



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# Aislamiento y caracterización molecular de clostridios asociados al suelo en zonas ganaderas de Colombia con problemas de mortalidad en bovinos

Diego Ortiz Ortega

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia  
Doctorado en Ciencias Salud Animal o Producción Animal  
Bogotá D. C., Colombia  
2012



# Aislamiento y caracterización molecular de clostridios asociados al suelo en zonas ganaderas de Colombia con problemas de mortalidad en bovinos

Diego Ortiz Ortega

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Doctor en Ciencias - Salud Animal

Director (a):  
LUIS CARLOS VILLAMIL JIMÉNEZ  
MV. MSc. PhD.

Línea de Investigación:  
Microbiología y Epidemiología  
Grupo de Investigación:  
Microbiología y Epidemiología

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia  
Doctorado en Ciencias Salud Animal o Producción Animal  
Bogotá D. C., Colombia  
2012



*Con inmenso amor:*

*A mi Esposa Sandra Patricia Rivera Villamil*

*A mis Hijos María Alejandra Ortiz Rivera y Juan Diego Ortiz Rivera*

*A mi Padre Luís Eduardo Ortiz Orduña (QEPD)*

*A mi Madre María Nelly Ortega de Ortiz*



## **Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado por la División de Investigación de Bogotá (DIB) y por el programa de Becas para Estudiantes Sobresalientes del Posgrado de la Vicerectoría Académica de la Universidad Nacional de Colombia.

Agradecimiento muy especial al Dr. Luis Carlos Villamil Jiménez MV. MSc. PhD. Director de la tesis, por su dirección y consejos permanentes, le expreso mi profundo respeto y sincera amistad.

A mis amigos incondicionales Rodrigo Alfredo Martínez Sarmiento Z. MSc. PhD. Investigador Asociado CORPOICA, Rubén Darío Toro Ortiz MVZ. MSc. Director Científico VECOL S.A., Gerardo Quiñones Biólogo Independiente, consejeros permanentes.

Agradecimiento especial al Dr. Juan Lucas Restrepo Director Ejecutivo de CORPOICA por su apoyo, sin el cual no hubiera sido posible culminar este trabajo.

A los Doctores Víctor Vera MV. MSc. PhD. y Jairo Jaimes MV. MSc. PhD. Profesores de Posgrado Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional de Colombia por su valioso tiempo y oportunos consejos.

A mis estudiantes de pregrado y posgrado quienes siempre fueron fuente de motivación y a quienes dedico especialmente éste trabajo.

A todos los productores, propietarios y trabajadores de las fincas que me colaboraron, lo mismo que a los médicos veterinarios de campo, amigos incondicionales.





## Resumen

Los brotes epidémicos de mortalidad bovina causados por clostridiosis afectan las ganaderías colombianas y causan grandes pérdidas económicas. Con el propósito de conocer la problemática y dar alternativas de solución se desarrolló un estudio epidemiológico para caracterizar las bacterias patógenas del género *Clostridium spp* asociadas al suelo en fincas afectadas por dichos brotes. Las bacterias se aislaron y caracterizaron bioquímica y molecularmente; para este propósito se incluyeron 10 fincas ubicadas en el municipio de Mariquita en el departamento del Tolima (3 predios), en el municipio de Puerto López, departamento del Meta (3 predios), y en los municipios de Nemocón y Ubaté (4 predios), departamento de Cundinamarca. Para determinar la variabilidad genética existente entre las bacterias del género *Clostridium* encontradas, se analizó un segmento de 1500 pares de bases localizado en el gen 16S rARN y se compararon con los grupos de *Clostridium spp.* utilizados por un laboratorio comercial para la producción de vacunas y por *Clostridium spp.* referenciados en el GenBank (NCBI); los aislamientos se correlacionaron con variables climáticas como temperatura y precipitación, encontrando que un aumento en dichas variables favorece el aislamiento de los mismos. Para conocer la historia natural de los brotes de mortalidad y generar indicadores epidemiológicos se caracterizaron 165 predios localizados en el municipio de Mariquita, departamento del Tolima (41 predios, 24,8%), en el municipio de Puerto López, departamento del Meta (42 predios, 25,5%), en los municipios de Nemocón (41 predios 24,8%) y Ubaté (41 predios 24,8%), departamento de Cundinamarca. Se estableció la prevalencia de dicha patología en las fincas estudiadas encontrando una prevalencia global de punto para clostridiosis de 27,3 %. La prevalencia global de punto para clostridiosis encontrada en bovinos fue 3,14%. Se demostró que a mayores niveles de temperatura y precipitación se favorece la presentación de brotes epidémicos de mortalidad. También se demostró que los grupos etarios con mayor riesgo de adquirir clostridiosis fueron las poblaciones de novillas y de vacas horras. Se demostró que la mayoría de fincas positivas a mortalidad por clostridiosis correspondían a aquellas que tienen suelos clase III, los cuales tienen problemas de manejo relacionados con inundaciones y con dificultad del movimiento del agua a través del suelo.

**Palabras clave:** Epidemiología, Prevalencia, Riesgo, *Clostridium*; Diversidad Genética.

## Abstract

Outbreaks of mortality caused by clostridia affecting cattle herds colombian and cause economic losses. In order to know the problems and alternative solutions to an epidemiologic study is to characterize the pathogenic bacteria of the genus *Clostridium* spp associated with soil herds affected by these outbreaks. Bacteria were isolated and characterized biochemically and molecularly; for this purpose included 10 herds located in the municipality of Mariquita, department of Tolima (3 herds), in the municipality of Puerto Lopez, department of Meta (3 herds), and municipalities Ubaté and Nemocón (4 herds), in department of Cundinamarca. To determine the genetic variability found *Clostridium* bacteria, we examined a segment of 1500 bp located in the 16S rRNA and compared with the groups of *Clostridium* spp. used by a commercial laboratory, for the production of vaccines and *Clostridium* spp. referenced in the GenBank (NCBI). The isolates were related with climate variables such as temperature and rainfall, finding that an increase in these variables favors isolation. To know the natural history of outbreaks of mortality and generate epidemiological indicators were characterized 165 herds located in the Mariquita, department of Tolima (41 farms, 24.8%) in the Puerto Lopez, department of Meta (42 herds, 25.5%) in the Nemocón (41 herds 24.8%) and Ubaté (41 plots 24.8%), department of Cundinamarca. Established the prevalence of this disease on the herds studied finding a global point prevalence of 27.3 % *Clostridium*. The overall point prevalence of *Clostridium* found in cattle was 3.14%. It was shown that, at higher temperatures and precipitation of mortality outbreaks. It was also shown that the age groups most at risk of acquiring *Clostridium* populations were heifers and dry cows. It was shown that the majority of herds positive for clostridiosis mortality corresponded to those with Class III soils, which have management problems associated to flooding and difficulty of movement of water through the soil.

Keywords: Epidemiology, Prevalence, Risk, *Clostridium*, Genetic diversity

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>XXI</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Revisión de literatura</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Generalidades sobre clostridios</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2 Microbiología de clostridios</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 Enfermedades en animales</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 Avances de la investigación colombiana en clostridiosis</b> .....	<b>18</b>
<b>2. Aislamiento y caracterización bioquímica y molecular de clostridios a partir de muestras de suelo de fincas con brotes epidémicos de mortalidad bovina</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Introducción</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Materiales y métodos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.1 Toma de muestras de suelo</b> .....	<b>25</b>
2.2.1.1 Distribución geográfica .....	25
2.2.1.2 Tamaño de la muestra .....	25
<b>2.2.2 Procesamiento de las muestras en el laboratorio</b> .....	<b>28</b>
2.2.2.1 Prueba biológica .....	30
2.2.2.2 Obtención de las Toxinas .....	31
2.2.2.3 Tripsinización de las células HeLa .....	31
2.2.2.4 Coloración de los cultivos celulares .....	32
2.2.2.5 Extracción de ADN.....	33
<b>2.2.3 Secuenciación y análisis de los nucleótidos del segmento amplificado</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3 Resultados</b> .....	<b>36</b>

<b>2.3.1. Muestras de Suelo .....</b>	<b>36</b>
2.3.1.1 DOO-5555 .....	45
2.3.1.2 DOO-5556 .....	46
2.3.1.3 DOO-5557 .....	47
2.3.1.4 DOO-5558 .....	48
2.3.1.5 DOO 5559 .....	48
2.3.1.6 DOO-5560 .....	49
2.3.1.7 DOO-5561 .....	50
2.3.1.8 DOO-5562 .....	51
2.3.1.9 DOO-5563 .....	52
2.3.1.10 DOO-5564 .....	52
2.3.1.11 DOO-5565 .....	53
2.3.1.12 <i>Clostridium septicum</i> Laboratorio comercial .....	54
2.3.1.13 <i>Clostridium chauvoei</i> Laboratorio comercial .....	55
2.3.1.14 <i>Clostridium sordellii</i> Laboratorio comercial.....	56
<b>2.3.2      Análisis filogenético.....</b>	<b>60</b>
<b>2.4 Discusión .....</b>	<b>64</b>
<b>2.4.1 Caracterización bioquímica.....</b>	<b>64</b>
<b>2.4.2 Caracterización molecular.....</b>	<b>65</b>
2.4.2.1 <i>Clostridium botulinum</i> .....	66
2.4.2.2 <i>Clostridium sordellii</i> .....	69
2.4.2.3 <i>Clostridium chauvoei</i> y <i>Clostridium septicum</i> .....	70
<b>2.4.3 Variables climatológicas y del suelo.....</b>	<b>71</b>
<b>2.4.4 Otras consideraciones.....</b>	<b>72</b>
<b>3. Epidemiología de clostridios patógenos asociados a los suelos, causantes de mortalidad en bovinos, en zonas ganaderas de Colombia .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Introducción .....</b>	<b>75</b>
<b>3.2 Materiales y métodos .....</b>	<b>76</b>
<b>3.2.1. Población estudiada.....</b>	<b>79</b>
<b>3.2.2. Análisis estadístico .....</b>	<b>80</b>
<b>3.2.3      Variables bioclimáticas .....</b>	<b>81</b>
<b>3.3. Resultados.....</b>	<b>82</b>
3.3.1 Distribución geográfica del área encuestada .....	82
3.3.1.1 Departamento de Tolima, municipio de Mariquita.....	83
3.3.1.2 Departamento de Cundinamarca, Municipios de Nemocón y Ubaté.....	84
3.3.1.3 Departamento del Meta Municipio de Puerto López.....	85
<b>3.4 Discusión.....</b>	<b>116</b>

---

3.4.1 Descripción de los predios encuestados .....	116
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>127</b>
<b>5. Recomendaciones .....</b>	<b>129</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>131</b>
<b>Anexo 1: Publicación Revista Corpoica–Ciencia y Tecnología Agropecuaria 2008</b>	<b>147</b>
<b>Anexo 2: Secuencias publicadas en Gen Bank (National Center for Biotechnology Information) 2010.....</b>	<b>158</b>
<b>Anexo 3: Publicación Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 2011 .....</b>	<b>180</b>
<b>Anexo 4: Artículo publicado en journal Global Advanced Research Journal of Microbiology 2012 .....</b>	<b>181</b>
<b>Anexo 5: Artículo sometido a evaluación para publicación en la Revista MVZ de la Universidad de Córdoba. 2012.....</b>	<b>189</b>
<b>Anexo 6: Alineamientos con secuencias obtenidas .....</b>	<b>205</b>
<b>Anexo 7. Encuesta sobre mortalidad en bovinos.....</b>	<b>211</b>

## Lista de figuras

Figura 2 1 Tipos de muestreo de un lote: a) Muestreo al azar b) Muestreo al azar estratificado c) Muestreo en áreas de referencia d) Muestreo en grilla (Ferraris, 2005) .....	27
Figura 2 2 Fijación en lámina porta objeto de colonias de <i>Clostridium spp.</i> , coloreadas con coloración de Gram. Se indica la típica forma bacilar de los Clostridios y la presencia de esporas subterminales. ....	37
Figura 2 3 Colonias de <i>Clostridium</i> en cajas de petri con agar sangre. Izquierda: colonia con presencia de hemólisis Alfa. Derecha: colonia con presencia de hemólisis Beta.....	38
Figura 2 4 Caja de petri con Agar Yema de Huevo. <i>Clostridium</i> positivo a reacciones Lipasa y Lecitinasa. ....	38
Figura 2 5 Cultivo de células HeLa. Categoría del 0% de daño celular: No se observa daños en las células HeLa. ....	43
Figura 2 6 Cultivo de células HeLa. Categoría del 25% de daño celular: Se observa leve vacuolización (a) y pérdida de contornos celulares.....	43
Figura 2 7 Cultivo de células HeLa. Categoría del 50% de daño celular: Se observa aumento en la vacuolización intracitoplasmática (a) y cambio en la morfología de las células (b). ....	44
Figura 2 8 Cultivo de células HeLa. Categoría del 75% de daño celular: Se observa leve vacuolización (a) y pérdida de contornos celulares.....	44
Figura 2 9 Cultivo de células HeLa. Categoría del 100% de daño celular: Lisis celular, se destruye en su totalidad el cultivo de células. ....	45
Figura 2 10 Dendograma relaciones filogenéticas de <i>Clostridium spp.</i> basado en secuencias de 16SrDNA. Los valores Bootstrap (expresados como porcentajes de 10000 replicaciones) son demostrados en las ramas. Modelo Kimura 2 – Parámetros. (Mega 4®). ....	59
Figura 2 11 Dendograma, relaciones filogenéticas de clostridios basado en secuencias de 16SrDNA. Los valores Bootstrap (expresados como porcentajes de 1000 replicaciones) son demostrados en las ramas. Modelo Tamura 3 – Parámetros. (Mega 4®). La barra representa el 10% de divergencia genética .....	62

Figura 3 1 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Departamento de Cundinamarca, municipios de Ubaté y Nemocón; Departamento del Meta, municipio de Puerto López y Departamento del Tolima municipio de Mariquita. Se indica en colores diferentes los municipios seleccionados en los tres departamentos. 2007 .....	82
Figura 3 2 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Distribución geográfica departamento del Tolima. Provincias. Se indica en líneas rojas el municipio de Mariquita ubicado en la Provincia Norte del departamento. Epidemiología de brotes de mortalidad bovina en zonas ganaderas de Colombia. 2007.....	83
Figura 3 3 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Distribución geográfica departamento de Cundinamarca. Provincias. Se indica en líneas rojas los municipios de Nemocón, Provincia Sabana Centro y el Municipio de Ubaté, Provincia Ubaté, zona de influencia del estudio epidemiológico. Epidemiología de brotes de mortalidad bovina en zonas ganaderas de Colombia 2007 .....	84
Figura 3 4 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Distribución geográfica departamento del Meta. Regiones Naturales. Se indica en líneas rojas el municipio de Puerto López, Región Natural Río Meta, zona de influencia del estudio epidemiológico. Epidemiología de brotes de mortalidad bovina en zonas ganaderas de Colombia. 2007.....	87
Figura 3 5 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Asistencia técnica en predios encuestados. 2007.....	91
Figura 3 6 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Disponibilidad de Recurso Hídrico y Usos. 2007.....	92
<b>Figura 3 7</b> Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Municipio de Mariquita (departamento del Tolima). Ubicación de predios positivos a casos de Mortalidad. 2007.....	101
Figura 3 8 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Municipio de Ubaté (departamento de Cundinamarca). Ubicación de predios positivos a casos de Mortalidad. 2007.....	101
Figura 3 9 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Municipio de Nemocón (departamento de Cundinamarca). Ubicación de predios positivos a casos de Mortalidad. 2007.....	102
Figura 3 10 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Municipio de Puerto López (departamento del Meta). Ubicación de predios positivos a casos de Mortalidad. 2007.....	102

---

Figura 3 11 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Mortalidad bovina que el ganadero relaciona con medidas de manejo (Relación porcentual) 2007 .....	103
Figura 3 12 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Consumo de elementos extraños reportado por los ganaderos (% fincas). 2007 .....	104
Figura 3 13 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Disposición de los animales muertos (% fincas que reportan). 2007 .....	105
Figura 3 14 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Comparación de variables climatológicas temperatura máxima, temperatura mínima y precipitación entre fincas positivas y fincas negativas a mortalidad. 2007 .....	107



