

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Diego Ortiz¹ y Luis Carlos Villamil²

ABSTRACT

Anaerobic soil bacteria causing sudden death in cattle feeding on tropical savannahs: research in Colombia

The study of the clostridiosis in Colombia must be a priority for sanitary authorities due to the sanitary and economic impact caused by these bacteria. Disease clinical signs and symptoms, and effect on animals in good meat condition suppose a high financial impact. This article reviews major research in clostridiosis in recent years, published in scientific and gray literature. Emphasis is made on bovine sudden death, which includes a number of diseases among them botulism produced by neurotoxins type C and D of *Clostridium botulinum*; black leg caused by *Clostridium chauvoei* and to a lesser extent tetanus, caused by *Clostridium tetani*. Some progress in standardization of laboratory and field methodologies is reported, as well epidemiology in areas affected by these diseases. We conclude with a prospective proposal of research in clostridia and clostridiosis, as well as some ideas on alternative solutions to the problems discussed.

Key words: Bovine sudden death, *Clostridium*, bovine botulism, symptomatic anthrax, blackquarter, tetanus, epidemiology, animal health, public health.

Radicado: enero 25 de 2008
Aceptado: junio 6 de 2008

1. Investigador Magíster. Programa Nacional de Investigación en Salud Animal. Centro de Investigación en Salud y Producción Animal CEISA. CORPOICA. Avenida El Dorado N° 42-42. Bogotá D.C., Colombia. e-mail: dortiz@corpoica.org.co
2. Profesor Asociado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. e-mail: lcwillamilj@unal.edu.co. Profesor Asociado, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de La Salle, Bogotá.

Bacterias anaerobias del suelo responsables de la muerte súbita bovina en sabanas tropicales: investigaciones realizadas en Colombia

RESUMEN

El estudio de las clostridiosis en Colombia debe ser una prioridad para nuestras autoridades sanitarias debido al impacto sanitario que causan estas bacterias en la salud animal. Así mismo, la agudeza de los signos y síntomas clínicos de estas patologías, y el hecho que afectan animales en buenas condiciones de carne, hacen que tengan fuerte impacto económico. Se presenta una revisión de las principales investigaciones realizadas sobre clostridiosis en los últimos años, algunas publicadas en literatura científica y otras en literatura gris. Se hace énfasis en la muerte súbita bovina, condición que incluye varias patologías entre las que se destacan el botulismo bovino producido por las neurotoxinas tipo C y D de *Clostridium botulinum*, el carbón sintomático (pierna negra) causado por *Clostridium chauvoei* y en menor proporción el tétanos, causado por el *Clostridium tetani*. Se reportan algunos avances en la estandarización de metodologías de diagnóstico en laboratorio y en campo, lo mismo que resultados de estudios epidemiológicos desarrollados en zonas afectadas por estas enfermedades. Finalmente, se presenta una visión prospectiva sobre la investigación en los clostridios y las clostridiosis, lo mismo que algunas propuestas de solución a la problemática discutida.

Palabras clave: Muerte súbita bovina, *Clostridium*, botulismo bovino, pierna negra, carbón sintomático, tétanos, epidemiología, salud animal, salud pública.

INTRODUCCIÓN

EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS anaerobias asociadas al suelo, desde una perspectiva clínica y epidemiológica en salud animal, no ha sido objeto de mayor atención por parte de los grupos de investigación, en contraste con la distribución de dichos gérmenes y el impacto negativo que ocasionan en la ganadería.

Teniendo en cuenta lo anterior, desde el año 1994, bajo la orientación del Programa Nacional de Investigación en Salud Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –CORPOICA–, se consolidó un grupo de investigadores de varias instituciones (Universidad Nacional de Colombia, Universidad de La Salle, Empresa Colombiana de Productos Veterinarios –VECOL–, Ministerio de Agricultura y PRONATTA) aunando fortalezas en el tema de las bacterias anaerobias esporuladas asociadas al suelo (Ortiz *et al.*, 2004).

Este grupo estudió la problemática de los productores agropecuarios relacionada con la mortalidad epidémica de bovinos en aparente buena condición de salud y conocida como ‘muerte súbita’. Estos bovinos no presentan signos y sín-

tomas clínicos pero mueren de improviso y, en muchos casos, no se encuentran lesiones de ningún tipo por la agudeza de la enfermedad, por lo que el diagnóstico patológico, clínico, microbiológico o de otra índole, es difícil y confuso para veterinarios de campo y productores.

En este artículo se presenta una síntesis sobre la situación de esta enfermedad en Colombia, los principales resultados sanitarios, las proyecciones y metas para corto y mediano plazos en el contexto de la investigación, la prevención y el control de este grupo de enfermedades que afectan la salud animal y en ocasiones la salud humana.

1. BACTERIAS ANAEROBIAS

La importancia de las patologías que afectan la industria ganadera se deriva del impacto económico que ocasionan, su morbilidad y mortalidad, el costo de los tratamientos y el papel que desempeñan en la salud humana como enfermedades zoonóticas o como intoxicaciones alimentarias (Reyes *et al.*, 2004). Los clostridios son un grupo de bacterias patógenas asociadas al suelo que ocupan un lugar importante en los sistemas de producción ganaderos, ya que pueden causar alta

morbilidad y mortalidad de animales, ya sea por infecciones o por las toxinas que producen, las cuales afectan los animales de manera aguda causando pérdidas económicas a los ganaderos. Las clostridiosis han ocupado un lugar importante en los sistemas de producción ganaderos del mundo y de nuestro país durante varias décadas (Ortiz *et al.*, 2001 a,b).

En 1880, Pramowski agrupó en el género *Clostridium* a aquellas bacterias anaerobias capaces de producir fermentación y esporular (Vadillo *et al.*, 2002). Actualmente el género lo constituyen más de cien especies que se subdividen en tres grupos: 1) *No patógenas*, que son la mayoría, y de las cuales algunas tienen aplicaciones de interés en la industria (Jaimes *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2006); 2) *Medianamente patógenas*, con cerca de 30 especies; y 3) *Altamente patógenas*, con 13 especies (Titball *et al.*, 2003). La clasificación de los microorganismos pertenecientes a este género se ha establecido tradicionalmente de acuerdo con las características morfológicas, culturales y bioquímicas, asociación con determinadas enfermedades, patogenicidad, toxigenidad y propiedades serológicas (Titball *et al.*, 2003).

Sin embargo, en los últimos tiempos esta clasificación se basa en homología existentes en la secuencia del ADN y del ARN ribosómico 16S. El contenido de guanina y citosina del ADN (% de G+C) de la especie *Clostridium butyricum* está entre 27% y 28%; sin embargo, en el resto de las especies varía de 22% a 55%. La amplia diversidad en el porcentaje de G+C de las especies del género *Clostridium* sugiere que éste podría dividirse al menos en dos géneros: las especies con un contenido en G+C del 22% al 34% y aquellas que tienen de 40% a 55% (Quinnand y Markey, 2003).

2. DISTRIBUCIÓN

El género *Clostridium* causa un complejo número de enfermedades agrupadas bajo el denominador común de 'clostridiosis'. Las bacterias que forman parte de este grupo se refieren comúnmente como clostridios (Carter y Chengapa, 1991).

Los clostridios se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y muchos son saprófitos inoos, pero

algunos de ellos son altamente patógenos y se encuentran relacionados clínicamente y epidemiológicamente con el suelo que es su hábitat natural. En su forma vegetativa el microorganismo es habitante común del sistema digestivo de los rumiantes y se puede distribuir en variadas zonas por esta vía. Una vez sale del organismo las bacterias producen formas resistentes a las adversidades ambientales (esporas). Debido a esa gran relación con suelos y animales, por su efecto nocivo sobre los mismos, se hace necesario describir al grupo patógeno como bacterias asociadas al suelo (Gamboa *et al.*, 1993; Seifert, 1996).

El entendimiento de la patogénesis, de la epidemiología y de su diagnóstico permitirán determinar en Colombia la distribución de dichas bacterias para facilitar con esta importante herramienta la toma de decisiones a fin de lograr la prevención y control de las clostridiosis. Estas condiciones tienen como base un conocimiento adecuado de la bacteria y de su relación con el ecosistema y los animales; así mismo, de las toxinas que producen y de múltiples factores que son desconocidos en muchas de estas patologías y que requieren el desarrollo de estudios epidemiológicos diseñados adecuadamente de acuerdo con las condiciones de cada sistema de producción (Fernández *et al.*, 1989; Ortiz, 2000a,b).

3. DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN EN CLOSTRIDIOSIS

Con base en las anteriores consideraciones el grupo de investigación de bacterias anaerobias asociadas al suelo de Corpoica inició sus trabajos en la década de los noventa del siglo pasado, definiendo puntos críticos en el tema de salud animal con profesionales de varias zonas del país en donde las funciones del grupo se resumían en: "...caracterizar, evaluar y proponer alternativas de solución en limitantes en salud y producción animal", ya que el problema central definido por el grupo era una deficiente caracterización de las limitantes en salud y producción animal por áreas agro-ecológicas y su impacto socioeconómico (Lobo, 1994).

Se consideró que la falta de métodos y técnicas de diagnóstico apropiadas consti-

tuían la causa de un deficiente servicio de diagnóstico —situación que no ha cambiado mucho—, principalmente en enfermedades de impacto económico como las que nos ocupan en este artículo, sumado a una escasez de estudios epidemiológicos que permitieran entender adecuadamente la problemática ganadera para tomar decisiones correctas.

En este sentido se señala la importancia de la epidemiología como la disciplina que permite conocer la situación de las enfermedades y sus tendencias, y constituye el elemento clave para la formulación de políticas y directrices, así como para la toma de decisiones en los programas de prevención y control. Las pruebas diagnósticas de adecuada versatilidad y altas sensibilidad y especificidad constituyen la herramienta central en epidemiología (Thrusfield, 1990; Martin *et al.*, 1997).

Estos argumentos permitieron generar propuestas de investigación encaminadas a implementar técnicas que facilitarían el diagnóstico de dichas patologías a partir de tejidos fijados en formol, pues se indicaba que una de las limitantes de importancia era la dificultad que enfrentaba el productor para enviar las muestras al laboratorio; generalmente los reportes de laboratorio indicaban mal estado o muestras en estado avanzado de autólisis y no se procesaban, por lo cual no se obtenían diagnósticos confirmativos.

Los avances de investigación en esta etapa se dirigieron a la revisión de literatura y a la adecuación de laboratorios, equipos y el establecimiento de técnicas convencionales de inclusión en parafina con coloraciones básicas.

4. PROBLEMAS Y SOLUCIONES

En Colombia los trabajos sobre clostridiosis son escasos. Diana Obregón (2002) en su libro *Batalla contra la lepra* indica que entre los años 1906 y 1923 el Dr. Federico Lleras Acosta —discípulo del Dr. Claude Vericel—, realizó investigaciones en carbón sintomático, por lo cual lo nombran miembro de número de la Academia Nacional de Medicina. En la década de los 70 se realizó una tesis de maestría en el Programa de Educación de Graduados (PEG) del Instituto Colombiano Agropecuario

(Universidad Nacional de Colombia) que utilizó la técnica de inmunofluorescencia para identificar clostridios asociados a casos de carbonos en bovinos. El Dr. Caraballo trabajó con 100 muestras de material patológico originarias de varias especies animales, las cuales llegaron al laboratorio de bacteriología diagnóstica del Laboratorio de Investigaciones Médico Veterinario (LIMV); se pudieron tipificar 16 cepas de *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. histoliticum* y *C. tertium*, de un total de 60 cepas sometidas a cultivos en medios líquidos y sólidos e inoculaciones en curies (Caraballo, 1973). En el mes de junio de 1980, González, Rodríguez y Orrego, publicaron el documento *Enterotoxemia de los equinos* en el cual esta patología se resalta como causa de enormes pérdidas económicas en los sistemas de producción en los cuales la economía depende de la utilización de caballos. En esta publicación se destacan una gran cantidad de factores causales y se ofrecen al productor algunas recomendaciones para prevenir y contrarrestar el problema.

4.1. Muerte súbita bovina

A continuación se presentan los problemas analizados y las soluciones ofrecidas a los productores desde la perspectiva de las investigaciones hasta hoy conducidas, con miras a la prevención y el control de esta enfermedad. Primero se relaciona la problemática de muerte súbita que afectó la ganadería en la década de los noventa, después se describen los principales avances en relación con *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* y *Clostridium chauvoei*.

En el segundo semestre del año 1994 los ganaderos de la Altillanura plana colombiana enfrentaron una epidemia de mortalidad súbita que afectaba animales de muy buena condición corporal, principalmente hembras gestantes o recién paridas, la cual ocasionaba elevadas pérdidas económicas (Ortiz, 2000 a,b). Varios investigadores visitaron la zona afectada y señalaron la importancia de las clostridiosis, específicamente con las muertes relacionadas con *Clostridium botulinum*, bacteria que ya se había reportado en el año de 1977 como causa de mortalidad epidémica en dicha zona; se relacionó la mortalidad con las deficiencias nutricionales de los animales derivadas de la pobreza en macro y micro nutrientes de los suelos ligado al problema de des-

equilibrio medioambiental (CIAT, 1977; Lebdoesoedkojo, 1977 y 1980).

En el informe anual del Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT de 1977 relativo a investigaciones realizadas en la Altillanura plana se identificaron como problemas principales en las explotaciones ganaderas: 1) las enfermedades relacionadas con deficiencias nutricionales (leptospirosis y otras); 2) las enfermedades que tienden a incrementarse a medida que aumenta la densidad de población animal debido a una menor disponibilidad de alimentos; aquí se incluyen el parasitismo gastrointestinal, la rinotraqueitis viral infecciosa de los bovinos y las infecciones virales respiratorias. Se comprobó una relación directa entre el contenido de fósforo de la pradera y el contenido de fósforo de la sangre; además, el bajo contenido de fósforo de estos suelos tropicales y de las gramíneas nativas también conduce a la condición denominada 'pica' o apetito desmedido que predispone a los animales al botulismo, una condición tóxica que, sin lugar a dudas, produjo la muerte de varios animales en ese año en las inmediaciones de la Estación Experimental de Carimagua (Figura 1). Por otra parte, la condición física de los bovinos conocida como 'secadera' se presentó más frecuentemente en vacas en el estado lactante-vacía que pastoreaban *Melinis minutiflora* durante la estación seca: los animales presentaron consistentemente valores promedio menores a lo normal con relación a las concentraciones de proteína total, albúmina, globulina, hematocrito, hemoglobina, urea, glucosa, magnesio, potasio y peso que animales en la misma condición reproductiva que pastoreaban otras especies. Estos resultados confirmaban la hipótesis de que el estrés de la lactancia, sin nutrición adecuada, jugaba el papel más importante en la aparición



Figura 1. Altillanura plana colombiana. Hembra Cebú Brahman con baja condición corporal consumiendo huesos de animal muerto (osteofagia).

de este síndrome, junto con las infecciones secundarias y las enfermedades parasitarias (CIAT, 1977).

Se concluyó que la ocurrencia de 'enterramiento' se relacionaba con la desnutrición y, un poco menos evidentemente, con fracturas óseas, lo cual se manifestaba en especialmente en los meses de sequía cuando escasea el material forrajero, aún en praderas mejoradas que ofrecen pastos de menor calidad en esa estación. Si se acepta la opinión generalizada acerca de que el 'enterramiento' lleva a la muerte de aquellos animales con mala condición física, es posible inferir que estos casos podrían asociarse a la casuística de desnutrición, convirtiéndose este problema en el más importante en el área de estudio desde el punto de vista de la mortalidad. Por otro lado, considerando que la etiología de las fracturas óseas se relaciona con carencias nutricionales que pueden coincidir o verse determinadas por la sequía, el cuadro de la desnutrición es objetivamente un problema prioritario por resolver. En ese trabajo se registraron 541 casos de muerte en bovinos por causas patológicas de los cuales 51% correspondió a 'enterramiento', desnutrición y fracturas óseas; en 20% de las muertes la causa no se pudo diagnosticar.

Barrera y Cortés (1994) citados por Parra *et al.* (1997), evaluaron 18 fincas del Alto Vichada, específicamente en las Sabanas de Carimagua, El Viento y Santa Rosalía, dieron cuenta de un evento que afectaba a animales con buena condición corporal que mostraban dificultad en la marcha, presentaban decúbito y morían en un tiempo variable de 1 a 20 días; de esta condición se recuperaban muy pocos bovinos, lo cual ocurrió en un 28% de los predios afectados (5 de 18) con una mortalidad general estimada del 1% (50 animales de 4.330). Así mismo, en forma simultánea observaron enfermedad vesicular en 14 de 18 fincas (78%), lo que fue confirmado posteriormente por Morales, Peña y García³ como aftosa tipo A (Parra *et al.*, 1997).

