilidad, junto con los de H₂S (+) y lecitinasa (+) en

el MBP (este último notablemente asociado con la α , β hemólisis en Agar Sangre Ovina) son suficientes para clasificar una cepa con más de 99% de confiabilidad como C. perfringens o C. paraperfringens. La clasificación final entre uno y otro requieren necesariamente otros criterios morfológicos y bioquímicos ya que el uno pertenece al grupo II y el otro al I del género Clostridium en la más reciente edición del Manual Bergey (8).

Las técnicas de sero-toxi-neutralización en ratones y quirúrgico-histológica en asas intestinales de la especie estudiada, son de esencial valor diagnóstico para la tipificación de cepas de C. perfringens, su diferenciación con C. perfringens siendo las de C. paraperfringens atóxicas y apatógenas por definición (8), y para la confirmación definitiva de patogenicidad en la especie en cuestión.

Se recomienda la tipificación de los aislamientos de C. perfringens tipos distintos de A; el seguimiento de poblaciones ovinas adultas en condiciones similares a las de éste trabajo en busca de la confirmación de variables asociadas a C. perfringens y su patogenización; la evaluación de la situación de enterotoxemia ovina en Colombia y el desarrollo, de ser necesaria, de una vacunación sistemática protectora.

7. RESUMEN

Se evaluaron las condiciones demográficas con respecto a la prevalencia de Clostridium perfringens (welchii) (CP) y el Clostridium paraperfringens (CPP) en el intestino de los ovinos infantes y jóvenes, estableciendo recuentos de esporos CP y CPP en el tracto intestinal. Patrones físico-químicos de aplicación práctica fueron establecidos. Se siguió prospectivamente la población de ovinos anotando cambios con relación al CP y CPP. Se localizó cualitativa y cuantitativamente CP y CPP en las diferentes porciones del sistema digestivo. Se reprodujeron quirúrgica e histopatológicamente las lesiones producidas por CP y CPP. Se muestrearon (heces) 6 veces (cada 30 días) 100 ovinos de cinco razas en la Granja San Jorge, Municipio de Soacha (clima frío), departamento de Cundinamarca, Colombia S.A. y se trabajó en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, ambos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Los datos de espora-recuentos (\log_{10}) se analizaron estadísticamente mediante programas de la serie BMD, implementados en el computador IBM 360/44 de la Universidad Nacional de Colombia. El sexo fue la única variable que dió indicación de discriminación al ser más altos en los machos (1.80 vs 1.72) que a su vez registraron los pesos más altos.

De los 600 casos procesados en el Medio Básico Perfringens (MBP) con yema de huevo (exitosamente aplicado por primera vez a especímenes ovinos en este trabajo), 520 (87%) crecieron en dicho medio y 404 fueron sometidos a pruebas confirmativas (51%) positivos en el medio Lactoa Motilidad Nitrato (LMN). La prueba

de los nitratos fue más sensible en el Medio Agar Nitrato tradicional (que en LMN. De todas maneras su utilización se encontró que es necesaria por la excelencia confirmativa de los criterios lactosa (ácido +, gas +), motilidad (-) y hemólisis (α , β) en agar sangre ovina. Hubo una interesante correspondencia entre los halos de lecitinasa y α hemólisis y se comprobó que hay por lo menos tres niveles de reactividad entre las cepas. Mediante la técnica de sero-toxi-neutralización en ratón 80 cepas individuales de CP dieron 64% de tipo A, un 4% de tipos diferentes al A y un 32% de CPP.

Se comprobó que la infección (\log_{10} esporos) por CP y CPP en el intestino infante ovino, sigue una tendencia incremental a partir del primer muestreo 0,3 (1 a 7 días) y continúa aumentando hasta 2.4 en la sexta muestra. Hubo regresión log-log lineal significativa ($P < 0.005$) dependiendo probablemente de más de un factor ambiental. Se comprobó que los ovinos, al momento de nacer, se encuentran esencialmente libres de CP y CPP, tal hipótesis se comprobó por la presencia de un cero (0) estadístico en el primer muestreo (distribución de Poisson, $P < 0.10$).

Se estudiaron en condiciones de estabulación y luego se sacrificaron seis ovinos jóvenes aparentemente normales, para localizar cualitativa y cuantitativamente a CP y CPP. Se encontró que CP y CPP colonizan la boca (posiblemente asociados a la ruminación) hasta el recto. La estratificación descendente mostró

un marcado incremento en la misma dirección, [alcanzando recuentos de CP y CPP vegetativos hasta de $\log_{10} \geq 3$ en las porciones inferiores (colon).]