## Lista de tablas

Tabla 1.1 Especies de <i>Clostridium</i> toxinogénicos y número de toxinas producidas .....	8
Tabla 1.2 Características morfológicas de algunas especies del género <i>Clostridium</i> .....	12
Tabla 1.3 Algoritmo para la identificación de especies del género <i>Clostridium</i> .....	15
Tabla 1.4 Enfermedades Clostridiales .....	17
Tabla 2.1 Estudio epidemiológico Longitudinal. Cálculo del tamaño de la muestra para detectar enfermedad. ....	26
Tabla 2.2 Distribución de la muestra en los municipios de Mariquita departamento del Tolima, Nemocón, departamento de Cundinamarca, Puerto López, departamento del Meta y Ubaté, departamento de Cundinamarca, según fracción de muestreo.....	27
Tabla 2.3 Aislamiento de <i>Clostridium spp.</i> , relación de aislamientos a partir de muestras de suelos en diez fincas de los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón (Cundinamarca), Puerto López (Meta) y Ubaté (Cundinamarca).....	39
Tabla 2.4 Aislamiento de 24 cepas de <i>Clostridium spp.</i> Número de cultivos y medios utilizados. Prueba biológica en cultivo celular (HeLa). Diez fincas de los municipios de Mariquita, Nemocón, Puerto López y Ubaté.....	42
Tabla 2.5 Tamaño de los amplímeros de las secuencias del gen 16SrARN de <i>Clostridium spp.</i> aislados; Tamaño de los amplímeros de las secuencias del gen 16SrARN de <i>Clostridium</i> utilizado en la producción de vacuna por un laboratorio comercial.....	57
Tabla 2.6 Porcentaje de similitud de secuencias de <i>Clostridium spp.</i> Secuencia de bacterias aisladas; secuencias de bacterias de laboratorio comercial.....	58

---

Tabla 2 7 Distancia evolutiva de <i>Clostridium spp.</i> , bacterias aisladas, bacterias de laboratorio comercial y cepas de referencia (GenBank). Diez fincas de los municipios de Mariquita, Nemocón, Puerto López y Ubaté. Modelo Kimura 2 – Parámetros. (Mega 4®). ....	61
Tabla 2 8 Distancia evolutiva de <i>Clostridium spp.</i> , bacterias aisladas, bacterias de laboratorio comercial y cepas de referencia (GenBank). Diez fincas de los municipios de Mariquita, Nemocón, Puerto López y Ubaté. Modelo Tamura 3 – Parámetros. (Mega 4®). ....	63
Tabla 3 1 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Estimación del tamaño de la muestra, partiendo de poblaciones grandes. 2007 .....	79
Tabla 3 2 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Tabla de contingencia 2x2 para análisis de información epidemiológica. 2007 .....	81
Tabla 3 3 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Hectáreas/predio (promedio) de las fincas entrevistadas en los municipios de Mariquita, Puerto López, Nemocón y Ubaté; distribución porcentual de fincas según su tamaño. Comparación fincas positivas y negativas a mortalidad bovina. 2007 .....	88
Tabla 3 4 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Topografía de las fincas clasificadas en planas, onduladas. Se indica cuales son inundables y se relacionan con la positividad a mortalidad bovina. 2007 .....	89
Tabla 3 5 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Área (ha) de pastoreo del ganado y tamaño total de las fincas. Se estratifican las fincas por tamaño y número de potreros; se indican sus respectivas áreas. 2007 .....	90
Tabla 3 6 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Estructura absoluta y porcentual de los hatos/grupos de edad en 165 fincas encuestadas en los municipios de Nemocón, Mariquita, Puerto López y Ubaté. 2007.....	93
Tabla 3 7 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Estructura de los hatos/grupos de edad. Comparación y significancia entre fincas positivas y negativas a mortalidad en 165 fincas encuestadas en los municipios de Nemocón, Mariquita, Puerto López y Ubaté. 2007 .....	94
Tabla 3 8 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Carga ganadera/ha en 165 hatos de los municipios de Nemocón, Mariquita, Puerto López y Ubaté. 2007 .....	95

---

Tabla 3 9 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Razones poblacionales aproximadas en 165 fincas encuestadas en los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón (Cund.), Puerto López (Meta); Ubaté (Cund.). 2007.....	96
Tabla 3 10 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Relación absoluta y porcentual de las razas bovinas utilizadas por los productores en 165 fincas encuestadas en los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón, Ubaté (Cundinamarca); Puerto López (Meta). 2007 .....	96
Tabla 3 11 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Otras especies animales encontradas en las encuestas de 165 fincas de los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón, Ubaté (Cundinamarca); Puerto López (Meta). 2007 .....	97
Tabla 3 12 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Forrajes utilizados en 165 fincas de los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón (Cundinamarca), Puerto López (Meta) y Ubaté (Cundinamarca). 2007 .....	98
Tabla 3 13 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Manejo de praderas en 165 fincas de los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón, Ubaté (Cundinamarca); Puerto López (Meta). 2007 .....	99
Tabla 3 14 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Relación absoluta y porcentual de fincas afectadas por municipio. Total de animales muertos por municipio. Prevalencias de punto en fincas y tasas de mortalidad. 2007 .....	100
Tabla 3 15 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Época de muerte. Relación absoluta y porcentual de fincas afectadas por Clostridiosis en los municipios y distribución de las mismas en las épocas climáticas. 2007 .....	100
Tabla 3 16 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables bioclimáticas de fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad bovina. 2007.....	106
Tabla 3 17 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. pH de los suelos de fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	108
Tabla 3 18 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Drenaje natural de suelos. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	109
Tabla 3 19 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Paisaje de fincas. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	110

---

Tabla 3 20 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Capacidad de uso del suelo. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	111
Tabla 3 21 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Espesor Horizonte (cm). Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	112
Tabla 3 22 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Piso térmico. Relación absoluta y porcentual, comparación entre fincas afectadas y fincas no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	113
Tabla 3 23 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje de ocupación. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	114
Tabla 3 24 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje Valor Arcilla. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	114
Tabla 3 25 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje Valor Arena. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	115
Tabla 3 26 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje Valor Limo. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	115
Tabla 3 27 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje de pendiente. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007 .....	116
Tabla 3 28 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Especie bovina: Condiciones patológicas relacionadas con <i>Clostridium spp.</i> , diagnosticadas en Colombia y tasas de morbi-mortalidad. Colombia. 2007 .....	119

## Abreviaturas

Abreviatura    Término

---

rARN	Acido Ribonucleico Ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
ICSP	Comité Internacional de Sistemática de Procariotas
ADN	Acido Desoxirribonucleico
° C	Grados Celsius
H	Horas
T	Terminales
ST	Subterminales
RV	Raramente vistas
IA-1	N-acil hemoserine-lactona
IA-2	S-adenosilmetionina
AIS	Autoinductores
µm	Micra
kDa	Kilodaltons
PEG	Programa Educación Graduados
$\chi^2$	Chi cuadrado
RP	Razón de Prevalencias
OD	Odds Ratio
FE	Fracción Etiológica
FA	Fracción Atribuible
RA	Riesgo atribuible
km <sup>2</sup>	Kilómetro cuadrado
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mm	Milímetro
ha	Hectárea

---

Abreviatura	Término
P	Nivel de significancia
Pos	Positivo
Neg	Negativo
UGG	Unidad de gran ganado
LC	Límite de confianza
NR	No registra información
pH	Potencial de hidrogeniones
cm	Centímetro
CR	Coeficiente de regresión
EE	Error estándar
Z	Nivel de confianza
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
FAO	Food and Agriculture Organization
kg	Kilogramo
GPS	Global position System
ml	Mililitro
TTC	Tioglicolato Trozos de Carne
μl	Microlitro
AS	Agar sangre
BHI	Brain hearth infusión
HeLa	Células de Carcinoma Uterino Humano
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal 50
FTA	Flinders Technology Associates
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
G	Guanina
C	Citocina
BoNT	Neurotoxina botulínica
LT	Toxina Letal
IFA	Inmunofluorescencia directa

## Introducción

En las ganaderías bovinas de Colombia se presentan frecuentemente casos de mortalidad ocasionados por clostridios, condición que se caracteriza porque los animales de cualquier edad mueren repentinamente sin que se presenten síntomas ni alteraciones en su comportamiento ni en su condición corporal; el curso de la enfermedad es tan corto que no da tiempo de diagnosticar adecuadamente el problema ni de instaurar terapias. Cuando el animal muere no se observan lesiones aparentes, lo cual dificulta el diagnóstico que en la mayoría de los casos se basa en evidencias epidemiológicas (Caraballo, 1973; Mullenax, 1982; García *et al.*, 1984; Uribe, 1996; Huertas *et al.*, 1999; Benavides, 2003; Benavides, 2004).

En países latinoamericanos existen pocos laboratorios que puedan identificar y diagnosticar con certeza, los aislamientos de *Clostridium spp.*, situación que complica la toma de decisiones por parte de asistentes técnicos y de productores. Los intentos de diagnóstico para animales muertos y afectados clínicamente no son exitosos y no se apoyan en metodologías diagnósticas adecuadas (Garmendia *et al.*, 1993; Gamboa *et al.*, 1993-2005; Seiffert *et al.*, 1996; Mudenda *et al.*, 2000). Los casos de mortalidad se presentan - según lo describen algunos ganaderos - cuando se observan cambios estacionales (verano-invierno), y lo relacionan con inundaciones, deficiencias minerales, intoxicaciones, plagas y finalmente picadura de serpientes (García *et al.*, 1984; Mullenax, 1983; Molina, 1995; Ortiz, 2000, a y b). Se destaca en este contexto la ausencia de estudios adecuados que permitan soportar la toma de decisiones (Toro *et al.*, 2007).

En el boletín No. 1 del ICA "Botulismo Bovino en los Llanos Orientales de Colombia" publicado en 1999, se comenta que desde el año 1993 los 4.5 millones de bovinos de la ganadería llanera se encuentran en riesgo de contraer una nueva y mortal enfermedad por intoxicación alimentaria, afectándose principalmente las ganaderías de las sabanas del Meta y Vichada. En 1998 se detectaron en sabanas del Meta y Vichada 68 focos de

mortalidad donde murieron 1.226 vacas y novillas de buena condición corporal que sin contabilizar pérdidas gestacionales y terneros huérfanos, produjeron pérdidas económicas directas cercanas a los 558 millones de pesos. En 13 fincas de la altillanura colombiana con 5360 hembras mayores de 2 años murieron 642, para un 12% de mortalidad, con un rango entre 7.9 y 33.7% (Huertas *et al.*, 1999).

En el mes de marzo de 2010 informó el Instituto Colombiano Agropecuario que unos 200 animales del municipio de San Miguel de Sema en el departamento de Boyacá habían muerto, e igualmente se registraron casos aislados en los municipios de Susa, Guachetá, Chiquinquirá, Simijaca y Ubaté (<http://www.ica.gov.co/Noticias/Pecuaria/2010/>). Esta mortalidad se ha relacionado con la presencia de heladas, seguidas de veranos prolongados y temporada de lluvias.

Los diferentes trabajos realizados en Colombia para dar solución a esa problemática se limitan a dar diagnósticos presuntivos de las causas de mortalidad, debido a la falta de lesiones patológicas en los animales muertos y a la no disponibilidad de metodologías de diagnóstico en los laboratorios. Esta situación lleva a plantear el desarrollo de proyectos de investigación aplicada, que permitan calificar y cuantificar la problemática y que involucren avances en metodologías de identificación de las bacterias relacionadas haciendo menos énfasis en presunciones (Seifert *et al.*, 1996; Parra *et al.*, 1997).

Los clostridios patógenos asociados a los suelos en fincas afectadas por mortalidad, ocupan un lugar importante en salud pública y en los sistemas de producción ganaderos, ya que dichas bacterias causan brotes de mortalidad en humanos y en animales, por las infecciones o por las toxinas que producen (clostridiosis). Las clostridiosis han ocupado un lugar importante en los sistemas de producción ganaderos del mundo (Mudenda *et al.*, 2000; Titball *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2011), ya que generan múltiples patologías de tipo agudo y producen pérdidas económicas.

Los Clostridios son bacilos anaerobios espora formadores Gram-positivos, los cuales se distribuyen mundialmente en toda clase de ambientes: suelos ricos en *humus*, agua, plantas, tracto gastrointestinal de animales y de humanos (Dowel *et al.*, 1976; Kohler *et al.*, 1983; Hatheway, 1990; Titball *et al.*, 2006). Este género comprende entre 120 a 160 especies (algunas aún no aceptadas), de las cuales 13 son consideradas de mayor



patogenicidad y son las que se relacionan con los casos de mortalidad en todas las especies animales y en el hombre (Quinnand & Markey, 2003).

Las patologías asociadas con este tipo de microorganismos (tétano, botulismo, pierna negra, edema maligno, enfermedad negra, hemoglobinuria bacilar, entero toxemia, riñón pulposo, entre otras), afectan animales de muy buena condición corporal, son de curso agudo y su efecto patógeno se asocia principalmente con las toxinas que producen, ya que dichas toxinas afectan diferentes tejidos corporales. La mayoría de las veces su efecto es tan rápido que los animales no presentan sintomatología clínica o ésta se hace poco evidente lo que dificulta su diagnóstico y su tratamiento (Kohler *et al.*, 1983; Blood *et al.*, 1986; Munang'andu *et al.*, 1996).

Por la agudeza de la enfermedad la mayoría de las veces, en el examen *postmortem*, no se encuentran lesiones de ningún tipo, dificultando el diagnóstico patológico, clínico, microbiológico, o de otra índole, causando confusión en los profesionales de campo y en los productores. El cuadro clínico culmina casi siempre con la muerte de los animales afectados (Dowel *et al.*, 1976; Hatheway, 1990; Parra *et al.*, 1993-1996; Uribe, 1996; Titball *et al.*, 2006).

La producción de biológicos para el control de las clostridiosis es muy variada en nuestro país (Aprovet, 2011); los inmunógenos disponibles incluyen diferentes clases y tipos de cepas de *Clostridium* y de sus toxinas. El material biológico para la elaboración de dichos productos se importa de laboratorios de referencia (American Type Culture Collection - ATCC). A pesar de lo anterior, los ganaderos de los municipios afectados en el departamento de Boyacá le han indicado a algunos laboratorios productores de biológicos, que a pesar de utilizar sus productos con las recomendaciones dadas por ellos, sus animales mueren en forma aguda con síntomas compatibles con éste tipo de bacterias (Ortiz, 2000, a).

La investigación enfocada a la caracterización molecular de los microorganismos adaptados a nuestro medio y a nuestros animales debe convertirse en una prioridad técnico-científica (Seiffert, 1996; Seiffert *et al.*, 1996). La caracterización de nuestros microorganismos (megadiversidad) debe ser conocida, ya que este tipo de conocimiento original permitirá generar muchas estrategias de prevención y de control

de los mismos y evitará que su presencia sea una barrera que cierre los mercados internacionales. De igual forma, su conocimiento facilitará el diagnóstico de dichas entidades y la preparación de biológicos autóctonos que permitan su control, sumado al invaluable conocimiento técnico científico que aporta este tipo de desarrollo (Seifert *et al.*, 1996; Potes, 2005).

Por estas razones y dada la complejidad biológica y los principales aspectos de la epidemiología de los organismos asociados con el suelo, se destaca la necesidad de utilizar un abordaje epidemiológico cuando se requiera adelantar investigaciones sobre la relación de causalidad de estos microorganismos asociados a casos de enfermedad y o mortalidad en el hombre, pero particularmente en animales domésticos (Seifert *et al.*, 1996).

Las decisiones para definir las acciones de prevención, control y erradicación de una enfermedad se fundamentan en el conocimiento de la misma - el cual muchas veces es superficial - y en el impacto económico que dicha entidad produce y que está relacionado con la historia natural del agente (Martin *et al.*, 1997; Perry *et al.*, 2000; Thrusfield, 2005).

Se ha demostrado en algunos trabajos como el de Seifert *et al.*, (1996) y el de Gamboa *et al.*, (2005), la importancia de la identificación de las cepas locales y de estudios para discernir la epidemiología local de estos microorganismos con el fin de utilizar cepas nativas – las cuales no siempre son homólogas con las cepas de referencia, por ejemplo de la ATCC - , para la preparación de inmunógenos.

Con el propósito de conocer la problemática y dar alternativas de solución a los brotes de mortalidad, se desarrolló un estudio para caracterizar las bacterias patógenas del género *Clostridium* spp asociadas al suelo de fincas afectadas por dichos brotes. Para lograr este propósito se plantearon y desarrollaron los siguientes objetivos:

- Aislar y caracterizar bacterias patógenas del género *Clostridium* spp. en los suelos de las fincas afectadas; por medio de técnicas fenotípicas: morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas (Capítulo 2).

- Caracterizar molecularmente los clostridios aislados para evaluar su variabilidad genética y compararla con bacterias de referencia, mediante la amplificación de un segmento de 1500 pares de bases localizado en el gen 16S del ARN ribosomal (Capítulo 2).
- Caracterizar epidemiológicamente las zonas afectadas (Capítulo 3).



# 1. Revisión de literatura

## 1.1 Generalidades sobre clostridios

Desde el punto de vista ecológico y epidemiológico, en Medicina Veterinaria se conoce como bacterias asociadas al suelo, a aquellos grupos de organismos que dada su capacidad de producción de esporas, utilizan el suelo como su principal medio de diseminación; estos corresponden básicamente a las bacterias de los géneros *Clostridium* y *Bacillus* (Seifert *et al.*, 1996).

La familia de las bacterias del género *Clostridium* está constituida por organismos bastante diferentes, que causan enfermedades diversas, las cuales se agrupan bajo el denominador común de “clostridiosis”. Las bacterias que hacen parte de este grupo se denominan comúnmente “clostridios”; estos son organismos saprofitos, de vida libre, distribuidos ampliamente en el suelo; sin embargo cierto número de especies ocurren naturalmente en el tracto digestivo de animales y humanos (Carter & Chengapa, 1991).