Uribe (1995), haciendo referencia a su investigación sobre el problema de mor-

3. Morales, G., N. Peña y O. García (1994). Informe de la comisión realizada a los departamentos del Meta y Vichada para atender una emergencia sanitaria en bovinos. Unidad Información y Vigilancia Epidemiológica, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. 16 p.

talidad bovina en los departamentos del Meta y Vichada, afirma: "...Se ha hallado que, respecto a la enfermedad que nos ocupa, el porcentaje más alto de letalidad (superior al 80%) se encuentra en vacas paridas, luego en vacas preñadas (15%) y finalmente en novillas (5%). La mortalidad en machos y/o terneros ha sido inexistente hasta el momento. En referencia a vacas paridas, se implica que éstas se encuentran amamantando un becerro y que los requerimientos nutricionales de la hembra que amamanta su cría se encuentran incrementados por un factor proporcional a la cantidad de leche producida". Considera que ante la muerte de más de 6.000 animales denunciada por ganaderos de las zonas afectadas ante las autoridades competentes, y expresada en cifras económicas, representa una pérdida millonaria para la ganadería del país, por lo que es necesario investigar profundamente su causa(s) y sus efectos (Uribe, 1995).

En su informe final, Uribe concluye que los animales se encuentran en una situación crítica respecto de sus balances minerales: en la mayoría de los casos solamente encuentran un tipo de pasto para consumir, las sales mineralizadas que se les ofrecen no copan sus exigencias minerales, viven en potreros muy bien cercados y no existen fuentes naturales donde saciar sus instintos nutricionales. Bajo estas condiciones se dice que el animal desarrolla 'pica', 'malacia' o 'depravación del gusto', cuando según parece es un intento natural del animal por compensar un error humano al no interpretar correctamente sus tendencias compensatorias naturales. Cuando el animal consume huesos o material orgánico en descomposición para satisfacer sus deficiencias naturales suele morir de botulismo. Las deficiencias nutricionales, especialmente de fósforo, se derivan de su insuficiencia en la ración de los animales porque los suelos ácidos reducen su disponibilidad en los forrajes, además de un alto contenido de aluminio intercambiable, lo que induce la formación de compuestos insolubles con el fósforo que causan deficiencias secundarias por exceso de aluminio en la ración, situación que promueve el consumo de huesos contaminados. Confirmó que logró aislar de los cadáveres de bovinos muertos por esta enfermedad una bacteria con las características del *Clostridium botulinum* por lo cual la mortalidad y sintomatología son compati-

bles con el botulismo. En este trabajo no se confirma la causa etiológica del problema, pero a partir de sus observaciones postula la intoxicación con neurotoxinas botulínicas como causantes del brote epidémico de mortalidad (Uribe, 1996).

Por otra parte, Parra *et al.* (1997) concluyeron en otro estudio que la subnutrición continua es quizá la causa principal que predispone a un mayor riesgo de enfermedad, que se traduce en lento desarrollo corporal, ineficiencia reproductiva y mortalidad, aspectos que afectan económicamente el sistema de producción extensivo/extractivo de la Altillanura y el Vichada. Aunque no sólo las vacas estaban involucradas en los eventos de mortalidad, sí era preocupante y económicamente importante para este sistema de producción que este grupo etéreo estuviera involucrado; la mortalidad más alta se encontró en terneras (11%), toros (9%) y vacas (7,6%), afectando los animales capital de cría y los animales producto. Sus investigaciones señalaron que el problema básico era la subnutrición múltiple y continuada, no sólo de macro y microminerales vitales, sino de energía y proteína. Las deficiencias de fósforo y calcio conllevan a los bovinos (herbívoros natos) a buscar estos elementos en otros sitios, alterando su comportamiento alimenticio normal al ingerir carroña, tierra, cemento, etc. Un intenso desbalance nutricional puede ocasionar la caída de vacas y novillas por hipocalcemia, hipomagnesemia, hipofosfatemia e hipoproteïnemia; estas deficiencias simultáneas podrían ser consistentes con síntomas nerviosos como los que relataban los productores de la región. De otro lado, los animales buscan fuentes ricas en minerales como huesos y carroña para suplir rápidamente sus requerimientos, pudiendo entonces presentar intoxicaciones por toxina botulínica y otras toxinas propias de la descomposición bacteriana de las proteínas; en este último caso la intoxicación es una consecuencia y no la causa primaria del problema. Sugieren que el botulismo, la rabia y la intoxicación por plantas son las tres causas más importantes de mortalidad en la Altillanura colombiana.

4.1.1. *Clostridium botulinum*. La enfermedad causada por esta bacteria se conoce con el nombre de 'botulismo' y no es infección sino una intoxicación alimentaria generada por la ingestión de toxinas

termolábiles producidas por *Clostridium botulinum* consumidas por vacas en gestación y vacas lactantes con buena condición corporal; la enfermedad siempre se ha asociado con situaciones de mortalidad en sabanas tropicales (Ortiz, Villamil y Benavides, 2001 a,b,c,d).

Cuando muere un animal que alberga en su tracto digestivo *C. botulinum*, su organismo es invadido por esta bacteria, la cual produce gran cantidad de toxina; además, se multiplica rápidamente sobre el material orgánico en descomposición (silos, henos, concentrados, etc.) contaminándolo y ocasionando la muerte a los bovinos que lo consumen. Las esporas de *C. botulinum* se ingieren generalmente con el material tóxico y, después que el animal muere de botulismo, su cadáver es así mismo invadido, por lo que constituye un riesgo potencial para otros animales. Se forman también muchas esporas que contaminan densamente el suelo por debajo y alrededor del cadáver (De Souza y Langenegger, 1987).

Una vez producida, la toxina es capaz de sobrevivir por largos períodos, sobretudo en el interior de los huesos (Blood, Henderson y Radostits, 1988). La enfermedad suele adoptar la forma de brote en regiones deficientes en fósforo donde el ganado desarrolla osteofagia (consumo de huesos) y alotriofagia (conducta de consumir alimentos diferentes a los de su dieta normal) buscando suplir sus deficiencias (CIAT, 1977).

4.1.2. Intervenciones de campo y de laboratorio. El brote de botulismo ocurrido en Colombia a mediados de la década del noventa en la región de la Altillanura fue avocado por varios grupos de investigación que enfrentaron la epidemia de diferentes formas (Uribe, 1996; Parra *et al.*, 1997; Benavides *et al.*, 1997; Brito *et al.*, 1998; Benavides *et al.*, 2000; Ortiz, 2000 a,b).

Como respuesta a esta epidemia de mortalidad bovina en la Orinoquía se estandarizaron protocolos de campo y de laboratorio orientados a lograr la confirmación diagnóstica de botulismo en la zona afectada (Dowel y Hawkins, 1976; De Souza y Langenegger, 1987; Center for Disease Control, 1987; Hatheway, 1988 y 1990; Ortiz, 1990 y 1991; Linares y Már-

quez, 1993; Dutra *et al.*, 1993; Lisbôa *et al.*, 1996; Ortiz, 2000 a,b; Benavides *et al.*, 1996 a,b,c; Benavides *et al.*, 1997 a,b).

Los protocolos de campo comportaron diagnósticos tentativos basados en la ocurrencia de sintomatología neuromotora (parálisis motriz progresiva) y su relación con la conducta de alotrofagia en praderas pobres en fósforo; así mismo, por otro tipo de evidencia epidemiológica como el hallazgo de animales muertos en las praderas sin antecedentes previos (Blood, Henderson y Radostits, 1988). Se determinó que las muestras de elección para un diagnóstico adecuado deberían incluir suero sanguíneo, contenido ruminal, contenido intestinal e hígado de los animales afectados, enviando como mínimo 250 g de muestra que debía ser obtenida de animales sacrificados o recientemente fallecidos, que no presentaran descomposición; las muestras se enviaban refrigeradas entre 5 y 8°C, empacadas en bolsas estériles y debidamente rotuladas (Hatheway, 1988 y 1990).