Se evaluaron las lesiones producidas por 80 cepas diferentes de CP en cuatro ovinos, con una enteropatogenicidad del 75%. Las principales lesiones histológicas (no se presentó invasión bacteriana) fueron en mucosa: [descamaciones epiteliales, necrosis de las vellosidades, congestión, hemorragia e incremento celular; en submucosa se presentó edema y congestión; en las capas musculares y adventicia se presentaron ligeros incrementos de la celularidad.]

El ovino es
Por lo tanto el ovino infante y joven es un fascinante reservorio de CP entero-toxipatogénico y de CPP (atóxico).

8. SUMMARY

Demographic variables on suckling and weanling lambs were studied with respect to Clostridium perfringens (welchii) (CP) and C. paraperfringens (CPP) spore-prevalence in the gastrointestinal tract. Physio-biochemical patterns of the strains were found of practical importance. The lambs were followed prospectively with regard to qualitative and quantitative prevalence in the different portions of the gastrointestinal tract. Lesions were surgically provoked and histopathologically studied both for CP and CPP.

Feces samples from one hundred lambs were taken six times at 30 days intervals. The lambs belonged to five different breeds from San Jorge Experimental Station in Soacha (cold climate), Cundinamarca, Colombia, S.A. and work took place at the Veterinary Medical Research Laboratory (LIMV), both belonging to the Colombian Agricultural Institute (ICA). \log_{10} sporecounts data were processed statistically by the BMD series at the IBM 360/44, National University of Colombia.

Sex was the only variable which indicated discriminatory power with CP counts being higher for males (1.80) than for females (1.72), corresponding to higher weights for the former.

Out of 600 samples studied in the Perfringens Basic Medium MBP (successfully applied for the first time to ovine specimens), 520 (87%) grew in it and 404

(51%) were confirmed positives. In the Lactose Motility Nitrate medium. Nitrate reduction testing was more sensitively done in the regular Nitrate Agar. Its use was somehow irrelevant because of the excellent confirmatory ability of the lactose (Acid +, Gas +) Motility (-) and α , β hemolysis on sheep blood agar. There was an agreement between lecithinase and α hemolysis halos, indicating at least three categories of reactivity among the isolates. Serum-toxi-neutralization in mouse showed 64% CP type A, 4% CP or other types and 32% CPP's.

The CP/CPP infection patterns in the suckling/weanling ovine followed a linear log-log regression tendency ($p < 0.005$) beginning with $\log = 0.3$ in the first sample at time 0 (1-7 days) and increasing up to 2.4 in the sixth sample. Environmental factors not well determined seem to be present. Ovines at birth are free of CP and CPP as was suggested by an statistical zero (0) in the first sample which followed a Poisson pattern ($p < 0.10$).

Confinement conditions were applied to six lambs that were then euthanized and studied for location prevalence of CP and CPP. The gastrointestinal tract is colonized along all its extension from the mouth (probably through rumination) to rectum. Stratification is evident with the higher counts $\log_{10} \geq 3$ corresponding to the lower portion (colon). The lesions produced by 80 strains were studied in four lambs, with 75% entero-toxi-pathogenicity. The main lesions (never invasive

bacterial) were upon the mucosa where desquamation of epithelium, necrosis at the villi, hyperemia, hemorrhage and cellularity were found. In the submucosa edema and hyperemia were observed. In the muscle a slight cellularity was seen.

Thus suckling (wheanling) are good reservoirs of entero-toxi-pathogenic CP and atoxic CPP.

BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ, N.; M.J. TORRES-ANJEL y B.O. OSPINA. 1975. Prevalencia de contaminación microbiológica en alimentos para aves y materias primas para su elaboración. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. 15 p. (sin publicar).
2. ANGELOTTI, R.; H.E. HALL; M.J. FOSTER and K.H. LEWIS. 1961. Quantitation of Clostridium perfringens in foods. *Appl. Microbiol.* 10(6): 193-199.
3. ARMITAGE, P. 1971. *Statistical methods in medical research.* Oxford, Blackswell Scientific Publications. p. 127.
4. BALWIN, E.M. 1965. Diagnostic Procedures for Clostridium Infections. *Proc. U.S. Livestock. San. A.* 69: 454-457.
5. BATTY, I and J.J. BULLEN. 1961. The permeability of the sheep and rabbit intestinal wall to antitoxin present in the circulation. *J. Path. Bact.* 81: 447-458.
6. BENBROOK, E.A. and M.W. SLOSS. 1965. *Veterinary Clinical Parasitology.* 3. ed. Ames, Iowa State University Press. pp. 11-17.
7. BLOOD, D.C. y J.A. HANDERSON. 1965. *Medicina Veterinaria.* 2. ed. Mexico, Interamericana. pp. 373-388.
8. BUCHANAM, R.E. and N.E. GIBBONS. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 8. ed. Baltimore, Williams and Wilkins. pp. 9, 529, 551-562.
9. BURROWS, W. 1969. *Tratado de Microbiología.* 19. ed. Mexico, Interamericana. pp. 619-625.
10. CARABALLO, L.C. 1973. Identificación y Clasificación de cepas de Clostridium. Tesis M.S. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia-Instituto Colombiano Agropecuario. 46 p. (mimeografiado).
11. CARTER, G.R. 1973. *Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology.* 2. ed. Illinois, Charles C. Thomas. pp. 125-137.