La clasificación taxonómica según el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICSP) ubica los clostridios en el Phylum *Firmicutes*, Clase *Clostridia*, Orden *Clostridiales*, familia *Clostridiaceae*, género *Clostridium* (Garrity *et al.*, 2007). El género *Clostridium* comprende entre 120 a 160 especies (algunas aún no aceptadas) de bacilos espora formadores Gram positivos, de las cuales 70 a 80% son saprofíticas e inofensivas para el hombre y para los animales. De las restantes 25 especies son patógenos de plantas, animales, alimentos y productos derivados de la leche y 13 especies, son consideradas patógenas muy virulentas. Estas se encuentran en animales principalmente en el tracto digestivo. Ellas pueden participar en procesos de fermentación y putrefacción (Quinnand & Markey, 2003).

La notable capacidad que presentan estos microorganismos para provocar enfermedades se atribuye a su posibilidad de sobrevivir en condiciones adversas mediante la formación de esporos, a su rápida velocidad de crecimiento en medios enriquecidos nutricionalmente y sin oxígeno y a la producción de numerosas toxinas. La tabla 1.1 presenta diferentes especies y el número de toxinas producidas por cada una de ellas.

**Tabla 1.1** Especies de *Clostridium* toxinogénicos y número de toxinas producidas

ESPECIES	Número de Toxinas
<i>C. septicum</i> (1877)	4
<i>C. chauvoei</i> (1887)	4
<i>C. tetani</i> (1889)	2
<i>C. perfringens</i> (1892)	14
<i>C. novyi /oedematiens</i> (1894)	8
<i>C. botulinum</i> (1895)	3
<i>C. histolyticum</i> (1916)	5
<i>C. bifermentans</i> (1919)	3
<i>C. sordellii</i> (1922)	4
<i>C. haemolyticum</i> (1929)	3
<i>C. difficile</i> (1935)	3
<i>C. spiroforme</i> (1965)	2
<i>C. butyricum</i> (1977)	1
<i>C. baratii</i> (1985)	2
<i>C. argentinense</i> (1988)	1
Total	59

Fuente: Titball; Mainil; Duchesnes & Popoff, 2003.

La mayor o menor virulencia del clostridio es casi exclusivamente debida a la producción de una gama amplia de toxinas incluyendo muchas de las llamadas enterotoxinas, neurotoxinas, histotoxinas y toxinas letales, según una clasificación basada en las señales clínicas principales y lesiones del tejido (Alouf & Jolivet-Reynaud, 1981; Hatheway, 1990; Rood & Cole, 1991; Songer, 1996; Popoff & Marvaud, 1999; Herreros *et al.*, 1999; Rossetto *et al.*, 2001, reportados por Titball *et al.*, 2003).

*Clostridium tetani* fue observado primero en exudados de una herida en 1884 por Flüge, Rosenbach y Nicolaier; Kitasato fue el primero en obtener un cultivo puro en 1889. Un año después la toxina del tétano fue descubierta en sobrenadantes de cultivo de *Clostridium tetani* por K. Faber. Sus toxinas fueron identificadas en un periodo aproximado de 100 años (Alouf & Jolivet-Reynaud, 1981; Hatheway, 1990; Rood & Cole, 1991; Songer, 1996; Popoff & Marvaud, 1999; Herreros *et al.*, 1999; Rossetto *et al.*, 2001, reportados por Titball *et al.*, 2003).

La taxonomía actual de algunos clostridios como *Clostridium botulinum* está basada en los atributos de las neurotoxinas botulínicas (BoNTs) producidas (Hill *et al.*, 2010), las cuales los clasifican en siete grupos serológicamente diferentes (serotipos A hasta G) (Hatheway, 1995). Las toxinas clostridiales se encuentran dentro de las toxinas más potentes del mundo microbiano, y varias están entre las primeras identificadas y reconocidas como factores de virulencia. Cada BoNT es codificada por un gen de aproximadamente 3 Kb que es precedido por un gen de no toxina no hemaglutinina y muchos otros genes que codifican toxinas asociadas a las proteínas (HA-17, HA-33, HA-70, p21 y p47) (Balding *et al.*, 1973; Collins & East, 1998; East *et al.*, 1996; East *et al.*, 1994; Popoff & Marvaud, 1999).

El gen BoNT de las cepas de los serotipos A, B, E y F puede ser encontrado dentro del cromosoma bacteriano. Las cepas de los serotipos C y D producen toxinas de un genoma fago siendo responsables de los casos de mortalidad súbita en rumiantes (Popoff & Marvaud, 1999), situación que podría complicar el diagnóstico, ya que cepas productoras de toxinas interserotipos recombinantes primariamente, la C/D y D/C, codificadas en fagos han sido reportadas (Moriishi *et al.*, 1996 a y b). Esto explicaría por qué varias cepas producen múltiples toxinas. Se han reportado cepas de *Clostridium botulinum* bivalentes que producen toxinas de serotipos Ab, Ba, Af y Bf (Barash & Arnon, 2004; Giménez & Giménez, 1993; Santos-Buelga *et al.*, 1998).

En otros estudios Hill *et al.*, 2007 analizaron una colección de 174 cepas de *Clostridium botulinum* por AFLP (amplified fragment length polymorphism), por secuenciación del gen 16S rRNA y por secuenciación de los genes BoNT (neurotoxinas botulínicas) para examinar la diversidad genética de éstas especies. El análisis de las secuencias del gen

16S rRNA confirmó identificaciones previas de al menos cuatro grupos distintos (Grupos I a IV), cada uno de ellos adquirió uno o más genes de BoNT independientemente a través de transferencia horizontal.

Los clostridios a través de sus neurotoxinas desarrollan su mecanismo patógeno letal. Varios autores (Eklund *et al.*, 1971; Govind *et al.*, 2009), indican que algunas bacterias aparentemente no tóxicas de *Clostridium botulinum* y de *Clostridium difficile* desarrollan un proceso de transducción (la bacteria toma DNA exogénico y lo incorpora a su genoma) que las convierte en tóxicas, debido a bacteriófagos que influyen en la regulación de los genes que inducen la producción de toxinas, situación que se podría extrapolar a las bacterias encontradas, por lo que se hace necesario desarrollar investigaciones en este sentido, para aclarar la situación real de las bacterias y su papel en los casos de mortalidad.

## 1.2 Microbiología de clostridios

La clasificación de los clostridios desde el punto de vista epidemiológico como bacterias asociadas al suelo se considera importante porque no solamente tiene en cuenta los aspectos microbiológicos sino aspectos relacionados con su evolución, como el desarrollo de cubiertas resistentes para soportar la adversidad de condiciones ambientales desfavorables y de la evolución huésped-parásito lo cual brinda herramientas para comprender la patogenia y epidemiología de estos microorganismos (Benavides, 1995).

La tolerancia al oxígeno de las bacterias del género *Clostridium*, varía según las especies; algunas son anaerobias muy estrictas, como *Clostridium novyi*, que solo puede crecer en ambientes con menos de 0.5% de oxígeno, otras presentan una elevada aerotolerancia, como *Clostridium tertium*, y la mayoría tiene exigencias intermedias soportando del 2 al 8% de oxígeno. Pueden crecer en un gran intervalo de temperaturas que varía desde 4° C para *Clostridium botulinum* del tipo E hasta 69° C para los clostridios termófilos. Sin embargo, para la mayoría de ellas la temperatura óptima es de 30 a 37° C (Hateway, 1990; Vadillo, Píriz & Mateos, 2002).



Las células vegetativas tienen forma de bacilos, pudiendo variar desde bacilos cocoides cortos a largos bacilos filamentosos. Pueden aparecer sueltos, en parejas o en cadenas. Aunque la mayoría de las especies se tiñen como Gram positivas, pueden ser Gram variables. *Clostridium clostridioforme* y *Clostridium ramosum* suelen ser Gram negativos incluso en cultivos jóvenes de 24 horas y *Clostridium tetani* puede aparecer como Gram-negativo después de la formación de esporas. Las esporas pueden tener forma oval o esférica y aparecer en situación terminal o subterminal. La demostración de esporas, es difícil en algunas especies como *Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosum* y *Clostridium clostridioforme*. La mayoría de las especies poseen flagelos peritricos y son móviles; sin embargo *Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosum* y *Clostridium innocuum* son inmóviles. Raramente producen catalasa pero cuando lo hacen, la reacción es débilmente positiva (Hateway, 1990; Vadillo, Píriz & Mateos, 2002).

Algunas especies son sacarolíticas (fermentación de la glucosa), otras proteolíticas (hidrólisis de la gelatina) y otras pueden tener ambas características. La lecitinasa (alfa-toxina, fosolipasa C) produce un halo opaco alrededor de la colonia por lisis de la lecitina y la lipasa transforma las grasas en glicerol y ácidos grasos, dando una capa iridiscente que cubre la superficie de la colonia (Dürre, 2005; Isenberg, 1998).

La mayoría de clostridios crece bien en agar sangre, medio de carne cocida o caldo tioglicolato. Las especies se diferencian en el laboratorio con base en la posición de la espora (terminal o subterminal), motilidad y capacidad de hidrólisis de la gelatina. Otras pruebas adicionales para diferenciarlos incluyen determinación de lipasa, lecitinasa e indol, características de crecimiento en leche, capacidad de fermentación de azúcares (glucosa, maltosa, lactosa y sucrosa) y la determinación de los principales productos de fermentación (Carter & Chengapa, 1991; Mainil *et al.*, 2003). La cromatografía de gases es utilizada como herramienta para lograr una identificación final (Seifert, 1996). En la tabla 1.2, se indican las principales características de los clostridios cuando se tiñen con colorante de Gram y cuando se observan algunas características de las colonias.

**Tabla 1. 2** Características morfológicas de algunas especies del género *Clostridium*

Bacteria	Tinción de GRAM	Colonia
<i>Clostridium baratii</i>	Bacilo grande. Esporas (ST), (RV). No móvil	No hemolítica
<i>C. bifermentans</i>	Bacilo grande. Esporas ovals (ST) a veces en cadenas. Móvil	Gris, borde irregulares, hemólisis pequeña. Lecitina (+)
<i>C. botulinum</i>	Bacilo grande. Esporas (ST). Móvil	Irregular, raised, translucent to opaque, grey-white Haemolysis zone
<i>C. butyricum</i>	Extremos redondeados. Grandes esporas ovals (ST). Móvil	Irregular, raised, translucent to opaque, grey-white Haemolysis zone
<i>C. cadaveris</i>	Esporas ovals (T)	Irregular, raised, translucent to opaque, grey-white Haemolysis zone
<i>C. clostridioforme</i>	Gramnegativo. Alargado con extremos en forma de huso y apariencia de barril. Esporas(RV)	Pequeñas, convexas, translúcidas con la superficie moteada o de mosaico
<i>C. difficile</i>	Bacilo relativamente largo, delgado. Esporas ovals (T). Móvil	Colonias translúcidas ligeramente elevadas y con moteado cristalino. Olor a establo o estiércol. En medio CCFA amarillentas. Fluorescencia anaranjada bajo luz ultravioleta.
<i>C. histolyticum</i>	Pleomórfico. Esporas ovals (ST). Móvil	Lisas y rugosas. Aerotolerante.
<i>C. innocuum</i>	Pequeño. Esporas (ST). No móvil	Blanca, brillante. Fluorescencia anaranjada.
<i>C. novyi</i>	Mediano. Esporas ovals (ST). Móvil	Gris, translúcida. Puede dar velo. Doble halo de hemólisis.
<i>C. perfringens</i>	Ancho y corto. Apariencia de ladrillo. Esporas (RV). No móvil	Grande, opaca, tiende a extenderse, sin velo. Doble halo de hemólisis.
<i>C. ramosum</i>	Frecuentemente gramnegativo. Delgado y pleomórfico, en cadenas. Esporas redondas u ovals (T) y (RV). No móvil	Fluorescencia roja
<i>C. septicum</i>	Largos y delgados, pleomórfico y filamentoso. Puede formar cadenas. Esporas ovals (ST). Móvil	Cabeza de medusa con bordes irregulares y rizoides. Produce velo que llega a cubrir la placa
<i>C. sporogenes</i>	Filamentoso en cultivos viejos. Esporas ovals (ST). Móvil	Borde rizoides. Adherencia firme al agar. Produce velo
<i>C. sordellii</i>	Rectos. Esporas centrales o (ST) causan ligera hinchazón de los bacilos y frecuentemente libres. Móvil	Velo o extensión
<i>C. tertium</i>	Esporas grandes ovals (T). Móvil	Pequeña, brillante. Aerotolerante
<i>C. tetani</i>	Delgado. Esporas redondas (T). Apariencia de palillo de tambor. Móvil	Gris, translúcida. Borde irregular. Pequeño halo de hemólisis.

Abreviaturas: (T): terminales; (ST): subterminales; (RV): raramente vistas

Fuente: Isenberg, H., 1998.

Lo mismo que sucede en otros cuadros infecciosos producidos por anaerobios, el desarrollo de la infección por *Clostridium* está asociado con factores del huésped, como la rotura de las barreras cutáneo-mucosas por traumatismo, presencia de otras enfermedades (leucosis) y tratamiento con múltiples antibióticos. Son situaciones en las que el riego sanguíneo se ve comprometido, creándose un ambiente ideal para la proliferación de estos microorganismos que, en condiciones adecuadas de anaerobiosis e hipoxia, pueden invadir y multiplicarse en cualquier tejido (Dürre, 2005; Isenberg, 1998).

Se atribuye a este grupo de bacterias la ubicuidad, lo que significa que se encuentran presentes en cualquier parte, preferentemente en el suelo (sobre todo si es rico en materia orgánica) y en aguas en descomposición. *Quórum sensing* es un fenómeno de comunicación que se produce en respuesta a la densidad celular con el que se controla la expresión de genes, lo que les permite adaptarse a condiciones favorables o desfavorables del medio. El proceso ha sido ampliamente documentado en la expresión de bioluminiscencia de la bacteria marina *Vibrio harveyi*, el cual consiste en la producción, secreción y detección de señales químicas llamadas auto inductores. *Quórum sensing* han sido reportados en el género *Clostridium* (Carter *et al.*, 2005; Nakayama *et al.*, 2003).

La N-acil homoserine-lactona (El IA-1) se utiliza para la comunicación dentro de la misma especie. La S-adenosilmetionina (IA-2) se utiliza para la comunicación entre especies. Se ha demostrado que bacterias del género *Clostridium botulinum* se comunican entre sí durante la germinación y el crecimiento, sin embargo queda por determinar el efecto en otras especies de clostridios y si los auto inductores en ellos también juegan un papel importante como mecanismo de desintoxicación celular (Zhao *et al.*, 2006).

Se presume que este comportamiento coordinado puede ser útil en una variedad de situaciones, por ejemplo las que tienen que ver con cambios del medio ambiente inducidos por la variabilidad climática (inundaciones), que culminan descomponiendo los forrajes y aumentando las poblaciones bacterianas (De Kievit & Iglewski, 2000; Parsek & Greenberg, 2000).

Los animales pueden contaminarse con bacterias directamente del suelo, agua, o a través de la ingestión de pasto. En bovinos una vía de contaminación por *Clostridium spp*

puede ocurrir por la ingestión de materiales de origen animal presente en el pasto, como huesos o carcasas de animales en descomposición (Langenegger, Doveiner & Tocarnia, 1983; De Souza & Langenegger, 1987; Ferreira, 2007); o por ingestión de agua contaminada por animales muertos recientemente, conteniendo toxina o esporos de *Clostridium botulinum* (Schocken-iturrino *et al.*, 1990; Kriek *et al.*, 1994; reportados por Ferreira, 2007).

Por ingestión se producen enfermedades como gangrena enfisematosa (bóvidos), botulismo (alimentos), hemoglobinuria bacilar y morbo negro (Gyles, 1986; Hatheway, 1988; Hatheway, 1990).

Por infección de heridas se transmiten *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* y otros microorganismos productores de gangrena gaseosa (Gyles, 1986; Hatheway, 1988; Hatheway, 1990).

Los clostridios patógenos son formas bacilares móviles no capsulados relativamente grandes según la especie, pueden observarse rectos, curvos, delgados, con extremos romos, redondos, afilados y en ocasiones hasta en espirales o enrollados. Se pueden presentar en forma aislada, en cadenas cortas o como filamentos largos. Las endosporas pueden tener una posición central, subterminal o terminal (Finegold, 1989).

En el cultivo de las bacterias anaerobias están implicados dos principios fundamentales: La reducción de la tensión de oxígeno y el mantenimiento de esta tensión reducida, el cual es un modo natural de preparar las condiciones óptimas de cultivo de las bacterias anaerobias, puesto que crecen en presencia de especies aerobias o tejidos que absorben oxígeno. Uno de los métodos más corrientes empleados en el laboratorio es el cultivo en medio con trozos de carne, hígado, bazo, cerebro o cualquier otro tejido finamente dividido o agregando en medios líquidos sustancias reductoras tales como tioglicolato o cisteína (Caraballo, Manrique & Ochoa, 1980).