Con estas muestras se estandarizaron los protocolos de toxicidad en ratones y posteriormente los de neutralización con antitoxinas específicas (se usaron inmuno-reactivos de referencia importados del Center for Disease Control, Atlanta, EUA). Se pudo comprobar de forma inequívoca la actividad de neurotoxinas de *Clostridium botulinum* de los tipos A, C y D compatibles con botulismo bovino en los casos de enfermedad neuromotora del ganado de la Altillanura (Benavides, Ortiz y Benavides, 2000); en el período comprendido entre 1995 y 1997 se procesaron muestras de 37 casos de mortalidad, de los cuales 22 demostraron alguna toxicidad en ratones, si bien sólo en tres de ellos se comprobó la presencia de toxinas botulínicas; por otra parte, durante el período 1998-1999 se procesaron 34 casos de los cuales ocho demostraron actividad tóxica y de éstos, tres se confirmaron como botulismo (Figura 2) (Ortiz, Villamil y Benavides, 2001 a,b,c,d; Ortiz y Benavides, 2002 a,b). Se demostró además la actividad de toxinas termoestables de *Clostridium tetani*, causante del tétanos, en algunos casos en que la toxina presente no fue inhibida por el calor (termolabilidad); sin embargo no se pudo determinar si la presencia de la bacteria se relacionaba con casos clínicos debido



Figura 2. Prueba de seroneutralización en ratones (*Mus musculus*): observar el abdomen encintado, síntoma típico de intoxicación alimentaria por neurotoxinas de *Clostridium botulinum*.

a que nunca se encontraron evidencias de heridas o lesiones que indicaran infección (Singh y Read, 1995; Benavides, Ortiz y Benavides, 2000).

Durante el período comprendido entre 1997 y 2000 se adelantaron investigaciones epidemiológicas tendientes a describir el patrón de la enfermedad en el campo y determinar la presencia de factores de riesgo de ocurrencia de estos eventos (Ortiz, 2000a; Ortiz, Villamil y Benavides, 2001 a,b,c,d). Los estudios epidemiológicos adelantados por el Programa Nacional de Investigación en Salud Animal de CORPOICA brindaron importante información para coadyuvar en el diseño de estrategias de control. En una encuesta transversal (Ortiz, Villamil y Benavides, 2001b) que tuvo lugar en los cuatro departamentos de la Orinoquía (Meta, Vichada, Arauca y Casanare), se demostró que la prevalencia promedio de fincas afectadas por el Síndrome Neuromotora Bovino fue de 35% (IC 95% 30 - 40). Las prevalencias encontradas en Meta y Vichada fueron de 43% y 36% respectivamente, indicando que los departamentos localizados en la margen derecha del río Meta fueron los más afectados. Sin embargo, las prevalencias encontradas en

los departamentos de Arauca y Casanare fueron de 4% y 34%, lo cual dio indicios que la problemática se extendió a los departamentos de la margen izquierda del río Meta. De acuerdo con estas cifras se pudo comprobar el impacto real que ocasiona la enfermedad en la ganadería de la Orinoquía colombiana y su distribución geográfica (Tabla 1).

Se demostró que el consumo de huevos por parte de los animales resultó ser el factor de riesgo que presentó mayor fuerza de asociación (RP= 3,45 IC 95% 2,11 - 5,68; P< 0,001). Muchos trabajos realizados en la zona han demostrado que el bajo contenido de fósforo de los suelos tropicales y las gramíneas nativas induce la condición de alotrofagia; ésta predispone a los animales a sufrir muchas condiciones patológicas, no sólo por la intoxicación alimentaria que puede ocurrir al consumir toxinas producidas por bacterias anaerobias (principalmente *Clostridium spp.*), sino porque estos elementos descompuestos son un foco permanente de muchas infecciones.

Se demostró que aquellas fincas en las que no quemaban la sabana nativa en verano poseían mayor probabilidad de presentar este tipo de mortalidad (Tabla 2). Esta información sustentó las recomendaciones prácticas de quemar y enterrar los animales muertos para disminuir la diseminación de esporas y de mejorar el suministro de sal mineralizada como una manera de combatir la alotrofagia por parte de los animales (Ortiz, 2000 a,b).

De acuerdo con los resultados obtenidos y las experiencias adquiridas con los productores se recomendaron estrategias de prevención y control a través de días de campo y conferencias en las zonas de riesgo y por medio de publicaciones técnicas (folletos y cartillas) que fueron

Tabla 1. Relación de fincas afectadas y porcentajes de mortalidad aproximada por departamento atribuidos al Síndrome Neuromotora Bovino (SNB).

Factor	Arauca	Casanare	Meta	Vichada	P
% Fincas afectadas	3,84 a	34 b	43,2 b	36,0 b	0,003
IC 95%	0,07 - 7,6	29 - 40	37 - 49	33 - 39	
% Mortalidad aproximada por SNB	0,28 a	1,12 b	1,25 b	1,44 b	0,010
IC 95%	0 - 1,4	0,2 - 2,1	0,7 - 1,8	1,1 - 1,8	

IC 95%: intervalo de confianza al 95%. Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos; P: nivel de significancia.

Tabla 2. Mortalidad por el Síndrome Neuroparalítico Bovino y variables de asociación para determinar factores de riesgo.

Tipo de variable	RP	IC	P
Quema Sabana Nativa Verano	1,97	1,19 - 3,25	0,0043
Plantas Toxicas	1,71	1,05 - 2,78	0,02
Consumo de huesos	3,45	2,11 - 5,68	0,00000009
Sistema Cría	2,46	1,10 - 5,55	0,014

RP: razón de probabilidades; IC: intervalo de confianza al 95%; P: nivel de significancia.

financiados por el Ministerio de Agricultura (<http://www.pronatta.gov.co>).

Un segundo estudio epidemiológico realizado (Ortiz, Villamil y Benavides, 2001 a,c) demostró que el grupo con mayor riesgo de sufrir la enfermedad eran las hembras mayores de dos años de edad en buena condición corporal. Los resultados indicaron que la mortalidad se presentaba principalmente en las épocas de lluvias y que concordaba con los máximos picos de precipitación pluvial (Ortiz, 2000 a,b). Se demostró además, que el consumo de huesos estaba relacionado con deficiencias minerales (France, 1989; Ortiz, 2000 a,b).

En el período 2000-2001 se desarrolló una encuesta de opinión que se aplicó a 180 productores de la Orinoquía colombiana con el objeto de conocer las prácticas que los ganaderos implementaban para el control de enfermedades causadas principalmente por bacterias del género *Clostridium spp.* en sus hatos; así mismo, para conocer sus percepciones y conceptos sobre los biológicos que utilizaban o que existían en el mercado como método preventivo para evitar dichas enfermedades y para determinar el impacto real que estas enfermedades ocasionaban en la zona.

El levantamiento epidemiológico del estudio se desarrolló tomando como unidad muestral el hato. Como marco de muestreo se consideró el total de ganaderos de la región bajo estudio. La distribución de las encuestas se programó en cinco regiones fisiográficas de la Orinoquía colombiana: Altillanura plana, Altillanura disectada, Orinoquía inundable, Valles aluviales ricos y Piedemonte Llanero. El tiempo de duración del estudio fue de un año (2002). El tamaño de la muestra se determinó siguiendo una metodología que permite estimar la prevalencia de una enfermedad en poblaciones grandes y la fase de muestreo se planteó bajo criterios epidemiológicos de muestreo probabilístico, esto es, 'muestreo por conveniencia'.

Los productores entrevistados utilizaban medidas sanitarias preventivas como la inmunización contra enfermedades virales (fiebre aftosa, rabia, estomatitis vesicular, rinotraqueítis infecciosa bovina). En las zonas de Piedemonte Llanero, Valles aluviales ricos y Orinoquía inundable, los ganaderos utilizaban también las vacunas contra la rabia. En la opinión de los encuestados, las clostridiosis desempeñaban un papel importante. Se destacaba la tradición de emplear vacunas comerciales conocidas como 'vacuna triple' (nombre comercial) que previe-

ne contra el carbón sintomático (pierna negra), el edema maligno y la septicemia hemorrágica. La composición de las diferentes vacunas triples mencionadas por los productores era variable: algunas incluían tres tipos de antígenos (*Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* y *Pasteurella multocida*); en otras hasta siete tipos de antígenos (*Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* y *Pasteurella haemolytica*) (Tabla 3).