12. DAVIS, D.R. DULBECCO; H.N. EISEN; H.S. GINSBERG and W. BARRY-WOOD JUNIOR. 1973. Microbiology. 2. ed. New York, Medical Department. Harper y Row. pp. 829-841.
13. DE, S.N. and D.N. CHATTERJE. 1953. An experimental study of the mechanism of action of Vibrio cholerae on the intestinal mucus membrane. J. Path. Bact. 66: 559-562
14. DIFCO LABORATORIES. 1972. Difco Manual of dehydrated culture media and reagents for Microbiological and Clinical laboratory procedures. 9. ed. Detroit, Michigan. 350 p.
15. DIXON, W.J. 1973. BMD. Biomedical Computer Programs. 3. ed. Los Angeles, University of California. pp. 97-108, 233-253.
16. DOWELL JUNIOR, V.R. and T.M. HAWKINS. 1971. Laboratory Methods anaerobic Bacteriology. CDC, Welfare, Atlanta, U.S. Department of Health Educ. pp.. 5-28.
17. _____; M.J. TORRES-ANJEL; H.P. RIEMANN; M. MERSON; D. WHALEY and G. DARLAND. 1975. A New criterion for implicating Clostridium perfringens as the cause of food poisoning. Rev. Lat-amer. Microbiol. 17: 137-142.
18. DUNCAN, C.L. and D.H. STRONG. 1968. Improved medium for sporulation of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 16: 82-89.
19. _____ and D. H. STRONG. 1969. Experimental production of diarrhea in rabbits with Clostridium perfringens. Can. J. Microbiol. 5: 765-770.
20. _____ and D. H. STRONG. 1969. Ileal loop fluid accumulation production of Clostridium perfringens. J. Microbiology. 100: 86-94.
21. _____; H.S. SUGIYAMA and D.H. STRONG. 1968. Rabbit ileal loop response to strains of Clostridium perfringens. J. Bacteriol. 95: 1560-1566.
22. FREDETTE, V. 1964. The role of the anaerobic bacteria with particular reference to the virulence of Clostridium perfringens. Rev. Can. Biol. 23: 85-93.

23. GENIGEORGIS, G.; A. SAKAGUCHI and H. RIEMANN. 1973. Assay Methods for Clostridium perfringens Type A. Enterotoxin. Appl. Microbiol. 26: 111-115.
24. HAUSCHILD, A.H.W. 1971. Clostridium perfringens Enterotoxin. J. Milk and Food Technol. 24(12): 596-599.
25. _____. 1971. Clostridium perfringens Types B, C, D, and E. In: Microbial Toxins. New York, Academic Press. v 2. pp. 159-188.
26. _____ and R. HILSHEIMER. 1971. Purification and characteristics of the enterotoxin of Clostridium perfringens Type A. Can J. Microbiol. 17: 1425-1433.
27. _____; R. HILSHEIMER and D.W. GRIFFITH. 1974. Enumeration of Clostridium perfringens spores in egg yolk free Sulfite Cycloserine Agar. Appl. Microbiol. 27: 527-530.
28. _____; R. HILSHEIMER and C.G. ROGER. 1971. Rapid detection of Clostridium perfringens enterotoxin by a modified ligated intestinal loop technique in rabbits. Can. J. Microbiol. 17: 1475-1476.
29. _____ and L.V. HOLDEMAN. 1974. Clostridium celatum sp. nov., isolated from normal human feces. Inst. J. Syst. Bacteriol. 24: 478-481.
30. _____; L. NIILLO and W.J. DORWARD. 1967. Experimental enteritis with food poisoning and classical strain of Clostridium perfringens type A in lambs. J. Infect. Diseases. 117: 379-386.
31. _____; L. NIILLO and W.J. DORWARD. 1968. Clostridium perfringens type A infection of ligated intestinal loops in lambs. Appl. Microbiol. 16(8): 1235-1239.
32. _____; L. NIILLO and W.J. DORWARD. 1970. Enteropathogenic factor of food poisoning Clostridium perfringens type A. Can. J. Microbiol. 16: 331-338.
33. _____; L. NIILLO and W.J. DORWARD. 1970. Response of ligated intestinal loops in lambs to an enteropathogenic factor of Clostridium perfringens type A. Can. J. Microbiol. 16: 339-343.