Las exigencias anaeróbicas son distintas en cada una de las especies de clostridios y se puede expresar como potencial de óxido-reducción. Los clostridios prefieren una atmósfera con un 2 – 10 por ciento de CO<sub>2</sub>. Estas condiciones se pueden producir en un frasco en el

que el oxígeno es reducido catalíticamente por hidrógeno generado junto con dióxido de carbono mediante un dispositivo que se puede adquirir en el comercio (GasPak®).

La mayoría de los clostridios patógenos necesitan medios de cultivo suplementados con aminoácidos, hidratos de carbono y vitaminas. La sangre o el suero favorecen su crecimiento; así mismo un pH neutro y temperatura de 37°C. El crecimiento se puede observar en un plazo de 1-2 días, las colonias tienen una forma y contorno irregulares. La mayoría de los clostridios son hemolíticos (Gyles, 1986; Hatheway, 1988; Hatheway, 1990; Vadillo, 2002).

El término toxina con respecto al género *Clostridium*, se refiere a péptidos ó proteínas biológicamente activas que son capaces de producir enfermedad; tienen masas moleculares oscilando entre los 22 a 600 kilodaltons (kDa), y son detectadas por sus efectos en animales, tejidos, cultivos celulares o por reacciones en pruebas bioquímicas. La característica dominante de muchas toxinas clostridiales es su letalidad en animales (Gyles, 1986; Hatheway, 1988; Carter, 1991; Hatheway, 1990).

**Tabla 1 3** Algoritmo para la identificación de especies del género *Clostridium*

Leciti nasa	Pos	Lipasa	Pos	<i>C. novyi</i>	Pos	Urea	Pos	<i>C. sordellii</i>	Pos	<i>C. perfringes</i>		
			Neg	Indol			Neg	<i>C. bifermentans</i>			Neg	<i>C. limosum</i>
							Neg	Gelatina				
			Neg	<i>C. baratii</i>								
	Neg	Lipasa	Pos	<i>C. sporogenes</i>	Neg	Género <i>Clostridium</i> <sup>a</sup>						
			Neg									

Fuente: Isenberg, H., 1998.

<sup>a</sup> Para la identificación de especie es necesario utilizar una batería de pruebas más amplia, sistemas comerciales o cromatografía, junto con las características de la tinción de Gram y de las colonias.

La utilización de pruebas bioquímicas como el estudio de la producción de lecitinasa y lipasa en agar yema de huevo, la hidrólisis de la gelatina y de la urea y la producción de indol por el método rápido (p-dimetil-aminocinnamaldehído), constituyen un método fácil para la identificación.

Existen en el mercado sistemas comerciales para la identificación rápida de anaerobios. Unos están basados en pruebas bioquímicas (API 20 A® o Minitek®) y consiguen los resultados en 24-48 h. Otros como Anaerobe ANI Card®, Rapid ID 32 A®, Rapid Anaerobe ID®, Crystal Anaerobe ID® o RapID-ANA® están basados en la detección de enzimas preformadas a partir de sustratos cromogénicos y la lectura se realiza a las 4 h. El porcentaje de identificación correcta que se obtiene con ellos oscila entre 60-80%.

## 1.3 Enfermedades en animales

Se deben distinguir aquellos clostridios que cohabitan en forma saprofita e inofensiva de aquellos que pueden producir toxinas capaces de ocasionar enfermedad y muerte. Aunque estas enfermedades son infecciosas, no son contagiosas. A veces, la aparición de muchos casos simultáneos le da esa apariencia, pero ello es consecuencia de que el factor coadyuvante en el desencadenamiento actúa a la vez en varios animales (Ortiz & Benavides, 2002 b).

En el ganado bovino y ovino existe un amplio grupo de toxiinfecciones producidas por bacterias del género *Clostridium*, que abarca un número diverso de procesos con daños de tipo histotóxico, neurotóxico y enterotóxico. Los clostridios deben su patogenicidad a la producción de exotoxinas que actúan localmente o en diferentes órganos diana, una vez vehiculizadas hasta los mismos (Ortiz, Villamil & Benavides, 2001 b).

Los elementos determinantes de estas patologías son muy variados y dependen de cada tipo de agente causal, pero se pueden agrupar en factores traumáticos (carbón sintomático), alimentarios (deficiencia de fósforo en botulismo), parasitarios (hepatitis necrótica, hemoglobinuria bacilar), de manejo (cambios bruscos de alimentación), higiénico-sanitario, entre otros (Ortiz, Villamil & Benavides, 2001 a). Estos factores determinantes permiten que las bacterias se multipliquen en forma descontrolada, produzcan grandes cantidades de toxinas y desarrollen un cuadro clínico característico del tipo de *Clostridium* presente. Las enfermedades producidas por bacterias del género *Clostridium* ocasionan un sinnúmero de muertes de bovinos y ovinos generando grandes pérdidas a los productores rurales de diferentes partes del mundo. Las enfermedades

más importantes y sus agentes se describen en la tabla 1.4 (Biberstein & Chung, 1994; Hatheway, 1990; Smith & Holdeman, 1968). Las especies de clostridios más importantes de interés clínico, ejercen su acción patógena mediante toxinas elaboradas por ellas, que en algunos casos tienen un elevadísimo poder tóxico. En general son sustancias proteicas solubles y termolábiles (con excepción de la toxina tetánica); unas son difusibles y se producen y liberan durante el crecimiento bacteriano, en tanto que otras se originan por lisis celular. Algunas se sintetizan como prototoxinas o toxinas progenitoras y necesitan para actuar ser activadas mediante enzimas proteolíticas exógenas o de la propia bacteria (Biberstein & Chung, 1994; Bizzini, 1986).

**Tabla 1 4** Enfermedades Clostridiales.

<b>Bacteria</b>	<b>Enfermedad</b>
<i>C. chauvoei</i>	Gangrena enfisematosa (Pierna negra, Carbón sintomático) en ovinos y bovinos.
<i>C. botulinum</i>	Botulismo en diferentes especies de animales (Enfermedad de las bonitas en bovinos) y el hombre.
<i>C. tetani</i>	Tétanos en diferentes especies animales y el hombre.
<i>C. novyi</i> tipo A	Cabeza grande en cameros. Gangrena gaseosa en ovinos.
<i>C. novyi</i> tipo B	Hepatitis necrótica (enfermedad negra) en ovinos.
<i>C. novyi</i> tipo C	Osteomielitis del búfalo doméstico.
<i>C. novyi</i> tipo D ( <i>C. haemolyticum</i> )	Hemoglobinuria bacilar en bovinos.
<i>C. septicum</i>	Gangrena gaseosa (edema maligno) en bovinos, ovinos, cerdos y ocasionalmente otras especies, infección del abomaso en ovinos.
<i>C. sordellii</i>	Miositis necróticas en bovinos.
<i>C. perfringens</i> tipo A	Celulitis anaeróbica y gangrena gaseosa en humanos.
<i>C. perfringens</i> tipo B	Disentería de los corderos.
<i>C. perfringens</i> tipo C	Enterotoxemia hemorrágica en terneros, potros y corderos.
<i>C. perfringens</i> tipo D	Enfermedad del riñón pulposo en corderos, cabras y terneros.
<i>C. perfringens</i> tipo E	Patogenicidad en ovejas y vacas poco conocida.

Fuente: Biberstein & Chung, 1994; Hatheway, 1990; Smith & Holdeman, 1968

El origen de los cuadros clínicos producidos por los clostridios es en la mayoría de las ocasiones endógeno, pero tienen o pueden tener un origen exógeno: tétanos, botulismo, gangrena gaseosa (mionecrosis), celulitis clostridiana, toxicoinfección alimentaria con *Clostridium perfringens* y enteritis necrotizante (Biberstein & Chung, 1994; Bizzini, 1986).

Las endosporas de los clostridios son muy resistentes a los agentes físicos y a los desinfectantes. Para destruir las esporas del género *Clostridium* son necesarios 30 minutos de ebullición; la temperatura de 121°C durante 20 minutos las destruye. Las formas vegetativas de los clostridios son sensibles a las condiciones adversas del medio y a los desinfectantes.

Las bacterias asociadas a los suelos están relacionadas con muchas entidades patológicas que afectan al hombre y a los animales domésticos, causando grandes pérdidas económicas en la industria animal por la mortalidad que producen y por los tratamientos y medidas que se deben instaurar para lograr su prevención, control y erradicación (Seifert *et al.*, 1996). Los clostridios forman parte de la flora del hombre y de los animales y se encuentran ampliamente difundidos en el terreno (debido a la alta resistencia de éstos a factores externos que les proporcionan los esporos). La amplia distribución de los clostridios en la naturaleza induce a que con relativa frecuencia contaminen heridas, pero, al carecer de poder invasivo, estas afecciones están condicionadas por circunstancias favorecedoras exógenas y por el huésped mismo (Pumarola *et al.*, 1984).

## **1.4 Avances de la investigación colombiana en clostridiosis**

En la actualidad en el país existen deficiencias para alcanzar diagnósticos confirmativos en el tema de clostridiosis; la red de centros de diagnóstico oficiales y los laboratorios particulares que ofrecen servicios de diagnóstico veterinario no tienen personal capacitado en este tipo de microorganismos ni técnicas diagnósticas que garanticen su adecuada identificación. Como consecuencia de lo anterior, el desarrollo de estudios epidemiológicos que permitan entender estas bacterias, su historia natural y los riesgos que representa en la salud humana y animal son pocos (Ortiz & Villamil, 2008).

Nuestro país presenta problemas de orden público que limitan a los ganaderos en la búsqueda de soluciones acompañado del atraso en vías de comunicación lo que complica el cuadro aún más. Anualmente la mortalidad de bovinos afecta los diferentes



sistemas productivos, situación que es reforzada muchas veces por el desconocimiento o por la falta de interés del productor.

En Colombia los trabajos sobre clostridiosis son escasos. Diana Obregón (2002) en su libro “Batalla contra la Lepra: Estado, Medicina y Ciencia en Colombia” indica como entre los años 1906 y 1923 el Dr. Federico Lleras Acosta, discípulo del Dr. Claude Vericel, realizó investigaciones en el tema de Carbón Sintomático, por lo cual lo nombran miembro de número de la Academia Nacional de Medicina.

En la década del 70 se realizó una tesis de maestría en el Programa de Educación de Graduados (PEG) Instituto Colombiano Agropecuario -Universidad Nacional de Colombia, que utilizó la técnica de inmunofluorescencia para identificar clostridios asociados a casos de carbones en bovinos. En este trabajo se indicó la importancia clínica de las bacterias anaerobias particularmente los clostridios toxigénicos, pero se señaló que el conocimiento de dichos microorganismos y el papel que jugaban en salud animal y humana era limitado. El trabajo mencionado mostró que los clostridios producen diversas enfermedades en especies mayores y menores y que los sistemas de prevención que se utilizan basados en vacunación aparentemente no estaban dando la debida protección (Caraballo, 1973).

González; Rodríguez & Orrego (1980), publicaron el documento “Enterotoxemia de los Equinos”, en el cual la clostridiosis se resalta como causa de enormes pérdidas económicas en los sistemas de producción en los cuales la economía depende de la utilización de esos animales. En este documento destacan una gran cantidad de factores causales y se ofrecen al productor algunas recomendaciones para prevenir y contrarrestar el problema.

La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria en la década de los noventa consolidó un grupo de investigación que desarrolló trabajos relacionados con la determinación de agentes causantes de mortalidad en bovinos, tratando de desarrollar técnicas que apoyaran el diagnóstico clínico. Los esfuerzos se limitaron inicialmente a la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas que permitieran la identificación de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* en tejidos fijados en formol.

El proyecto se generó como consecuencia de la demanda en diagnóstico por parte de los ganaderos. Posteriormente los esfuerzos se encaminaron a generar algunos ceparios y a producir sueros hiperinmunes en conejos. En la década de los noventa se desencadena un brote epidémico de mortalidad bovina en la Altillanura Plana colombiana (Síndrome Neuroparalítico Bovino), lo que obliga a dirigir los esfuerzos en identificar los factores determinantes asociados a dicha mortalidad. Se estandarizaron protocolos de campo y de laboratorio para diversas enfermedades con el fin de identificar y tipificar (mediante pruebas de neutralización) las posibles toxinas asociadas a clostridios a partir de casos clínicos de animales muertos en la zona afectada (Benavides *et al.*, 1996, 1997 a y b, 1998).

Simultáneamente en el periodo comprendido entre 1997 – 2000 se adelantaron investigaciones epidemiológicas tendientes a describir el patrón de la epidemia en el campo y determinar la presencia de factores de riesgo de ocurrencia de estos eventos (Ortiz, 2000; Ortiz; Villamil & Benavides, 2001 a, b). Los estudios epidemiológicos adelantados por el Programa Nacional de Investigación en Salud Animal de CORPOICA, brindaron importante información para ayudar en el diseño de estrategias de control (Ortiz, Villamil &, Benavides 2001 a, b; Ortiz & Benavides, 2004).

En el periodo 2000-2001 se desarrolló una encuesta de opinión para aplicarla a ciento ochenta productores de la Orinoquía colombiana, con el objeto de conocer las prácticas que los ganaderos estaban llevando a cabo para el control de enfermedades causadas principalmente por bacterias del género *Clostridium spp.* en sus hatos; conocer sus percepciones y conceptos sobre los biológicos que utilizaban o que existían en el mercado como método preventivo para evitar dichas enfermedades y determinar realmente el impacto que las mismas ocasionaban en la zona. La distribución de las encuestas se programó en cinco regiones fisiográficas de la Orinoquía colombiana que incluyeron Altillanura Plana, Orinoquía Inundable, Valles Aluviales Ricos, Piedemonte Llanero. El tiempo de duración del estudio fue de un año (2002).

Como resultado de éste trabajo se concluyó que en Colombia no se habían desarrollado estudios que recomendaran a los usuarios el empleo de determinado tipo de inmunógenos. Se aclaró en el trabajo, que los resultados de la encuesta debían interpretarse cuidadosamente ya que eran el reflejo de la respuesta de los propietarios y

dependía de las percepciones que los mismos tenían, de las campañas que desarrollaron los diferentes laboratorios en la zona y de la información que le brindaron a los productores los institutos gubernamentales que velaban por la salud animal (Ortiz, Rodríguez & Benavides, 2002, documento sin publicar).

Simultáneamente se adelantaron trabajos dirigidos a determinar los factores asociados al desarrollo de inmunidad contra el botulismo, el cual tenía como objetivo evaluar la dinámica de desarrollo y persistencia de inmunidad humoral en bovinos vacunados con toxoides comerciales, para de esta manera orientar a los ganaderos hacia un mejor uso de esta herramienta de control.

Este proyecto se generó como complemento de las investigaciones desarrolladas anteriormente para formular algún tipo de solución sostenible al problema de mortalidad, principalmente cuando se pastorean bovinos en suelos deficientes. Aunque desde el inicio de la emergencia sanitaria se indicó la inmunización de ganado con toxoides contra el botulismo realmente no existía conocimiento adecuado de la respuesta inmune de los animales en pastoreo, que permitiera recomendar esquemas vacunales acorde a las necesidades sanitarias de dichas zonas. Se desarrollaron 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. Se aplicó finalmente una encuesta a los productores y se determinó la importancia de la interacción laboratorio - trabajos de campo (Benavides *et al.*, 2004, trabajos sin publicar).

Durante los años 2003 y 2004 se desarrollaron trabajos en *Clostridium chauvoei*, bacteria causante del Carbón Sintomático (Pierna Negra), una enfermedad fatal en bovinos y ovinos, enfermedad que se presenta en forma esporádica en ciertas áreas donde el microorganismo vive en el suelo, y hace parte del complejo de enfermedades causantes de Muerte Súbita (Ortiz *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2007).

Los estudios se adelantaron por requerimiento de la industria productora de inmunógenos y ante las necesidades que enfrentaban los productores para que la industria les brindara una mejor respuesta para solucionar los problemas de mortalidad en sus ganaderías. Ante la necesidad de metodologías de diagnóstico y debido al vacío tecnológico que se presentaba en centros de diagnóstico, se dio inicio a la búsqueda de

metodologías que permitieran establecer diagnósticos confirmativos certeros sobre la frecuencia de la enfermedad (Ortiz *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2007).

Adicionalmente se efectuó un estudio que describió los hallazgos histopatológicos encontrados en tejidos de cobayos (*Cavia porcellus*) inoculados con una cepa patógena de *C. chauvoei*, los cuales se utilizaron posteriormente para estandarizar la técnica inmunohistoquímica. Los tejidos se fijaron en formaldehído y fueron procesados por la técnica de inclusión en parafina y coloreados con hematoxilina y eosina. Los bloques obtenidos fueron procesados para estandarizar la técnica de inmunoperoxidasa indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal producido por el grupo de investigadores (Ortiz *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2007).