En Colombia no existen estudios o indicaciones para el productor que le recomienden el uso de determinado tipo de inmunógeno. En la región fisiográfica de la Altillanura plana el 37,1% de los ganaderos utilizan toxoides botulínicos que no se producen en el país sino que se importan. Los resultados de esta encuesta deben interpretarse cuidadosamente ya que reflejan la respuesta subjetiva que los ganaderos aportaron y que dependen de las percepciones que tienen, de las campañas que desarrollan los diferentes laboratorios en la zona y de la información que le brindan a los productores los institutos gubernamentales que velan por la salud animal. En este sentido, la unificación de criterios y la formulación de políticas sanitarias deben constituir una prioridad para las autoridades de salud (Ortiz, Rodríguez y Benavides, 2008 -en prensa-).

Simultáneamente se adelantaron trabajos dirigidos a determinar los factores asociados con el desarrollo de inmunidad contra el botulismo, los cuales evaluaron la dinámica y persistencia de la inmunidad humoral en bovinos vacunados con toxoides comerciales; de esta manera se

Tabla 3. Tipos de vacuna triple bovina y su formulación utilizadas en las regiones fisiográficas de la Orinoquía colombiana por 180 productores (2002).

Laboratorio comercial	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. septicum</i>	<i>P. multocida</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. haemolyticum</i>	<i>C. novyi</i>	<i>P. haemolytica</i>
Santa Elena	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
VM	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Vecol	sí	sí	sí	sí	sí	sí	no
Probyala	sí	sí	sí	sí	no	no	sí
Laverlam	sí	sí	sí	no	no	no	no
Limor	sí	sí	sí	no	no	no	no

Fuente: Aprovet, 2002.

pretendió dar orientaciones a los ganaderos para hacer un mejor uso de esta herramienta de control. Este proyecto se generó como complemento de las investigaciones señaladas anteriormente y buscaba evaluar algún tipo de solución sostenible al problema de mortalidad bovina en la Orinoquía, principalmente cuando se pastorean bovinos en suelos con deficiencias.

Aunque desde el inicio de la emergencia sanitaria se señaló la importancia de la inmunización del ganado con toxoides contra el botulismo, no existía un conocimiento adecuado de la respuesta inmune de los animales en pastoreo que permitiera recomendar esquemas vacunales apropiados para las necesidades sanitarias las zonas afectadas. Se estandarizaron herramientas para medir el nivel de anticuerpos de los animales, con actividades de campo que incluyeron vacunación y muestreo de animales en fincas de la Altillanura plana colombiana (Figura 3). Se concluyó que los estados nutricionales se relacionaban de forma directa con la respuesta inmune de los animales vacunados. Finalmente, se aplicó una encuesta a los productores y se determinó la importancia de la interacción entre el diagnóstico de laboratorio y los trabajos de campo (Benavides *et al.*, trabajos sin publicar).

4.2. *Clostridium chauvoei*

C. chauvoei es el agente etiológico del carbón sintomático o 'pierna negra' que afecta a los bovinos, los ovinos y rara vez a otros ungulados (Pumarola *et al.*, 1984; Ortiz *et al.*, 2004); es una enfermedad fatal que se presenta de forma esporádica en ciertas áreas donde el microorganismo vive en el suelo. Posee esporas subterminales o subcentrales y presenta reacción cruzada con el *Clostridium septicum*. Produce cuatro tipos de toxinas, siendo la toxina Alfa la más agresiva, pues habita el intestino y otros órganos de los animales sanos; además, sus esporas pueden permanecer durante años en el ambiente (Ortiz *et al.*, 2004). Se considera que hace parte del complejo de enfermedades causantes de la muerte súbita bovina.

Los animales infectados por *C. chauvoei* presentan inicialmente fiebre, septicemia, toxemia, tumefacciones crepitantes en la musculatura, cojera y depresión, después de lo cual sobreviene la muerte. No obstante, se puede presentar como un síndrome de muerte súbita sin presentación previa de síntomas. La sintomatología frecuentemente se confunde con la del edema maligno causado por varios clostridios, entre ellos *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* o *Clostridium perfringes*. Esta enfermedad

afecta animales en buen estado nutricional que se encuentran entre los seis meses y los dos años en el caso de los bovinos (Jubb, Kennedy y Palmer, 1985).

Durante los años 2003 y 2004 se iniciaron trabajos en cooperación con la Universidad de La Salle que fueron solicitados al grupo de investigación por demanda de la industria farmacéutica y los ganaderos de los Llanos Orientales y el Magdalena medio en los departamentos de Tolima, Santander y Cundinamarca, regiones en las cuales la problemática de muerte súbita en las ganaderías ocasionaba pérdidas económicas considerables (Ortiz *et al.*, 2004).

Ante la ausencia de metodologías de diagnóstico, y debido al vacío tecnológico que se observaba en los centros de diagnóstico y los laboratorios particulares, se dio inicio a la búsqueda de metodologías que permitieran establecer diagnósticos confirmativos certeros sobre la frecuencia de esta enfermedad.

4.2.1. Avances en procesos diagnósticos. Los trabajos citados incluyeron un estudio que describió los hallazgos histopatológicos encontrados en tejidos de cobayos (*Cavia porcellus*) inoculados con una cepa patógena de *C. chauvoei* (4408 ATCC), los cuales se utilizaron posteriormente para estandarizar una técnica inmunohistoquímica. Los animales se inocularon vía intramuscular con 0,5 mL de una solución de cloruro de calcio (CaCl₂) al 5% que contenía 100 dosis infectantes de *C. chauvoei*, para proceder a su sacrificio cada tres horas. Los tejidos se fijaron en formaldehído, se procesaron mediante la técnica de inclusión en parafina y se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina. Los bloques obtenidos se utilizaron para estandarizar la técnica de inmunoperoxidasa indirecta usando un anticuerpo monoclonal producido por el grupo de investigación; de esta manera se demostró que los cambios más severos ocurrieron en el grupo experimental de 18 horas post-inoculación (Ortiz *et al.*, 2004).

En dicho grupo, las lesiones macroscópicas principales fueron: tumefacciones crepitantes en la musculatura estriada esquelética, tejidos de color rojo o marrón oscuro con estrías negras; algunas áreas aparecían húmedas por la presencia de un exudado oscuro mezclado con gases

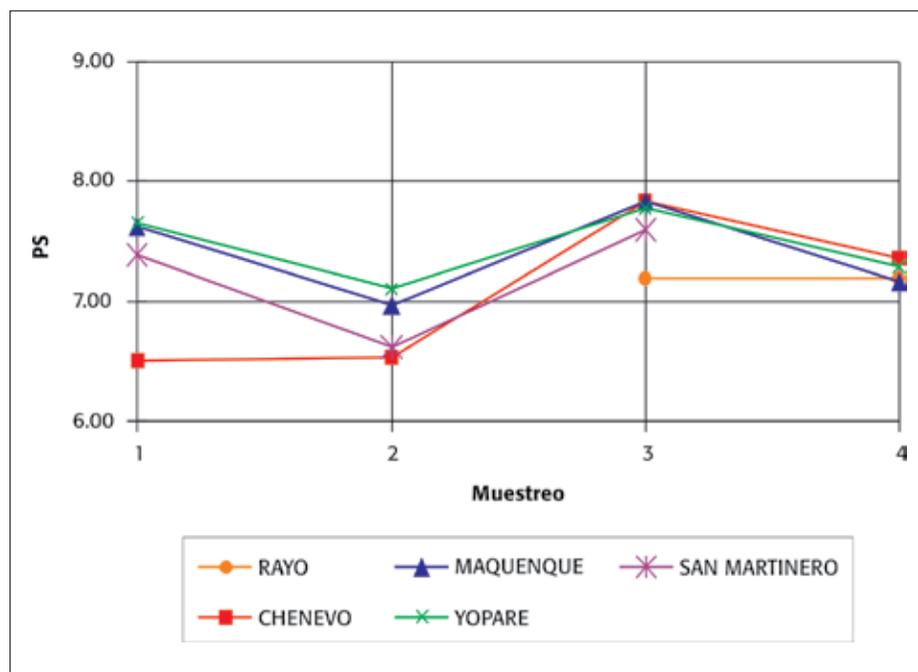


Figura 3. Valores séricos de proteínas (PS) en cinco hatos selectos de la Altillanura plana colombiana (2000).

que expelían un olor dulzón particular. Se encontró una marcada infiltración polimorfonuclear de tipo neutrófilo al examen microscópico (Figura 4) (Ortiz *et al.*, 2004).