34. HAUSCHILD, A.H.W.; L. NIILLO and W.J. DORWARD. 1970. The role of enterotoxin in Clostridium perfringens type A enteritis. Can. J. Microbiol. 17: 987-991.
35. _____; M.J. WALCROFT and CAMBELL. 1971. Emesis and diarrhea induced by enterotoxin of Clostridium perfringens type A in monkeys. Can. J. Microbiol. 17: 1141-1143.
36. ISPOLATOVSKAYA, M.V. 1971. Type A Clostridium perfringens Toxins. In: Microbial Toxins. New York, Academic Press. pp. 109-158.
37. JUBB, K.V.F. y P.C. KENNEDY. 1974. Patología de los animales domésticos. Barcelona, Labor. pp. 132-142.
38. KATICH, R.V. 1973. Les oedemes malins. Pathogénie. Therapie. Prophylaxie. Paris, Office International des Epizooties. 218 p.
39. MANRIQUE, G. 1972. Detection of Clostridium toxins from tissues. Ph.D. Tesis. Texas, AEM University, College Station. 91 p. (mimeografiado).
40. MARSH, H. 1969. Enfermedades de los lanares. Trad. por Stela Montes de Oca. Buenos Aires, Troquel . pp. 23-37.
41. MC DONEL, J.L. 1974. In vivo effects of Clostridium perfringens enteropathogenic factors on the rat ileum. Infect. Imm. 10: 1156-1162.
42. _____ and C.L. DUNCAN. 1975. Histopathological affect of Clostridium perfringens enterotoxin in the rabbit ileum. Infect. Imm. 12: 1214-1218.
43. MERCHANT, I.A. and R.A. PACKER. 1967. Veterinary Bacteriology and Virology. 7. ed. Iowa, State University Press. pp. 407-410.
44. NIILLO, L. 1971. Mechanism of action of the Enteropathogenic factor of Clostridium perfringens type A. Infect. Imm. 3: 100-106.
45. _____. 1972. The effect of enterotoxin of Clostridium perfringens on the sistemic blood pressure of sheep. Res. Vet. Sci. 13: 503-505.

46. NIILLO, L. 1973. Effect on calves of the intravenous injection of the enterotoxin of Clostridium welchii type A. J. Comp. Path. 83: 265-269.
47. _____. 1975. Measurement of biological activities of purified and crude enterotoxin of Clostridium perfringens. Infect. Imm. 12: 440-442.
48. _____ and W.J. DORWARD. 1971. The effect of enterotoxigenic Clostridium welchii type A on the bovine intestine. Res. Vet. Sci. 12: 376-378
49. PIVNICK, H.; A.F.S.A. HABBEH; A. GORENSTEIN; P.F. STUAR and A.H. W. HAUSHILD. 1963. Effect of pH on toxinogenesis by Clostridium perfringens type C. Can. J. Microbiol. 10: 329-344.
50. SKJELKVALE, R. and C. DUCAN. 1975. Enterotoxin formation by different toxigenic types of Clostridium perfringens. Infect. Imm. 11: 563-575.
51. SMITH, L. and L.V. HOLDEMAN. 1968. The pathogenic anaerobic bacteria. Illinois, Charles C. Thomas. pp. 185-255.
52. STARK, L.R. and C.L. DUNCAN. 1971. Biological characteristics of Clostridium perfringens type A enterotoxin. Infect. Imm. 4: 89-96.
53. TAYLOR, J.; M.P. MALTBY and J.M. PAYNE. 1958. Factors influencing the response of ligated rabbit-gut segments to injected Escherichia coli. J. Path. Bact. 76: 491-499.
54. TORRES-ANJEL, M.J. 1974. Study of Enterotoxigenic Clostridium perfringens type A Infections and Shedding in Healthy Humans and Development of Diagnostic Fluorescent Antibody Techniques. Ph.D. Thesis California, University of Davis. 124 p.
55. _____; H. CARRILLO, V. COTRINO and H. MORALES. 1969. Estudio inicial de la contaminación por enterobacteriáceas en concentrados para animales. Recuento y aislamiento de coliformes. Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. (Colombia). 32: 27-37.
56. _____; H.P. RIEMANN and P. BRANT. 1975. Enterotoxigenic Clostridium perfringens type A. in select humans. II. A. cohort study. Rev. Lat-amer Microbiol. 17: 199-205.

57. VANCE, H.N. 1967. A survey of the alimentary tract of cattle for Clostridium perfringens. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 31: 260-264.
58. VIRGINIA POLITECHNIC INSTITUTE. 1973. Anaerobe laboratory Manual. 2. ed. Virginia, Holdeman and W.E.C. Moore, pp. 1-9, 67-85.