Los resultados de la prueba inmunohistoquímica demostraron la afinidad que tiene el *Clostridium chauvoei* por el músculo estriado esquelético. La técnica de inmunoperoxidasa indirecta estandarizada en este trabajo permitió dar claridad al patólogo de las lesiones anatomopatológicas producidas por el *Clostridium chauvoei* y se convirtió en una técnica confirmatoria, ya que el anticuerpo monoclonal utilizado identificaba específicamente ésta bacteria (Ortiz *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2007).

## **2. Aislamiento y caracterización bioquímica y molecular de clostridios a partir de muestras de suelo de fincas con brotes epidémicos de mortalidad bovina**

### **2.1 Introducción**

La identificación precisa de los clostridios se convierte en una prioridad para determinar el rol que estas bacterias juegan cuando están implicadas en brotes de mortalidad, por lo tanto el uso de metodologías adecuadas para su identificación es una necesidad. Esto facilita discernir su papel en dichos procesos y determinar la importancia patológica, su evolución clínica, y aplicar una terapia preventiva o curativa eficaz.

Se aislaron clostridios patógenos de los suelos de las fincas en las cuales se presentaron brotes de mortalidad en cuatro municipios (Mariquita, Nemocón, Puerto López y Ubaté); dichos aislamientos se clasificaron bioquímica y molecularmente; se determinaron sus relaciones filogenéticas y se estableció la diferencia genética con bacterias del mismo género utilizadas para preparar inmunógenos, con el fin de establecer medidas de prevención y control.

El aislamiento se obtuvo a partir de suelos de los potreros donde murieron los animales; dichas muestras se sometieron a tratamiento en el laboratorio con el fin de eliminar las formas vegetativas de las bacterias y preservar las formas esporuladas (choque térmico a 80° C y posterior tratamiento con alcohol). Posteriormente se cultivaron las esporas utilizando metodologías bacteriológicas convencionales con las cuales se determinaron las características morfológicas macro y microscópicas y las características bioquímicas con las cuales se caracterizaron inicialmente. Posteriormente los aislamientos se

caracterizaron molecularmente. Se aislaron *Clostridium botulinum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum*.

La clasificación de los microorganismos pertenecientes a éste género se ha establecido, tradicionalmente de acuerdo con las técnicas fenotípicas como características morfológicas, culturales y bioquímicas, asociación a determinadas enfermedades, patogenicidad, toxigenicidad y propiedades serológicas (Titball *et al.*, 2003).

Sin embargo, en los últimos tiempos, las homologías existentes en la secuencia del ADN y del ARN ribosómico 16 S constituyen un elemento importante desde la perspectiva de la clasificación. 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%, en un género, y las especies que tienen de un 40% a un 55% en otro (Quinnand & Markey, 2003).

Se reconocen más de 100 especies de clostridios, menos de 20 son patógenas las cuales pueden afectar al hombre y a los animales domésticos. Algunas de estas especies son patógenas por acción de exotoxinas que elaboran dentro o fuera del organismo animal. Los clostridios patógenos están agrupados en cuatro categorías, tres basadas en la actividad de las toxinas y los tejidos afectados y la cuarta conteniendo patógenos de importancia en enfermedades nosocomiales (Chávez *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2001).

La primera categoría incluye los clostridios Neurotóxicos, *C. tetani* y *C. botulinum* (tipo A-G). La segunda categoría clostridios histotóxicos: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* (tipo A), *C. perfringens* (tipo A), *C. sordellii*, *C. haemolyticum* y *C. novyi* (tipo B). La tercera categoría clostridios enteropatógenos y productores de enterotoxemias, *C. perfringens* (tipo A-E). Finalmente la cuarta categoría, otros clostridios como *C. colinum*, *C. difficile*, *C. piliforme* y *C. spiroforme* (Quimn *et al.*, 2004).

Son de gran importancia por ser patógenos del suelo, que al ser consumidos por los animales, producen cuadros de enfermedad esporádica, aguda y mortalidad en animales causados por las toxinas liberadas por la bacteria, lo que conlleva a la presentación de pérdidas económicas a los ganaderos. (Gamboa *et al.*, 2005; Ortiz, 2000 b).

La diversidad de clostridios en el suelo está asociada con la geografía de la zona, el pH, el clima, el tipo de suelo y la presencia de otros microorganismos, pero a la vez tienen la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones medioambientales pues tienen la facultad de esporular (Gamboa *et al.*, 2005).

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Toma de muestras de suelo**

#### **2.2.1.1 Distribución geográfica**

El estudio se realizó en cuatro municipios (Mariquita, Puerto López, Nemocón y Ubaté) en los departamentos de Tolima, Meta y Cundinamarca durante el año 2008.

#### **2.2.1.2 Tamaño de la muestra**

Para calcular el tamaño de la muestra se definió como marco de muestreo las fincas encuestadas en el estudio epidemiológico transversal (165 fincas) (capítulo 3). Dicho estudio consideró una muestra representativa del total de hatos de los municipios de las zonas de influencia. Se estableció como unidad de muestreo la finca.

El tamaño de la muestra se determinó siguiendo la metodología epidemiológica para detectar una enfermedad (Otte, 1991; De Blas *et al.*, 1998). Era necesario conocer si los hatos incluidos en el marco de muestreo estaban infectados o no, por lo cual en la definición de caso se consideró un hato positivo cuando al menos 1 animal de muy buena condición se reportaba muerto repentinamente sin sintomatología aparente. En caso de considerarse positivo se verificaba con los reportes del Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Instituto Colombiano Agropecuario ICA para que fuera incluido. La prevalencia utilizada fue la reportada por Ortiz, 2000, de 27,27 % y fue considerada como el nivel de detección. El nivel de confianza fue 95% (Tabla 2.1). La fórmula utilizada fue:

$$n = [1-(1-NC)^{1/d}] * [N-(d-1) / 2]$$

Donde:

n = tamaño de la muestra requerido

N = Marco de muestreo

d = Número de fincas afectadas

NC = Nivel de confianza (95 %) (Otte, 1991; De Blas *et al.*, 1998)

**Tabla 2 1** Estudio epidemiológico Longitudinal. Cálculo del tamaño de la muestra para detectar enfermedad.

Marco de muestreo (Fincas)	165
Fincas afectadas	45
Prevalencia	27,27
Nivel de confianza	95
Tamaño de la muestra	10
Fracción de muestreo	6,06

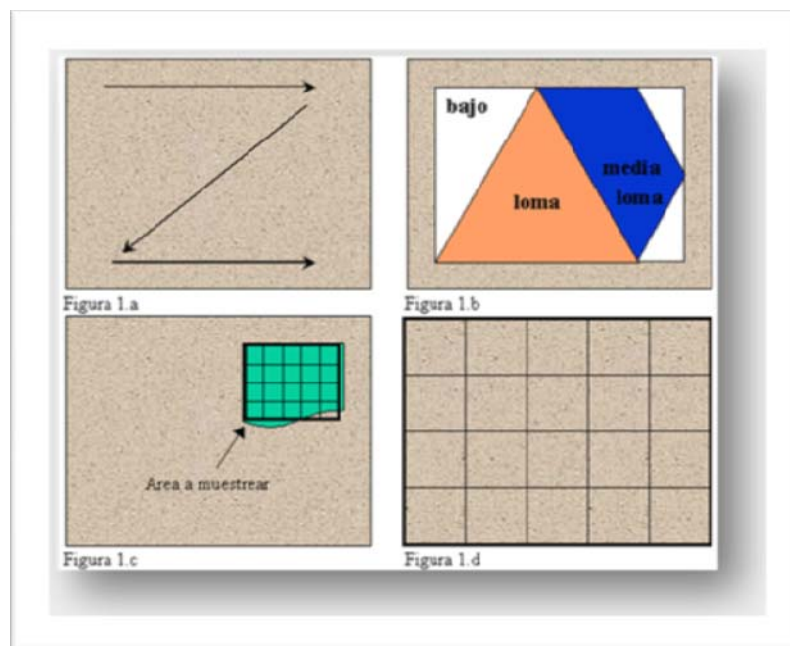
De acuerdo a la fracción de muestreo las muestras se distribuyeron por municipio (tabla 2.2).

Las muestras de suelo fueron el material base para el aislamiento de bacterias anaerobias; se tomaron en los potreros en los cuales murieron animales de acuerdo a la definición de caso siguiendo los parámetros establecidos en el protocolo de muestreo descrito por Ferraris, 2005 (figura 2.1). Se seleccionaron los potreros donde murieron los animales o donde se habían enterrado (en general 20 submuestras por potrero). Con 1 kg de suelo se representó la disponibilidad de bacterias de miles de toneladas de suelo; 1 Kg. de suelo significa el  $5 \times 10^{-7}$  % del peso medio de una hectárea (0-20 cm de profundidad) (Ferraris, 2005).



Tabla 2 2 **Distribución de la muestra en los municipios de Mariquita departamento del Tolima, Nemocón, departamento de Cundinamarca, Puerto López, departamento del Meta y Ubaté, departamento de Cundinamarca, según fracción de muestreo.**

Municipio	Total fincas	Tamaño de la muestra
Mariquita	41	3
Nemocón	41	2
Puerto López	42	3
Ubaté	41	2



**Figura 2 1** Tipos de muestreo de un lote: a) Muestreo al azar b) Muestreo al azar estratificado c) Muestreo en áreas de referencia d) Muestreo en grilla (Ferraris, 2005)

Los potreros se recorrieron de extremo a extremo en forma de zig-zag, recogiendo un total de 20 submuestras, las cuales se homogenizaron y posteriormente se obtuvo una única muestra de cada potrero. Si en la finca se presentaban brotes de mortalidad en diferentes potreros se tomaron muestras para cada uno de ellos. Cada punto donde se tomó una submuestra fue referenciado con ayuda del GPS (Global position System,

Garmin®), el cual suministró información de las coordenadas y la altura sobre el nivel del mar.

Para la toma de cada submuestra se procedió a retirar de la superficie del suelo todo tipo de material vegetal; con una garlancha en ángulo de 45 grados a 3 - 4 cm del borde de la zona se introdujo y se tomó la muestra. Se retiró la pala sacando la porción de tierra que quedaba sobre ella y se mezcló con las otras submuestras en un balde.

Luego de obtener todas las submuestras, se desocupó el balde sobre una superficie seca y cubierta con papel periódico, se homogenizó el material y se formó una circunferencia de la cual se extrajo al azar 1 Kg. de tierra; se empacó en una bolsa plástica estéril obteniendo así una muestra del potrero (Coraspe & Tejera, 1996).

### **2.2.2 Procesamiento de las muestras en el laboratorio**

Para el procesamiento de las muestras de suelo se extrajeron 20 g de las muestras de suelo y se colocaron en cajas de petri las cuales se llevaron a deshidratación en una incubadora a 37° C, por un periodo de 6 semanas; pasado este tiempo se homogenizaron, se maceraron en un mortero, y se procedió a cernirlas en un tamiz de 5mm, de esta muestra se obtuvieron 10 g, los cuales se calentaron en baño de María a 80° C por 10 minutos, posteriormente se le adicionó, etanol al 50% y se incubó a 37° C durante 30 minutos.

Se preparó una suspensión de 1 g de muestra en 5 mL de solución salina estéril, de esta suspensión se tomo una alícuota de 1.5 mL la cual se calentó a 60° C por 10 minutos, luego se inoculó en caldo Tioglicolato Trozos de Carne (TTC) (100µl por tubo) pre-reducidos (10 minutos en ebullición), y se incubó en cámara de anaerobiosis con un sobre de AnaeroGen™ (Laboratorios Oxoid®) - sistema de generación de atmósfera anaeróbica - durante 7 días a 37° C. Al cabo de los siete días, se evaluó el crecimiento bacteriano, teniendo en cuenta características físicas y químicas como turbidez, formación de gases, cambio de color del medio (producción de H<sub>2</sub>S). Finalmente se realizaron extendidos en laminas porta objeto marcadas las cuales se fijaron con calor. Para observar las características microscópicas de los bacilos y de las esporas se colorearon con la coloración de Gram y con la coloración Verde de Malaquita. Las

láminas se observaron en microscopio óptico, en objetivo de inmersión y las características de las bacterias y de sus esporas se describieron de acuerdo a protocolos establecidos (Gamboa, 2005).

Del caldo TTC se tomó una gota y se inoculó con pipeta Pasteur en Agar Sangre (AS) al 3.0%, realizando siembra en forma de estrías por agotamiento; se incubó a 35° C por 24 horas. Al observar la película de crecimiento tipo swarming se realizó una nueva siembra en una caja de AS al 4.0%, tomando una azada en el extremo distal del sembrado que se sembró en la nueva caja de agar, con la técnica de siembra de estrías por agotamiento. Las siembras se repitieron, hasta obtener colonias purificadas. Con la cepa purificada se repicó el cultivo a dos cajas de AS al 4.0%; luego se evaluó la morfología de las colonias (forma, superficie, y borde), la presencia o no de hemólisis y el tipo (alfa, beta).

Con las colonias ubicadas en la parte final de las estrías se realizó un extendido en láminas porta objeto; se procedió a fijar y colorear con coloración de Gram para evaluar las formas bacilares Gram (-), o Gram (+). Se realizó también la coloración de esporas para observar la localización de dichas estructuras dentro del bacilo (terminal, subterminal, central). Las colonias se sembraron en agar yema de huevo con el fin de ver la producción de lecitinasa (+) (alfa-toxina, fosfolipasa C), que produce un halo opaco alrededor de la colonia, por lisis de la lecitina y la lipasa (+) la cual transforma las grasas en glicerol y ácidos grasos, dando una capa iridiscente que cubre la superficie de la colonia.

Posteriormente se sembraron en tubos con urea para determinar si presentaban o no reducción; también se realizó la prueba de catalasa con el fin de evaluar la reacción de las colonias en peróxido de hidrogeno. Las bacterias se sembraron en un tubo con medio SIM (medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y sulfuro de hidrógeno); el fundamento de esta prueba está basado en que el triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidada por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene una enzima llamada triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles se apreciaron en este medio, por la turbidez que se produjo alrededor de la punción de

siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguieron por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantuvo a un pH mayor a 7.2; posteriormente se agregó luego de 24 horas de cultivo el reactivo de Kovacks, para completar la prueba de indol.

Cada una de las bacterias puras fue sembrada en agar líquido Brain Heart Infusión (BHI) e incubada a 35° C por un tiempo de 24 horas, se les agregó 0.5 mL de glicerina como crioprotector y con ayuda de una pipeta Pasteur se traspasaron a 4 tubos crioviales para su congelación y conservación en el banco de germoplasma a -70° C.

Para verificar la supervivencia de las bacterias se realizó una prueba de viabilidad, donde se descongeló un criovial después de 40 días. Esta prueba se realizó repicando una gota de su contenido en AS hasta conseguir nuevas colonias, corroborando la morfología por medio de coloraciones de Gram y de Verde de Malaquita en láminas porta objeto.

Cuando las bacterias cumplían con las características morfológicas macro y microscópicas definidas, se procedió a la caracterización bioquímica de las cepas por medio del sistema API® 20<sup>a</sup> (bioMerieux SA, Marcy l'Etoile, Francia). Una suspensión de cada bacteria se preparó mediante la adición de cultivos puros. La suspensión se inoculó en los microtubos en condiciones anaerobias. Las tiras de prueba se incubaron en condiciones anaerobias en un frasco de cultivo a 37° C durante 24 h.

La galería API 20A incluye 20 microtubos que contienen substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color. La interpretación de estas reacciones se realizó con la ayuda de la tabla de identificación, y el reconocimiento se consiguió mediante un software de identificación (Sistema API® 20A bioMerieux SA, Marcy l'Etoile, Francia).

### **2.2.2.1 Prueba biológica**

Con el fin de determinar la toxicidad de los clostridios aislados, se realizó un modelo de prueba biológica el cual consistió en exponer cultivos celulares HeLa (células de

carcinoma uterino humano) a sobrenadantes de los cultivos filtrados para determinar su toxicidad.

Estas células Hela se cultivaron en medio RPMI® suplementado con 10% de suero fetal bovino y con antibióticos.

### **2.2.2.2 Obtención de las Toxinas**

Las bacterias que se obtuvieron en el aislamiento bacteriológico fueron almacenadas en caldo BHI a  $-70^{\circ}$  C; posteriormente se descongelaron dejándolas a temperatura ambiente. Cada bacteria fue resembrada en 2 tubos con caldo BHI, los cuales se llevaron a cámara de anaerobiosis y se incubaron a una temperatura de  $35^{\circ}$  C por un tiempo de 48 horas. Luego de haber dejado los cultivos en crecimiento por este tiempo, se retiraron de la incubadora y con ayuda de una pipeta se traspasó el material a un tubo falcon de 15 mL, para realizar posteriormente una centrifugación de 5000 rpm por un tiempo de 15 minutos y así obtener el sobrenadante en el cual se encuentran las toxinas. El sobrenadante obtenido de cada cultivo bacteriano se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm por un tiempo de 15 minutos; este procedimiento se realizó con el fin de obtener el sobrenadante sin residuos de bacterias. El sobrenadante obtenido que contenía las toxinas de cada colonia bacteriana que estaba libre de bacterias, fue nuevamente traspasado a 2 eppendorf, para dejar almacenado en neveras a  $-70^{\circ}$  C.