Figura 4. Lesiones en las cavidades torácica y peritoneal de cobayos (*Cavia porcellus*) inoculados con la cepa patógena 4408 ATCC del *Clostridium chauvoei* a 15 horas post-inoculación intramuscular. Se observa abundante producción de gases en el intestino acompañada de congestión y hemorragias marcadas.

Los resultados de la prueba inmunohistoquímica demostraron que el tejido muscular estriado esquelético es una muestra adecuada para el diagnóstico del carbón sintomático. La fijación del tejido en formaldehído, con posterior inclusión en parafina, es afín con la técnica de inmunoperoxidasa indirecta; ésta, no sólo facilita al patólogo el diagnóstico de las lesiones anatomopatológicas producidas por el *Clostridium chauvoei*, sino que también representa una técnica confirmatoria porque el anticuerpo monoclonal utilizado identifica específicamente la bacteria (Crichton, Solomon y Barton, 1990; Ortiz *et al.*, 2004). La metodología estandarizada en este trabajo hace posible desarrollar estudios epidemiológicos retrospectivos y prospectivos que dilucidan el compromiso de este agente en los casos de muerte súbita.

Adicionalmente a los resultados expuestos, el anticuerpo monoclonal específico para *C. chauvoei* se usó en una prueba de ELISA indirecta que se aplicó a músculos fijados en formaldehído provenientes de cobayos infectados experimentalmente con diferentes especies del género *Clostridium*. El anticuerpo fue capaz de discriminar con exactitud los animales infectados con *C. chauvoei* de los infectados con *C. sordelli*, *C. novyi* y *C. septicum*. Los resul-

tados obtenidos son alentadores y abren la posibilidad de desarrollar un método diagnóstico rápido, confiable y económico para el carbón sintomático en bovinos (Ortiz *et al.*, 2004).

Uno de los problemas que enfrenta el productor cuando remite muestras al laboratorio es la gran distancia de su finca a los centros de diagnóstico, con la consecuencia que éstas no llegan en buenas condiciones para su procesamiento y generalmente presentan autólisis (Ortiz, 2000 a). El objetivo de generar metodologías de diagnóstico que permitan superar este inconveniente incluye que las muestras se fijen en formaldehído para conservarlas y propiciar un procesamiento adecuado y relativamente rápido, ya sea mediante inmunohistoquímica o ELISA, a fin de dar diagnósticos confirmativos certeros (Ortiz *et al.*, 2004).

5. IDEARIOS DE INVESTIGACIÓN PROSPECTIVOS

En la mayoría de países del mundo la toma de decisiones que define las acciones de prevención, control y erradicación de una enfermedad se basan en el conocimiento de las entidades biológicas —el cual muchas veces es superficial— y del impacto económico que dichas entidades producen (Perry, McDermott y Randolph, 2000).

Algunos trabajos, como el de Seifert (1996), demuestran la importancia de identificar las cepas locales y discernir con claridad la epidemiología regional de los microorganismos patógenos; plantea incluso el uso de esas cepas nativas —que no siempre son homólogas con las cepas de referencia, por ejemplo la ATCC—, para preparar inmunógenos específicos destinados al control de enfermedades prevenibles en diferentes regiones de un país.

La necesidad de solucionar los problemas actuales de mortalidad en la ganadería colombiana, así como la atención a problemas emergentes como la epidemia de mortalidad bovina en la Orinoquía asociada con botulismo, demuestra la necesidad inaplazable de promover la existencia y estabilidad de un grupo de referencia para la investigación de bacterias asociadas al suelo que desarrolle metodologías de diagnóstico con las cua-

les se identifique con exactitud este tipo de agentes (Ortiz, 2000).

Las experiencias adquiridas hasta el momento deben complementarse con el talento humano a cargo de los programas de salud institucionales; en este sentido cabe señalar que el control de las enfermedades infecciosas se sustenta en la toma de decisiones racionales sobre la base de indicadores económicos y de salud. Dichos índices se construyen partiendo de información generada en estudios epidemiológicos de campo, los cuales deben reflejar la realidad de los sistemas de producción. Para realizar dichos estudios es necesario complementarlos con información técnico-económica, ambiental y social a fin de determinar los factores asociados con la ocurrencia de las diferentes enfermedades que afectan los hatos y tomar decisiones coherentes que permitan generar políticas adecuadas de salud (Thrusfield, 1990; Martín *et al.*, 1997).

En este contexto, los fines operacionales de la epidemiología comprenden la prevención primaria, secundaria y terciaria de la enfermedad. La prevención primaria comprende aquellas actividades dirigidas a impedir la exposición ante los factores causales, en especial a los complejos etiológicos que son suficientes para producir enfermedad. La prevención secundaria se refiere a las acciones diseñadas para detectar procesos de enfermedad lo más pronto posible. La prevención terciaria se conoce más corrientemente como terapéutica. Las autoridades sanitarias deben poner énfasis en la atención primaria más que en la terciaria a fin de optimizar el estatus de salud; éste mejora de forma marginal cuando se sacrifican los animales debilitados y se trata la enfermedad oportunamente (Martín *et al.*, 1997).

5.1. Puntos críticos de las clostridiosis en Colombia

Las anteriores consideraciones remiten a la ausencia de programas sanitarios institucionales apropiados. Los entes oficiales encargados de la sanidad animal, lo mismo que las instancias académicas, no tienen claridad en los esquemas médico-preventivos que se deben aplicar a nuestras ganaderías en el caso de las clostridiosis. En muchas fincas los ganaderos se quejan de la poca efectividad que tienen los productos biológicos; en efecto, pese

a que utilizan los esquemas preventivos indicados por las casas comerciales, los animales se siguen muriendo.

La pregunta que surge entonces es '¿qué sucede?'. La respuesta señala que la eficacia de dichos productos debe ser evaluada, al igual que las diferentes formulaciones que ofrecen los laboratorios. Es necesario que las entidades sanitarias se apoyen en los grupos de investigación para generar protocolos confiables que permitan evaluar, en laboratorio y en campo, los insumos biológicos y se puedan adaptar para ser utilizados regularmente en la evaluación de dichos productos. La mayoría de vacunas producidas en el país se elaboran con cepas importadas las cuales, en muchas oportunidades, no están evaluadas adecuadamente para nuestras condiciones. El potencial de las cepas de campo aisladas y caracterizadas debe sustentar el desarrollo de esas investigaciones.

En este sentido, la consecución de recursos económicos para caracterizar las diferentes clostridiosis a nivel de campo en las diferentes zonas agroecológicas del país puede ser factible, dados los esfuerzos para implementar métodos de diagnóstico sensibles y específicos como los arriba mencionados; los desarrollos que se plantean en esta área permitirán contar con el soporte requerido por asesores técnicos y productores en la diversificación de biológicos preparados con cepas locales.

Por las razones mencionadas se hace necesario y urgente preparar el talento humano, y propiciar una infraestructura adecuada, con equipos y soporte financiero suficientes para que conformen una masa crítica que genere capacidad científica y aporte soluciones a la problemática de salud animal discutida en este artículo.

5.2. Lineamientos para la prevención y el control de las clostridiosis

Sobre la base de la experiencia adquirida en los últimos años, el grupo de investigación que ha venido trabajando, ha construido la capacidad de realizar el diagnóstico clínico y poblacional (tamizaje) (Flores *et al.*, 1994; Londoño, 1996) y de identificar cepas de clostridios en fincas afectadas para caracterizarlas desde

los enfoques bioquímico y molecular. Este material permitirá enriquecer los bancos de germoplasma del país con el objeto de utilizar dicho material en el desarrollo de metodologías de diagnóstico, elaboración de bacterinas y toxoides, así como en el estudio comparativo de las cepas de referencia utilizadas actualmente por los laboratorios.

La estandarización y validación de técnicas de inmunohistoquímica, ELISA (*enzyme-linked immunosorbed assay*) y diagnóstico molecular (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) constituye una prioridad en el corto y mediano plazos (Haines y Clarck, 1991; Gregory y Main, 1996; Gregory *et al.*, 1996). Estas metodologías de diagnóstico aportan la base para el desarrollo de estudios epidemiológicos observacionales y de intervención en zonas afectadas para caracterizar y manejar las clostridiosis. Se debe también registrar el conocimiento local utilizado por el productor para la identificación y el manejo de estas problemáticas, empleando metodologías de epidemiología participativa (Londoño, Villamil y Romero, 2001). Los resultados de los estudios epidemiológicos representan el fundamento para la formulación de políticas y el diseño racional de programas de prevención y control, con los cuales se podrán generar pautas para la promoción de programas de salud y campañas sanitarias.

5.3. Alternativas de solución

Contando con las cepas nativas aisladas y caracterizadas de bacterias patógenas asociadas al suelo, y con la cooperación sinérgica de la industria, es posible preparar biológicos (bacterinas y toxoides) empleando material biológico autóctono, el cual se someterá a evaluación para determinar su eficacia. Una vez se cumplan estos pasos es posible establecer programas de vacunación con amplia cobertura y cuyo impacto se pueda medir posteriormente, así como el posible uso terapéutico de las bacterias y sus toxinas (Jankovic y Brin, 1991).

Otra perspectiva es la elaboración de biológicos con proteínas que demuestren capacidad inmunógena, como producto de la identificación de regiones conservadas en los genes, lo cual constituye una estrategia que hará factible escalar metodologías más sostenibles y económicas.

El desarrollo de parámetros y protocolos para estimar, con suficiente precisión y sensibilidad, los niveles de inmunidad post-vacunación de los diversos esquemas de inmunización con bacterinas o toxoides en los animales de las zonas afectadas, así como la determinación de los niveles de inmunidad protectora, se avisan como metas tangibles.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Benavides, E.; M. Londoño y D. Ortiz. 1996a. Informe comisión a Carimagua para examinar la causa de mortalidad de bovinos en la Altillanura colombiana. Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. 3 p.
- Benavides O., E.; Londoño B., M.; Ortiz O., D.; Cruz R., L.; Britto A., C.M.; Romero N., A. y Salazar, S. C. 1996b. *Clostridium botulinum* y su relación con el Síndrome Parapléjico Bovino en la Orinoquía Colombiana. En: "Memorias XX Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y de Zootecnia", octubre 9-12 de 1996, Santa Marta, COVEZCOR (Colegio de Veterinarios y Zootecnistas de Córdoba). Sección 2, 18 p.
- Benavides, E.; Ortiz, D. y Benavides, J. 2000. Association of botulism and tetanus as causative agents of outbreak of bovine paraplegic mortality in the eastern plains of Colombia. tropical veterinary diseases. control and prevention in the context of the new world order. James A. House (ed.). Society for Tropical Veterinary Medicine. Annals of the New York Academy of Sciences. 916: 646-649.
- Benavides, E.; Duque, D.; Estupiñán, C.; Benavides, J.; Altuzarra, R. y Ortiz, D. 1997a. Caracterización de bacterias anaerobias esporuladas presentes en los suelos de la Altillanura plana colombiana. Revista Colombiana de Ciencias Agropecuarias. (Resumen vol. 10). Suplemento. (Encuentro Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias. ENICIP). 17 p.
- Benavides, E., Benavides, J., Altuzarra, R., Ortiz, D., Londoño, M. y Cortes, H. 1997b. Botulismo bovino en Colombia: Avances de investigación con relación al brote de mortalidad de bovinos en la Orinoquía Colombiana, 1995-1996. Revista Colombiana de Ciencias Agropecuarias. (Resumen) vol. 10. Suplemento. (Encuentro Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias. ENICIP). p.48.
- Benavides, E.; Londoño, M.; Ortiz, D.; Cruz, L.; Britto, C.; Romero, A. y Salazar, S. 1996c. Investigación sobre la relación entre *Clostridium botulinum* y la mortalidad bovina en la Orinoquía Colombiana. Agrociencia y Tecnología siglo XXI Orinoquía Colombiana. Memorias.

- Blood, D.C.; Henderson, J.A y Radostits, O.M. 1988. Medicina Veterinaria, Editorial Interamericana, México D.F. Sexta edición. Traducido por Garst T., A. 1.441 p.
- Brito, E.; Cárdenas, D.; Ortiz, O. y Huertas, H. 1998. El botulismo : una de las causas de mortalidad bovina en los Llanos Orientales de Colombia. Conózcalo prevéngalo y contrólole. Cartilla divulgativa No. 1. Instituto Colombiano Agropecuario –ICA-. Seccional Meta. 16 p.
- Caraballo G., L.C. 1973. Identificación y clasificación de cepas de *Clostridium*. Tesis. Programa de Estudios para Graduados. Universidad Nacional. Instituto Colombiano Agropecuario. 45 p.
- Cárdenas, D. P.; Pulido, C.; Aragón, O. L.; Aristizabal, F. A.; Suárez, Z. R. y Montoya D. 2006. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp.* mediante fermentación a partir de glicerol USO y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiesel. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 35(1): 120-137.
- Carter, G.R. y Chengapa, M.M. 1991. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Fourth Edition. Lea y Febiger, London. 284 p.
- Center for Disease Control. 1987. *Clostridium botulinum* Monovalent and Polyvalent Antitoxins. U.S: Department of Health and Human Services. Public Health Service. Center of Infectious Diseases. Office of Scientific Services. Biological Products Branch. Atlanta, Georgia (EUA). 16 p.
- CIAT. 1977. Informe Anual. Editor: Mario Gutiérrez. Editorial Carrera Séptima Ltda. Bogotá (Colombia). 447 p.
- Crichton, R.; Solomon, J. y Barton, A. 1990. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the potency of vaccines containing *Clostridium chauvoei* Antigens. Biologicals 18: 49-54.
- De Souza, A.M. y Langenegger, J. 1987. Esporos de *Clostridium botulinum* Em torno de cadáveres decompostos de bovinos em pastagens no sul de Goiás. Pesquisa Veterinaria Brasileira 7(1): 17-22.
- Dowel, V. y Hawkins, T. 1976. Laboratory methods in anaerobic bacteriology CDC laboratory manual. U.S. Department of Health, Education and welfare. Public Health service. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia (EUA). 94 p.
- Dutra, I.; Weiss, H.E.; Weiss, H. y Dobereiner, J. 1993. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. Pesquisa Veterinaria Brasileira 13(3/4): 83-86.
- France, M. 1989. Histological Examination of the Central Nervous System in the Diagnosis of Botulism. Journal of Comparative Pathology 101: 101-107.
- Fernández, R.; Ciccarella, A.; Arenas, G. y Jiménez, D. 1989. *Clostridium botulinum* tipos D y A en materiales de necropsia de bovinos afectados por el mal de Aguapey. Revista Argentina de Microbiología 21: 47-53.
- Flórez T., J. A.; González E., G.; Hernández Z., A.; Herrera V., J.S.; Londoño F., J. L.; López H., C.; Mazuera, M. E.; Mejía V., W.; Ramírez C., H.; Rojas L., E.; Torre, Y. y Vasco U., A. 1994. Curso Modular de Epidemiología Básica. Universidad de Antioquia. Facultad Nacional de salud Pública “Héctor Abad Gómez”. Organización Panamericana de la Salud. Segunda edición. Editores Flórez T., J.A. y Mazuera, M.E. Medellín Colombia. 443 p.
- Gamboa, M.; Rodríguez, E. y Fernández, B. 1993. *Clostridium botulinum* en suelos de Costa Rica. Revista de Biología Tropical 41(3): 359-363.
- González Ch., H. E.; Rodríguez M., G. y Orrego U., A. 1980. Enterotoxemia de los Equinos. Documento de trabajo código 10.6.-021-80. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Subgerencia Investigación. División Ciencias Veterinarias. 32 p.
- Gregory, A.; Ellis, T.; Jubb, T.; Nickels, R. y Cousins, D. 1996. Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. Australian Veterinary Journal 73(2): 55-61.
- Gregory, A. y Main, D. 1996. Serological diagnosis of Botulism in dairy cattle. Australian Veterinary Journal 73(2): 77-78.
- Haines, D.M. y Clark E. G. 1991. Enzyme immunohistochemical staining of formalin – fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. Canadian Veterinary Journal 32: 295-302.
- Hatheway, C.L. 1988. Botulism. In: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Volume 1, Chapter 12. (Balows, A.; Hausler Jr., W.J.; Ohashi, M. y Turano, A. eds.). Springer-Verlag, New York. pp. 111-133.
- Hatheway, C.L. 1990. Toxigenic Clostridia. Clinical Microbiology Reviews 3(1): 66-98.
- Jaimes, C.P.; Aristizabal G. F. A.; Bernal M. M.; Suárez, Z. R. y Montoya. D. 2006. AFLP fingerprinting of Colombian *Clostridium* spp strains, multivariate data analysis and its taxonomical implications. Journal of Microbiological Methods. 67: 64-69.
- Jankovic, J. y Brin, M. 1991. Therapeutic uses of botulinum toxin. Journal The New England of Medicine 324(12): 1186-1193.
- Jubb, K.V.; Kennedy, P. y Palmer, N. 1985. Pathology of Domestic Animals. Third Edition. Edit. Academic Press Inc. New York (EUA). 1800 p.
- Lebdoesoedkojo, S. 1977. Mineral supplementation of grazing beef cattle in eastern plains of Colombia. Tesis Ph.D. University of Florida (EUA). 207 p.
- Lebdoesoedkojo, S.; Ammerman, C.B.; Raun, N. S.; Gómez, J. y Littel, R.C. 1980. Mineral nutrition of beef cattle grazing native pastures on the eastern plains of Colombia. Journal American Science 15(2): 1249-1260.
- Linares G., T. y Márquez Q., N. 1993. Cuadro Clínico y Diagnóstico Diferencial de Enfermedades con Sintomatología Parecida al Síndrome Parapléjico Bovino (SPB). En: Aspectos de sanidad animal en áreas afectadas por el síndrome parapléjico del bovino. Programa de Cooperación Agrícola Convenio MAC/PDVSA. Boletín No.2. Impreso en Talleres Gráficos del FONAAP, Caracas (Venezuela). pp 47-100.
- Lisbôa, J.; Kuchembuck, M.; Dutra, I.; Gonçalves, R.; Almeida, C. y Barros, R. 1996. Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizootico dos bovinos no estado de São Paulo. Pesquisa Veterinaria Brasileira 16(2/3): 67-74.
- Lobo A., C.A. 1994. Taller de Planificación por Objetivos Metodología Zoot. Programa Nacional de Epidemiología veterinaria. Subdirección de Sistemas de producción. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. 50 p.
- Londoño E., R.; Villamil J., L.C. y Romero P., J.R. 2001. Percepción pública de Organismos Genéticamente Modificados en países en desarrollo. Primer Foro Internacional sobre Bioseguridad de OGM de interés Pecuario. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 19 p.
- Londoño F., J.L. 1996. Metodología de la Investigación Epidemiológica. Editorial Universidad de Antioquia. Yuluka Salud Pública. Primera reimpresión. Medellín (Colombia). 271 p.
- Martin, S.W.; Meek, A.H. y Willebreg, P. 1997. Epidemiología Veterinaria. Principios y Métodos. Traducido por Tarazona Vila José M^a. Ed. Acibia, Zaragoza (España). 384 p.
- Obregón, D. 2002. Batalla contra la Lepra: Estado. Banco de la República. Editorial EAFID. 422 p.
- Ortiz O., D. 1990. Necropsia, Técnica Rutinaria. Informativo VEPA. Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios Especialistas en Clínica y Cirugía de Pequeños Animales. Boletín No. 02 p. 2, 3 y 4.
- Ortiz O., D. 1991. Necropsia, Técnica Rutinaria (2^a. Parte). Informativo VEPA. Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios Especialistas en Clínica y Cirugía de Pequeños Animales. Boletín No. 01 p. 2, 3 y 4.
- Ortiz O., D. y Benavides O., E.V. 2002a. Las neurotoxinas tipo C y D de *Clostridium botulinum* son responsables de la mortalidad de bovinos afectados por el síndrome neuroparalítico en cuatro fincas de la Orinoquía colombiana. Revista de Medicina Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria Universidad de La Salle 2(3): 7-20.