Como control positivo se utilizó una cepa de *Clostridium sordellii* del banco de germoplasma de bacterias anaerobias de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria; como control negativo se dejó el mismo medio celular BHI.

### **2.2.2.3 Tripsinización de las células HeLa**

A cada uno de los cultivos celulares se le agregó 1.5 ml de tripsina bovina y se incubaron posteriormente en incubadora con  $\text{CO}_2$  por un tiempo de 5 minutos. Se retiraron de la incubadora y nuevamente en la cámara de flujo laminar se les agregó medio RPMI, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos.

Posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a una velocidad de 2500 rpm y a una temperatura de 5 °C. Luego se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 20 mL de medio RPMI®. Se tomó una alícuota de 0.5 mL y se realizó el conteo de células utilizando una cámara de Neubauer, el cual dio un total de  $3,2 \times 10^7$  de células, por lo que en cada pozo se agregó 32 µL del medio RPMI donde se resuspendieron las células para un total de  $5 \times 10^4$  células.

Estas células sembradas en placas de cultivo celular (Cell Wells™ 25820 Corning, New York 14831) fueron a incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se retiró el sobrenadante y en cada pozo nuevamente se agregó 100 µL de medio RPMI. Se adicionó a cada pozo 20 µL de sobrenadante de cultivo (Józwiak *et al.*, 2005; Borrmann *et al.*, 1999).

Las placas con los cultivos fueron incubadas a 35 °C por 48 horas. Finalmente se fijaron las células con formaldehído al 4% para preservar el material y permitir su lectura.

#### **2.2.2.4 Coloración de los cultivos celulares**

Los cultivos se colorearon con 2 gotas de cristal violeta (colorante catiónico), el cual tiñe las células durante 25 minutos. Una vez coloreadas las células se evaluó el daño celular causado por cada toxina utilizando el invertoscopio; se calificó porcentualmente dicho daño:

- 0% si no se observaba lesión celular.
- 25% si se observaba un daño leve.
- 50% si el daño observado era moderado.
- 75% si el daño observado era severo y
- 100% si las células se destruían totalmente.

El procedimiento fue repetido para verificar los resultados. Los sobrenadantes que resultaron positivos a la presencia de toxinas clostridiales se calentaron durante diez minutos a 80° C para establecer si las de toxinas presentes en ellos eran termolábiles ó termoestables; Posteriormente se realizaron las pruebas biológicas utilizando ratones

(*Mus musculus*) comparando materiales sometidos al calor y no (Hatheway, 1990). La prueba biológica se realizó inoculando los ratones por vía intraperitoneal con sobrenadante de cultivo, observando posteriormente la aparición de sintomatología neuromuscular (Thomas, 1991). Esta prueba biológica permitió detectar niveles de toxina menores que 5 DL<sub>50</sub>/mL en los sobrenadantes (Smith, 1977). Los ratones se observaron cada dos horas durante 4 días. La muerte en ratones ocurrió generalmente entre 6 - 24 horas. Los síntomas en ratón aparecieron después de las cuatro horas pos inoculación e incluyeron erizamiento del pelo, respiración abdominal dificultosa (fuelle) y parálisis de las extremidades (Hatheway, 1988; Hatheway, 1990).

### **2.2.2.5 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN de las bacterias aisladas se utilizaron las tarjetas de papel de filtro Flinders Technology Associates (tarjetas FTA® producidas y comercializadas por Whatman® Internacional Ltda. Reino Unido). Las tarjetas FTA®, están constituidas de una membrana de celulosa que contiene químicos liofilizados capaces de inactivar un amplio rango de microorganismos preservando sus ácidos nucleicos (Dobbs & Madigan, 2002; Rogers & Burgoyne, 2000; a y b).

La muestra tomada del cultivo se aplicó en la tarjeta FTA y se dejó secar completamente a temperatura ambiente. Para la extracción de ADN se cortó un pedazo del centro de la tarjeta de aproximadamente 2mm<sup>2</sup> con un sacabocados. La muestra de la tarjeta se colocó en un tubo de PCR y se lavó tres veces con 200 µL del reactivo de purificación FTA, incubando durante cinco minutos a temperatura ambiente y agitando las muestras ocasionalmente. Se descartó el reactivo usado después de cada lavado.

Se lavó dos veces con 200 µL de agua ultra pura y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente con agitación manual. Se descartó el agua usada después de cada lavado. Después del proceso de extracción se dejó secar la muestra en el tubo de PCR a 56° C durante 10 minutos.

### 2.2.2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La detección de los clostridios se realizó mediante la amplificación de un segmento de 1500 pares de bases localizado en el gen 16S rARN empleando para ello la secuencia de los cebadores reportada por Vaneechoutte *et al.*, 1996: 5' -TGG CTC AGA TTG AAC GCT GGC GGC (directo) que corresponde a una cadena de ADN con una extensión de 24 nucleótidos y 5' TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCA CA (reverso) que corresponde a una cadena de ADN con una extensión de 23 nucleótidos.

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se realizó utilizando las siguientes condiciones:

Se realizó una mezcla para la reacción de PCR, con los siguientes componentes, teniendo un volumen total de reacción de 20  $\mu$ L.

Mezcla de dNTP's (250 $\mu$ M de cada uno) mas Buffer de PCR 10X (500mM de KCl, 100 mM de Tris-Cl (pH 8.0))	4 .0 $\mu$ L
MgCL <sub>2</sub> (25 mM)	2.0 $\mu$ L
Cebador directo 10 mM	2.0 $\mu$ L
Cebador Reverso 10 mM	2 .0 $\mu$ L
Taq polimerasa 5 u/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L
Agua ultra pura para 175 $\mu$ L .	9.8 $\mu$ L

Se colocó con la pipeta 20  $\mu$ l de la mezcla de reacción en cada tubo, y se adicionó la muestra de la tarjeta FTA® (ADN genómico) específico a cada tubo. Se colocaron los tubos en el termociclador (MJ Research®). El perfil utilizado para optimización de la reacción de PCR fue:

Un primer ciclo 94° C por 3 minutos; seguido por 35 ciclos de: 94° C por 60 segundos, para desnaturalizar el ADN; 50° C por 60 segundos para anillamiento del cebador y 72° C por 60 segundos para extensión de la cadena de ADN.



Luego un ciclo final de 72° C por 5 minutos, temperatura de extensión final.

Los productos fueron visualizados sobre un gel de agarosa (1%), utilizando 5 ul del producto de la PCR y un marcador de peso molecular (Hyperladder II, Biorline®). La electroforesis se realizó a 100 voltios por 40 minutos. Posteriormente se coloreó el gel con bromuro de etidio.

### **2.2.3 Secuenciación y análisis de los nucleótidos del segmento amplificado**

Los segmentos de ADN del tamaño esperado (1500 pares de bases) fueron escindidos del gel y los productos purificados empleando el paquete comercial QIAquick PCR Purification Kit® (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos purificados fueron secuenciados empleando el paquete comercial de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 y el secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), de acuerdo a protocolos establecidos en el Centro de Biotecnología y Bioindustria de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera, departamento de Cundinamarca.

La bacteria identificada con el código DOO5559 no se incluyó debido a que a la secuencia de esta bacteria presentó muy baja similitud con las bacterias patrones de Gen Bank (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en toda la longitud de la secuencia, lo cual pudo deberse a una baja calidad del ADN inicial, que hace que la secuencia presente falsas variaciones, por formación de quimera o por el montaje incorrecto de la secuencia por contaminación en la reacción de PCR. Situación similar se encontró en la secuencia de la bacteria identificada con el código DOO5565, por lo que tampoco se consideró.

En la página web del Gen Bank (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se utilizó el módulo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con el objeto de realizar la búsqueda de las secuencias que presentan

mayor similitud con las bacterias aisladas en este trabajo con el fin de determinar a qué tipo de bacteria correspondían exactamente.

Una vez establecidas las identidades se determinaron por alineamiento de las secuencias; se identificaron los sitios de variación utilizando el módulo ALIGNMENT del programa Jelly Fish (Biowire.org) y a partir de esta información se estimaron las distancias genéticas entre las bacterias estudiadas. Las secuencias de nucleótidos de los *Clostridium spp* aislados, las de *Clostridium spp* de laboratorio comercial y las de *Clostridium spp* referenciadas en el Gen Bank de NCBI permitieron realizar el análisis para calcular los valores de distancia genética, utilizando el software Mega versión 4 (Tamura, Dudley, Nei, & Kumar, 2007). Para ello se utilizaron dos metodologías de distancia genética, la metodología de Kimura 2 - Parámetro de distancia, (1980), la cual corrige para múltiples cambios de la secuencia de nucleótidos, teniendo en cuenta las tasas de sustitución transicional y transversional y asumiendo que la frecuencia de los cuatro nucleótidos es la misma y que las tasas de sustitución no varían entre sitios (Tamura, Dudley, Nei & Kumar, 2007). Se utilizó la técnica de remuestreo de Bootstrapping, con un mínimo de 10.000 réplicas para posteriormente poder generar un dendograma consenso utilizando la metodología de Neiborg joining (Tamura, Dudley, Nei & Kumar, 2007).

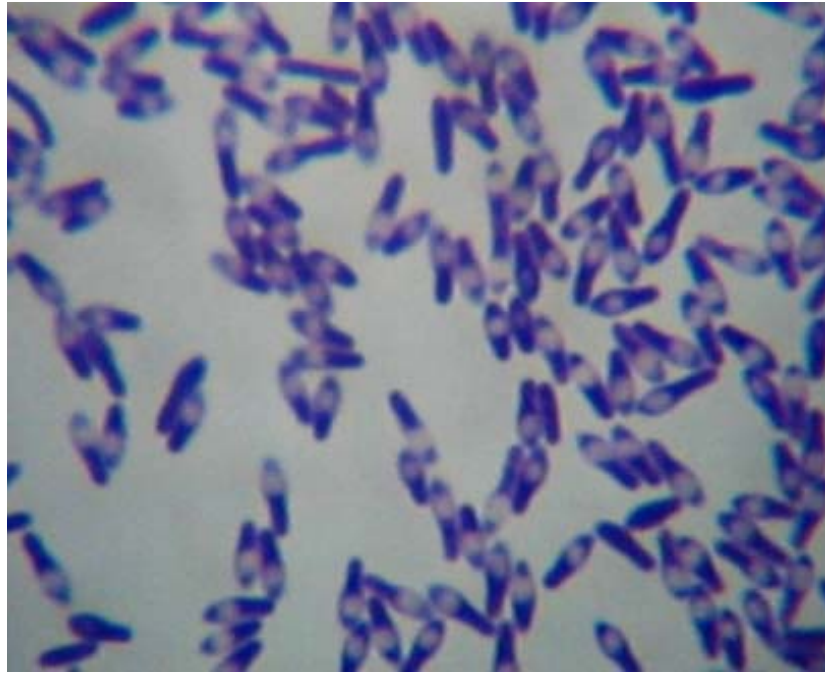
El otro método de distancia utilizado fue Tamura 3 - Parámetro, el cual corrige para múltiples cambios, teniendo en cuenta las diferencias en las tasas de sustitución transicional y transversional y tiene en cuenta el sesgo que puede haber en las diferencias del contenido de G+C (Tamura, Dudley, Nei & Kumar, 2007). Un mínimo de 10000 réplicas (árboles bootstrap) fueron generadas. Ambas metodologías se reportan en varios trabajos de caracterización molecular de Clostridios (Sasaki *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2001).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1. Muestras de Suelo

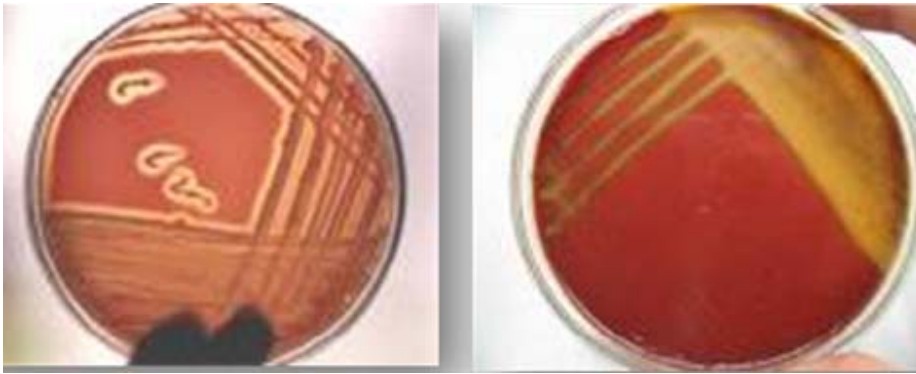
Se procesaron las muestras de suelo de las diez fincas seleccionadas (3 en el municipio de Mariquita, 2 en el municipio de Nemocón, 3 en el municipio de Puerto López y 2 en el municipio de Ubaté). De acuerdo a la metodología descrita las bacterias fueron

coloreadas con coloración de Gram, la cual permitió identificar si se trataba de bacilos gran positivos esporulados y ubicar la posición de la espora dentro del bacilo como se observa en la gráfica 2.2. Los resultados de los aislamientos se indican en la tabla 2.3 en la cual se listan 24 bacterias del género *Clostridium spp.* aisladas.



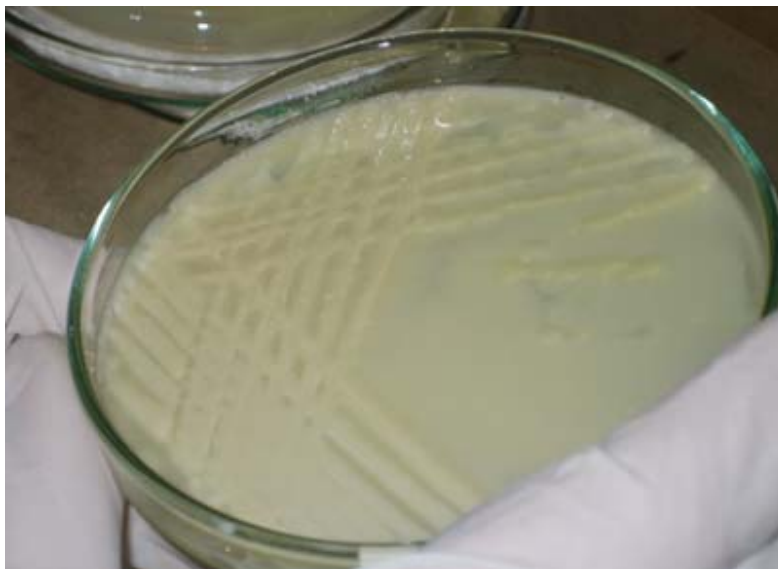
**Figura 2 2** Fijación en lámina porta objeto de colonias de *Clostridium spp.*, coloreadas con coloración de Gram. Se indica la típica forma bacilar de los Clostridios y la presencia de esporas subterminales.

Caracterizada la bacteria se sembraba en agar sangre para determinar si era o no hemolítica y para establecer el tipo de hemólisis. La gráfica 2.3 muestra dos colonias bacterianas hemolíticas, la de la izquierda hemólisis alfa y la de la derecha hemólisis beta.



**Figura 2 3** Colonias de *Clostridium* en cajas de petri con agar sangre. Izquierda: colonia con presencia de hemólisis Alfa. Derecha: colonia con presencia de hemólisis Beta.

Las colonias se sembraron en agar yema de huevo para evaluar la producción de lecitinasa (+) (alfa-toxina, fosfolipasa C), que produce un halo opaco alrededor de la colonia, por lisis de la lecitina y de lipasa (+) la cual transforma las grasas en glicerol y ácidos grasos, dando una capa iridiscente que cubre la superficie de la colonia (Figura 2.4).



**Figura 2 4** Caja de petri con Agar Yema de Huevo. *Clostridium* positivo a reacciones Lipasa y Lecitinasa.

**Tabla 2 3** Aislamiento de *Clostridium spp.*, relación de aislamientos a partir de muestras de suelos en diez fincas de los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón (Cundinamarca), Puerto López (Meta) y Ubaté (Cundinamarca).

Municipio	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Clostridium glycolicum</i>	<i>Clostridium hastiforme</i>	<i>Clostridium limosum</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Clostridium tertium</i>	TOTAL
<b>Mariquita</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>7</b>
% Fila	14,3	14,3	0,0	14,3	14,3	0,0	14,3	28,6	0,0	100,0
% Columna	50,0	50,0	0,0	33,3	33,3	0,0	100,0	20,0	0,0	29,2
<b>Nemocón</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
% Fila	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	100,0
% Columna	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	8,3
<b>Puerto López</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>9</b>
% Fila	0,0	0,0	0,0	22,2	11,1	0,0	0,0	55,6	11,1	100,0
% Columna	0,0	0,0	0,0	66,7	33,3	0,0	0,0	50,0	100,0	37,5
<b>Ubaté</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>6</b>
% Fila	16,7	16,7	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0	50,0	0,0	100,0
% Columna	50,0	50,0	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	30,0	0,0	25,0
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>24</b>
% Fila	8,3	8,3	4,2	12,5	12,5	4,2	4,2	41,7	4,2	100,0
% Columna	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Puerto López (Meta) fue el municipio donde más aislamientos se realizaron (9 aislamientos correspondientes al 37,5% del total). La especie más aislada en este grupo fue *Clostridium sordellii* (5 aislamientos, tabla 2.3). Esta bacteria se caracterizó bioquímicamente por ser un bacilo β hemolítico, lecitinasa +, lipasa -, ureasa +, catalasa -, digirió la gelatina, coaguló la leche, fermentó la glucosa, maltosa, glicerol, produjo H<sub>2</sub>S, Indol; presentó motilidad, esporas ovales, subterminales. Las colonias se caracterizaron por tener color blanco opaco y un tamaño de 3 a 8 mm de diámetro, con superficie y bordes irregulares.

Se obtuvieron dos aislamientos de *Clostridium glycolicum* (22,2%, tabla 2.3), los cuales se caracterizaron por ser bacilos β hemolíticos, lecitinasa -, lipasa -, ureasa -, no digirieron la gelatina, ni coagularon la leche. Fermentaron la glucosa, la maltosa, el glicerol y la xylosa; produjeron H<sub>2</sub>S y presentaron motilidad, esporas ovales, subterminales. Las colonias fueron de color gris, de 3 a 8 mm de diámetro con superficie y bordes irregulares.

También se obtuvo en este municipio un aislamiento de *Clostridium hastiforme* (11,1%), el cual se caracterizó por su forma bacilar, β hemolítico, anaeróbico, lecitinasa +, lipasa -,

ureasa -, catalasa-, digirió la gelatina, acidificó la leche, fermentó la glucosa, maltosa, glicerol, produjo Indol. Presentó motilidad y produjo esporas ovales, subterminales. Las colonias fueron de color blanco con un tamaño de 3 a 8 mm de diámetro y con superficie y bordes irregulares.

Finalmente se obtuvo un aislamiento de *Clostridium tertium* (11,1%, tabla 2.3) el cual se caracterizó por ser un bacilo  $\beta$  hemolítico, lecitinasa -, lipasa -, ureasa -, catalasa -, acidificó, coaguló y digirió la leche; fermentó la glucosa, el manitol, la lactosa, la maltosa, la sucrosa, la salicina; produjo H<sub>2</sub>S, y resultó nitrato +; se observó motilidad, presentando esporas ovales y terminales. Las colonias se observaron de color blanco y su tamaño osciló entre 3 a 8 mm de diámetro con superficie y bordes irregulares.

En el año 2008 en el municipio de Puerto López la precipitación fue de 2521,95 mm con un promedio de temperatura anual de 26,6 ° C, siendo el municipio donde mayor precipitación se presentó y donde los valores de temperatura fueron los mayores.

En segundo lugar, en el municipio de Mariquita (departamento del Tolima) se aislaron 7 bacterias (29,2%). Dos aislamientos correspondieron a *Clostridium sordellii* (28,6%, tabla 2.3). También se obtuvo un aislamiento de *Clostridium botulinum* (14,3%, tabla 2.3), bacilo anaeróbico  $\beta$  hemolítico, lecitinasa -, lipasa +, ureasa -, catalasa -, digirió la gelatina, coaguló la leche, fermentó la glucosa, sucrosa, maltosa, salicina, glicerol; presentó motilidad, esporas ovales, subterminales. Las colonias se observaron de color blanco grisáceo con un tamaño de 3 a 8 mm de diámetro con superficie y bordes irregulares.

Otra aislamiento encontrado en este municipio fue *Clostridium butyricum* (14,3%, tabla 2.3) caracterizado por ser un bacilo  $\beta$  hemolítico, lecitinasa -, lipasa -, ureasa +, catalasa -, digirió la gelatina, la leche, la carne y fermentó la glucosa, la lactosa, la sucrosa, la salicina y el glicerol. Produjo H<sub>2</sub>S y presentó motilidad. Sus esporas fueron ovales, subterminales. Las colonias presentaron color blanco opaco, con un tamaño de 3 a 8 mm de diámetro y con superficie y bordes irregulares.

Se obtuvo un aislamiento de *Clostridium septicum* (14,3%, tabla 2.3) el cual se caracterizó por ser un bacilo  $\beta$  hemolítico, lecitinasa -, lipasa -, ureasa -, catalasa -, digirió

la gelatina, coaguló y digirió la leche, fermentó la glucosa, la lactosa, la maltosa, la salicina, el glicerol y produjo H<sub>2</sub>S e Indol; presentó motilidad y se observaron esporas ovals, subterminales. Las colonias se observaron de color blanco y con un tamaño entre 3 a 8 mm de diámetro con superficie y bordes irregulares.

En este municipio también se obtuvo un aislamiento de *Clostridium glycolicum* (14,3%, tabla 2.3) y otro de *Clostridium hastiforme* (14,3%, tabla 2.3).

En el municipio de Mariquita se presentó una precipitación promedio para el año 2008 de 2481,31 mm, y un promedio de temperatura anual de 24,6 °C.

En tercer lugar, en el municipio de Ubaté (departamento de Cundinamarca) se obtuvieron seis aislamientos (25%). Tres aislamientos correspondieron a *Clostridium sordellii* (50%, tabla 2.3), otro a *Clostridium botulinum* (16,7%, tabla 2.3); otro aislamiento obtenido correspondió a *Clostridium butyricum* (16,7%, tabla 2.3) y en último aislamiento correspondió a *Clostridium hastiforme* (16,7%, tabla 2.3).

El promedio de precipitación para este año fue de 1041,37 mm y el promedio de temperatura anual fue de 17,69 °C.

En cuarto lugar, el municipio de Nemocón (departamento de Cundinamarca) se obtuvo dos aislamientos (8,3%). El primer aislamiento fue *Clostridium chauvoei* (50,0%, tabla 2.3) causante de Pierna Negra y se caracterizó por ser un bacilo β hemolítico, lecitinasa -, lipasa -, ureasa -, catalasa -, digirió la gelatina, la leche, la carne. Fermentó la glucosa, lactosa, sucrosa, maltosa, salicina. Presentó motilidad, esporas ovals, subterminales. Las colonias se observaron de color blanco y con un tamaño de 3 a 8 mm de diámetro, superficie y bordes irregulares.

El segundo aislamiento fue *Clostridium limosum* (50,0%, tabla 2.3), bacilo caracterizado por ser β hemolítico, lecitinasa +, lipasa -, ureasa -, catalasa -, coaguló y digirió la leche, produjo H<sub>2</sub>S, presentó motilidad y esporas ovals, subterminales. Las colonias fueron de color gris opaco y con tamaño de 3 a 8 mm de diámetro. Su superficie y bordes fueron irregulares.

De los cuatro municipios, en el año 2008 el municipio de Nemocón presentó el promedio anual de precipitación más bajo, 1183,57 mm lo mismo que el promedio anual de temperatura más bajo, 13,43 °C.

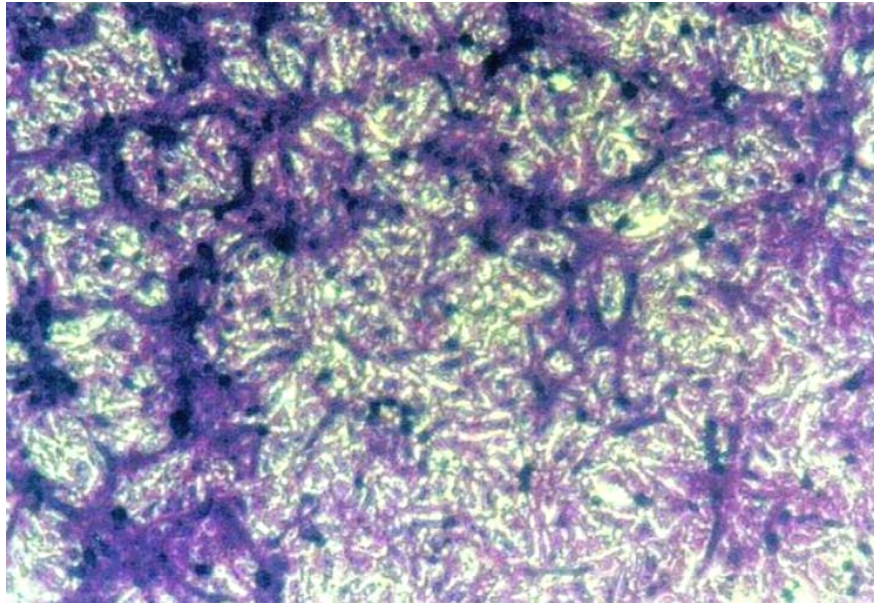
El número de cultivos realizados para obtener los aislamientos y los medios utilizados se describen en la tabla 2.4 en la que se indica también el resultado de la prueba biológica de toxicidad en cultivo celular.

**Tabla 2 4** Aislamiento de 24 cepas de *Clostridium spp.* Número de cultivos y medios utilizados. Prueba biológica en cultivo celular (HeLa). Diez fincas de los municipios de Mariquita, Nemocón, Puerto López y Ubaté.

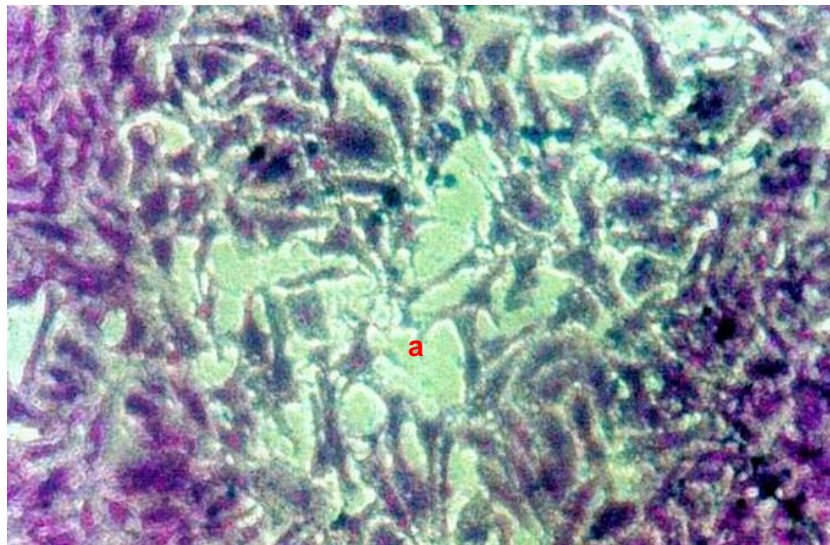
No.	Municipio	Código	No. TIOGLICOLATO TROZOS	No. AGAR SANGRE	No. AGAR YEMA HUEVO	No. CALDO BHI	RESULTADO	CLAVE	EFEECTO CITOPATICO (%)
1	Mariquita	MF1	3	16	10	2	<i>Clostridium hastiforme</i>	DOO 5559	100
2	Mariquita	MF2	3	41	21	2	<i>Clostridium botulinum</i>	DOO 5560	100
3	Mariquita	MF2	3	19	11	2	<i>Clostridium butyricum</i>	NT	75
4	Mariquita	MF3	3	32	14	2	<i>Clostridium glicolicum</i>	DOO 5564	100
5	Mariquita	MF3	3	19	9	2	<i>Clostridium septicum</i>	NT	50
6	Mariquita	MF1	3	21	12	2	<i>Clostridium sordellii</i>	NT	75
7	Mariquita	MF1	3	27	18	2	<i>Clostridium sordellii</i>	DOO 5558	100
8	Nemocón	NF1	3	10	5	2	<i>Clostridium limosum</i>	DOO 5563	100
9	Nemocón	NF2	3	8	7	2	<i>Clostridium chauvoei</i>	DOO5555	100
10	Puerto López	PLF3	1	5	3	2	<i>Clostridium hastiforme</i>	NT	50
11	Puerto López	PLF1	1	3	3	2	<i>Clostridium glicolicum</i>	NT	50
12	Puerto López	PLF2	1	6	9	3	<i>Clostridium glicolicum</i>	NT	50
13	Puerto López	PLF3	1	7	9	2	<i>Clostridium sordellii</i>	NT	75
14	Puerto López	PLF1	1	15	9	13	<i>Clostridium sordellii</i>	NT	75
15	Puerto López	PLF1	3	7	6	4	<i>Clostridium sordellii</i>	DOO 557	100
16	Puerto López	PLF2	1	6	6	2	<i>Clostridium sordellii</i>	NT	50
17	Puerto López	PLF3	1	5	3	1	<i>Clostridium sordellii</i>	NT	50
18	Puerto López	PLF2	1	8	6	3	<i>Clostridium tertium</i>	DOO 5562	100
19	Ubaté	UF3	1	9	5	2	<i>Clostridium hastiforme</i>	NT	25
20	Ubaté	UF1	3	5	6	1	<i>Clostridium botulinum</i>	DOO 5561	100
21	Ubaté	UF1	3	5	6	1	<i>Clostridium butyricum</i>	NT	25
22	Ubaté	UF2	3	10	7	2	<i>Clostridium sordellii</i>	DOO 5556	100
23	Ubaté	UF2	3	5	6	1	<i>Clostridium sordellii</i>	NT	75
24	Ubaté	UF3	3	5	6	1	<i>Clostridium sordellii</i>	NT	75

Los sobrenadantes de cultivo de las cepas aisladas fueron sometidos a pruebas de toxicidad en cultivo celular; el daño ocasionado en las células por el sobrenadante fue calificado porcentualmente (figuras 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 y 2.9, tabla 2.4). De las 24 bacterias aisladas se seleccionaron diez, las cuales fueron calificadas con 100% de lesión celular en cultivo celular (figura 2.9, tabla 2.4): Posteriormente, el sobrenadante de cultivo fue calentado por 10 minutos a 80° C para determinar si este era termolábil o termoestable. Con este resultado se desarrolló la prueba biológica en ratón comparando los materiales sometidos al calor y los que no se sometieron al calor (Hatheway, 1990; Thomas, 1991).

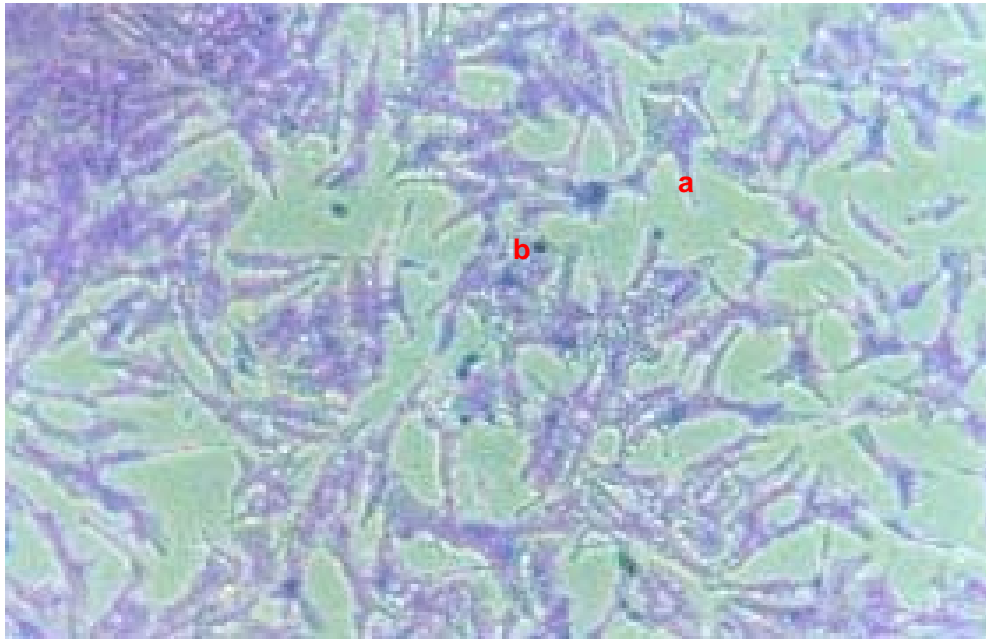




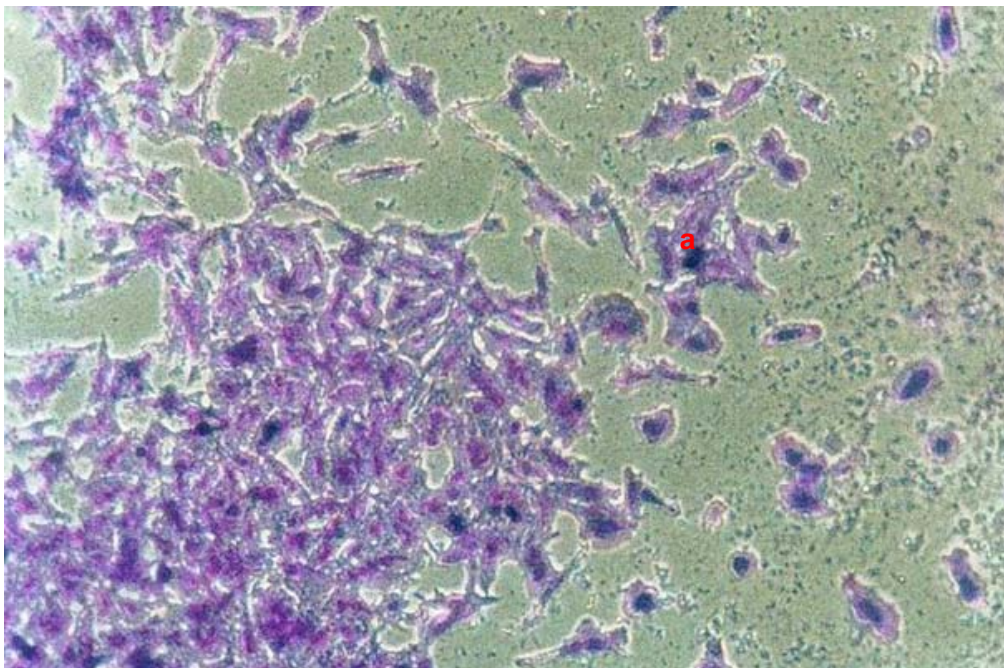
**Figura 2 5** Cultivo de células HeLa. Categoría del 0% de daño celular: No se observa daños en las células HeLa.