- Ortiz O., D. y Benavides O., E. V. 2002b. Hallazgos histopatológicos en bovinos naturalmente afectados por el síndrome neuroparalítico en la Orinoquía colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15(1): 107-114.
- Ortiz O., D.; Villamil, L. C. y Benavides O., E. 2001a. Factores de riesgo asociados con la ocurrencia del síndrome neuroparalítico bovino en la Orinoquía Colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 14 (suplemento, memorias ENICIP 2001). p. 64.
- Ortiz O., D.; Villamil, L. C. y Benavides O., E. 2001b. Etiología, epidemiología y alteraciones clínico-patológicas asociadas con el síndrome neuroparalítico bovino en la Orinoquía Colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 14 (suplemento, memorias ENICIP 2001). pp. 63-64.
- Ortiz O., D.; Villamil J., L. C. y Benavides O., E. 2001, c. Factores de riesgo asociados con la ocurrencia del síndrome neuroparalítico bovino en la Orinoquía Colombiana. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional* 6(15): 228-229.
- Ortiz O., D.; Villamil J., L. C. y Benavides O., E. 2001, d. Etiología, epidemiología y alteraciones clínico-patológicas asociadas con el síndrome neuroparalítico bovino en la Orinoquía Colombiana. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional* 6(15): 224-226.
- Ortiz, D. 2000a. Alternativas de Solución Para el problema de Mortalidad Bovina en la Orinoquía Colombiana. *Informe Técnico Final Para el Programa Nacional de Transferencia de Tecnología, PRONATTA*. Bogotá D.C., Colombia. 92 p.
- Ortiz O., D. 2000b. Estudio epidemiológico del problema de mortalidad bovina en la Orinoquía colombiana. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá D.C. 290 p.
- Ortiz O., D.; Toro O., R. D.; Ossa, J. H.; Montoya F., F. J.; Cárdenas, M. A.; Ladino A., L.; Henao, L. y Guerrero, D.A. 2004. Estandarización de la técnica de inmunoperoxidasa para el diagnóstico de *Clostridium chauvoei*. *Revista de Investigación Departamento de Investigación Universidad de La Salle* 1(4): 11-21.
- Parra, J.; Olarte, F.; Barrera, J. y Acevedo, L. 1997. Mortalidad bovina en la Altillanura del Vichada. *Informe Técnico No. 1*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Regional 8 y Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA, Regional Meta y Orinoquía, Villavicencio Meta). 57 p.
- Perry, B.; McDermott, J. y Randolph, T. 2001. Can epidemiology and economics make a meaningful contribution to national animal – disease control? *Preventive Veterinary Medicine* 48: 231-260.
- Pumarola, A.; Rodríguez T., A.; García R., J.A. y Piedrola A., G. 1984. *Microbiología y Parasitología Médica*. Salvat Editores. Barcelona (España). 885 p.
- Quinnand, P.J. y Markey, B.K. 2003. *Concise Review of Veterinary Microbiology*. Edit. Blackwell Publishing. 120 p.
- Reyes G., M.; Villamil J., L.C.; Ariza S., N.; Cediell B., Natalia y Romero P., J.R. 2004. *Salud Pública Veterinaria en Colombia. Pasado, Presente y Futuro*. Organización Panamericana de la Salud. Editorial Moosn Creative Publicidad. 114 p.
- Seifert, S. 1996. Ensayos de campo en nuevas técnicas serológicas para la detección de toxina botulínica en muestras de animales muertos y aislamiento de *Clostridium botulinum* en alimento y suelo. Universidad Gottingen, Proyecto presentado a la Comunidad Económica Europea. 26 p.
- Singh, B.R.; Li, B. y Read, D. 1995. Botulinum versus tetanus neurotoxins: why is botulinum neurotoxin but not tetanus neurotoxin a food poison? *Journal Toxicon*. 33(12): 1541-1547.
- Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología veterinaria*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España). 339 p.
- Titball, R.; Mainil, J.; Duchesnes, C. y Popoff, M. 2003. Genus *Clostridium* concerted action QLK2-CT2001-01267. Pathology and ecology of the genus *Clostridium* in humans, animals, and foodstuffs: identification, epidemiology and prophylaxis. En: <http://www.genusclostridium.net>; consulta: diciembre 2007.
- Uribe, A. 1995. Tercer informe de la investigación sobre la mortalidad bovina en los departamentos del Meta y Vichada. Fondo Nacional del Ganado, FEDEGAN. Santafé de Bogotá D.C. 31 p.
- Uribe, A. 1996. La identificación de la causa etiológica, la prevención y el tratamiento de una enfermedad responsable de la mortalidad de bovinos en los departamentos del Meta, Vichada y Casanare. Informe final del proyecto de investigación financiado por el Fondo Nacional de Ganado, FEDEGAN. Santafé de Bogotá. 132 p.
- Vadillo, S.; Piriz, S. y Mateos, E. 2002. *Manual de microbiología veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. 795 p.