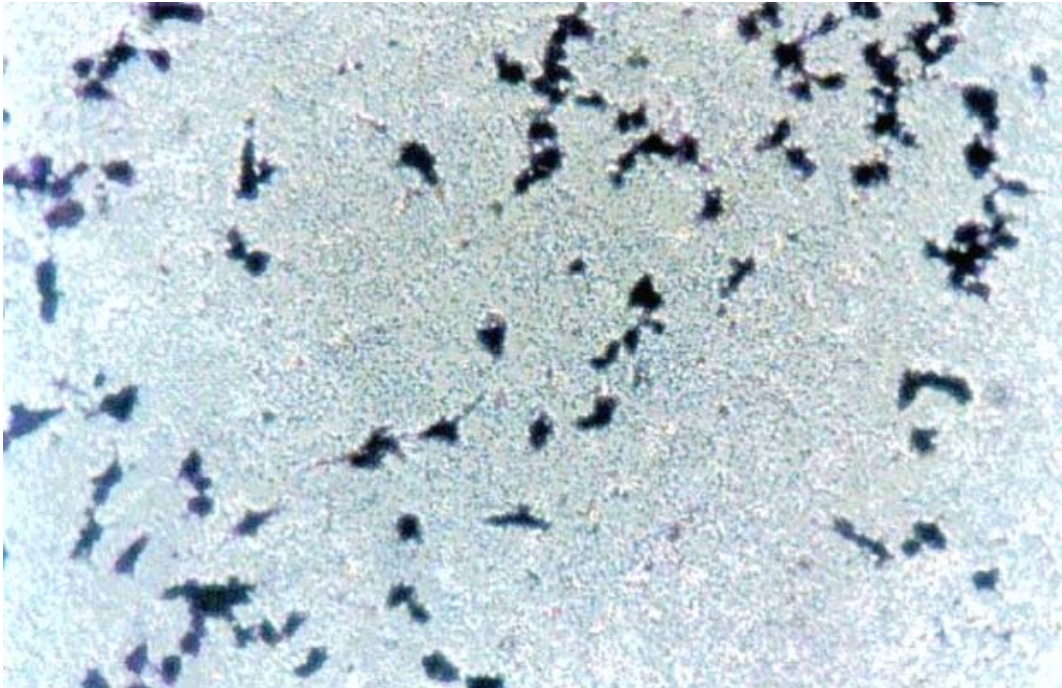
**Figura 2 6** Cultivo de células HeLa. Categoría del 25% de daño celular: Se observa leve vacuolización (a) y pérdida de contornos celulares.



**Figura 2 7** Cultivo de células HeLa. Categoría del 50% de daño celular: Se observa aumento en la vacuolización intracitoplasmática (a) y cambio en la morfología de las células (b).



**Figura 2 8** Cultivo de células HeLa. Categoría del 75% de daño celular: Se observa leve vacuolización (a) y pérdida de contornos celulares.



**Figura 2 9** Cultivo de células HeLa. Categoría del 100% de daño celular: Lisis celular, se destruye en su totalidad el cultivo de células.

Las bacterias con sobrenadantes toxigénicos seleccionadas fueron sometidas posteriormente a la extracción de DNA y al proceso de secuenciación del ribosoma 16S rARN (Collins *et al.*, 1994). Los resultados de las secuencias obtenidas se presentan a continuación:

### **2.3.1.1 DOO-5555**

```
CGAACTTTGGGTATTGCCAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG  
GGAACGTATTCACCGCGACATGCTGATTCGCGATTACTAGCAACTCCAGCTTCATGT  
AGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGACAAGTTTTATAGTTTGTAGCTCCACCT  
CGCGGTATTGCATCTCGTTGTAAGTGGCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGACATA  
AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCCGGTTAACCCGGGCAGTC  
TCGCTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCG  
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCAT  
CCTGTCCCCGAAGGACTTCTCGATTAAGAGTAATGCAGGAGATGTCAAGTCTAGG  
TAAGTTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCC  
CCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTAAT
```

GTGTTAACGGCGGCACGGAAGGAGTTGATACCTCCCACACCTAGTATCCATCGTTTA  
CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGAGCCTCAG  
CGTCAGTTACAGTCCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTAATCTCTACG  
CATTTACCCGCTACACTAGGAATTCCACTCTCCTCTCCTGCACTCTAGACTTCCAGTT  
TGAAATGCAGCCCCCAGGTTGAGCCCGGGTATTTACATCTCACTTAAAAGTCCGCC  
TACGCTCCCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGC  
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCTCCTCAGGTACCGTCATTATCGTCC  
CTGAAGACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTGCAT  
CAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG  
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTACGCATCGTCG  
CCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTTGTAG  
CGGATTACTCCTTTAATTGCTGCTCCATGCGAAGCTGCAATGTTATGCGGTATTAATC  
TCCCTTTCGGGAGGCTATTCCCCTCTACAAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCC  
GTCCGCCGCT

### **2.3.1.2 DOO-5556**

CCGGCTTCGGGCGCCCCAACTTCCATGGTGTGACGGGCGAGTGTGTACAAGACC  
CGGGAACGCATTACCCGAGCATTCTGATCTGCGATTACTAGTAACTCCAGCTTCAT  
GTAGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGGGATTAGCTCCA  
CCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCACCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAAG  
CATAAGGGGCATGATGATTAGACGTCATCCCCACCTTCTCCGAGTTATCCTCGGCA  
GTCCCTCTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAAGGCAAGGGTTGCGCTCGTT  
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG  
TCACCACTGTCCCCGAAGGGAAATCTCCGATTAGGGAGAGGTCAGTGGGATGTCAA  
GCTTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTACTTGTG  
CGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCACTCTTGCGAGCGTACTTCCCAGGCGGAG  
TACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGAGGGGGTAACCCCCGACACCTAGTACTCA  
TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGT  
GCCTCAGTGTGAGTTACAGTCCAGAGAGCCGCCTTCGCTACTGGTATTCTCCTAAT  
ATCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCTACTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTTC  
TCTAGTTTCAAAGCTTACTACGGTTGAGCCGTAGCCTTTCCTTCTGACTTAAAAA  
CCACCTACGCACCCTTACGCCAGTAAATCCGGATAACGCTAGCCCCCTACGTATT  
ACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCCTCAAGTACCGTCATTAT

CTTCCTTGAGGACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCATCGCTCACGCGGCGTTG  
CTGCATCAGGCTTTGCCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT  
CTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGGCTACTGAT  
CGTTGCCTTGGTAAGCCATTACCTTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGTCCATCCT  
GTACCGCCGGAGCTTTGATACAAAAGCCATGCGACTTTTCATATGTTATCCCGTATTA  
GTATACCTTTCCGGTATGTTATCCGTGTGTACAGGGCAGGTTACCCACGCGTACTCA  
CCCGTCCGCGCT

### 2.3.1.3 DOO-5557

CCGGCTTCGGGCGCCCCAACTTCCATGGTGTGACGGGCGAGTGTGTACAAGACC  
CGGGAACGCATTACCCGCAGCATTCTGATCTGCGACTACTAGTAACTCCAGCTTCAT  
GTAGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGTGGCTTTAAGGGATTAGCTCCA  
CCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCACCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAAG  
CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTATCCTCGGCA  
GTCCCTCTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAAGGCAAGGGTTGCGCTCGTT  
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG  
TCACCACTGTCCCCGAAGGGAAATCTCCGATTAGGGAGAGGTCAGTGGGATGTCAA  
GCTTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTACTTGTG  
CGGGTCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCACTCTTGCGAGCGTACTTCCAGGCGGAG  
TACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGAGGGGGTAACCCCCGACACCTAGTACTCA  
TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGT  
GCCTCAGTGTGAGTTACAGTCCAGAGAGCCGCCTTCGCTACTGGTATTCTCCTAAT  
ATCTACGCATTTACCCGCTACACTAGGAATTCTACTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTTC  
TCTAGTTTCAAAGCTTACTACGGTTGAGCCGTAGCCTTTCACTTCTGACTTAAAAAA  
CCACCTACGCACCCTTTACGCCAGTAATTCCGGATAACGCTAGCCCCCTACGTATT  
ACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCCTCAAGTACCGTCATTAT  
CTTCCTTGAGGACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCATCGCTCACGCGGCGTTG  
CTGCATCAGGCTTTGCCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT  
CTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGGCTACTGAT  
CGTTGCCTTGGTAAGCCATTACCTTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGTCCATCCT  
GTACCGCCGGAGCTTTGATACAAAAGCCATGCGACTTTTCATATGTTATCCCGTATTA  
GTATACCTTTCCGGTATGTTATCCGTGTGTACAGGGCAGGTTACCCACGCGTACTCA  
CCCGTCCGCGCT

### 2.3.1.4 DOO-5558

CGGACTTCGGGTGTTACCAGCTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG  
GGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCAACTCCAGCTTCATGT  
AGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGGATAGGTTTTATCTCTTTTGCTCCACC  
TCACGGTCTTGCGTCTTATTGTACCTACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGACAT  
AAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCTGGTTACCCAGGCAGTCT  
CATTAGAGTGCTCAACTTAATGGTAGCAACTAATAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCAG  
GACTTAACCTAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCC  
TTGCCCCGAAGGGCTTCACCTATCTCTAGGCTATGCAAGGGATGTCAAGTCCAGGTA  
AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCC  
GTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTATTGT  
GTTAACTGCGGCACAGGGGGAGTTGATACCCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACG  
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGTGCCTCAGCG  
TCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTAATCTCTACGCA  
TTTCACCGCTACACTAGGAATTCCGCTTTCCTCCTGCACTCTAGATATCCAGTTTG  
GAATGCAGCCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACATCCCACCTAACATCCGCCTA  
CGCACCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGCG  
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCTCCTCTGGTACCGTCATTATCGTCCCA  
GAAAACAGGGCTTTACAATCCGAAGACCTTCATACCCACGCGGCGTTGCTGCGTC  
AGGTTTTCCCCATTGCGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC  
CGTGTCTCAGTTCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGTTGC  
CTTGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATACGCCGCCGGTCCATCTCAAAGCA  
ATAAATCTTTGATAACAAAATCATGCGATTCTCCCATATTATGCGGTATTAATCTTCCT  
TTCGGAAGGCTATCCCCACTTTGAGGCAGGTTACCCACAGGTCACTCACCCGTCC  
CCCCCT

### 2.3.1.5 DOO 5559

CTGGCTTCGGGTATTGCCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCG  
GGAACGCATTCACCGCGACATTCTGATCCGCGATTACTAGCAACTCCGACTTCATGC  
AGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGGGATCGGCTTTAAGAGATTAGCATCTTA  
TCGCTAAGTAGCTGCTCGTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACAT  
AAAGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGATTTGTCATCGGCAGTC

CCTCTAGAGTGCTCAGCTTATCTGTTAGCAACTAAAGGCAAGGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTG  
TCCCCTGTACCCGAAGGTAAAGTCCTATCTCTAGGACGGTCAGGGGCATGTCAAGC  
CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCG  
GGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATACTTGCCTACTCCCCAGGCGGAGTG  
CTTAATGCGTAACTGCGGCACCGAGGTTTGACCCCAACACCTAGCACTCATCGTT  
TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTC  
AGCGTCAGTATAAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTATTCCTCCTAATATCTA  
CGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCACCTTTCCTCTCCTTAACTCAAGCCTTTCAG  
TTTCAAATGCTTACCACGGTTGAGCCGTGATCTTTCACATCTGACTTAAAAGGCCGC  
CTACGCACCCTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCG  
CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCCTAAGGTACCGTCATTATCGTC  
CCTTAGGACAGAACTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCGTTCACGCGGCGTGCCTGC  
ATCAGAGTTTCCTCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG  
ACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGTTACCCTCTCAGGCCGGCTACCCATCGCT  
GTCTTGGTAGCCTTTACCTCACCAACTAATAATGGGACGCGAGACCATCTTTTACC  
GCTTACGCTTTGACTTAAATCTCATGCGACATTTAAGTGTGATAAGGTATTAATCCC  
AGTTTCCCGAGGCTATCCCTTTGTAAAAGGCAGGTTTCTCACGCGTTACTCACCCGT  
CCGCCGCT

### 2.3.1.6 DOO-5560

CGGACTTCGGGTGTTACCAGCTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG  
GGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTGCGGATTACTAGCAACTCCAGCTTCATGT  
AGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGATAGGTTTTATAAGTTTTGCTCCACC  
TCACGGTCTTGCGTCTTATTGTACCTACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGACAT  
AAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCTGGTTACCCAGGCAGTCT  
CATTAGAGTGCTCAACTTAATGGTAGCAACTAATAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCAG  
GACTTAACCTAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCC  
TTGCCCCGAAGGGCTTCACCTATCTCTAGGCTATGCAAGGGATGTCAAGTCCAGGTA  
AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCC  
GTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTATTGT  
GTAACTGCGGCACAGGGGGAGTTGATACCCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACG  
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGTGCCTCAGCG

TCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATCTCTACGCA  
TTTCACCGCTACACTAGGAATTCGGCTTTCCTCTCCTGCACTCTAGATATCCAGTTTG  
GAATGCAGCCCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACATCCCACCTTAAACATCCGCCTA  
CGCACCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGCG  
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCTCCTCTAGTACCGTCATTATCGTCCTA  
GAAAACAGGGCTTTACAATCCGAAGACCTTCATCACCCACGCGGCGTTGCTGCGTC  
AGGTTTTCCCCATTGCGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC  
CGTGTCTCAGTTCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGC  
CTTGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTCAAAGCA  
ATAAATCTTTGATAAGAAAATCATGCGATTCTCTCATATTATGCGGTATTAATCTTCCT  
TTCGGAAGGCTATCCCCACTTTGAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCG  
CCGCT

### **2.3.1.7 DOO-5561**

CCGGCTTCGGGCGCCCCCAACTTCCATGGTGTGACGGGCTAGTGTGTACAAGACCC  
GGGAACGCATTACCCGCAGCATTCTGATCTGCGATTACTAGTAACTCCAGCTTCATG  
TAGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGTGGCTTTAAGGGATTAGCTCCAC  
CTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCACCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAAGC  
ATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTATCCTCGGCAG  
TCCCTCTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAAGGCAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT  
CACCACTGTCCCCGAAGGGAAATCTCCGATTAGGGAGAGGTCAGTGGGATGTCAAG  
CTTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTACTTGTGC  
GGGTCCCCGTC AATTCTTTGAGTTTCACTCTTTCGAGCGTACTTCCCAGGCGGAGT  
ACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGAGGGGGTAACCCCCGACACCTAGTACTCAT  
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGTG  
CCTCAGTGTGAGTTACAGTCCAGAGAGCCGCCTTCGCTACTGGTATTCTCCTAATA  
TCTACGCATTTACCCGCTACACTAGGAATTCTACTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTTCT  
CTAGTTTCAAAGCTTACTACGGTTGAGCCGTAGCCTTTCACTTCTGACTTAAAAAC  
CACCTACGCACCCTTTACGCCAGTAAATCCGGATAACGCTAGCCCCCTACGTATTA  
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCCTCAAGTACCGTCATTATC  
TTCTTGAGGACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCATCGCTCACGCGGCGTTGC  
TGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC



TGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACTGATC  
GTTGCCCTTGGTAAGCCATTACCTTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGTCCATCCTG  
TACCGCCGGAGCTTTGATACAAAAGCCATGCGACTTTCATATGTTATCCCGTATTAGT  
ATACCTTTCGGTATGTTATCCGTGTGTACAGGGCAGGTTACCCACGCGTACTCACC  
CGTCCGCCGCT

### 2.3.1.8 DOO-5562

GGGACTTCGGGTATTGCCAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG  
GGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCAACTCCGGCTTCATGT  
AGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGGGACGAGTTTTTTAAGTTTTGCTCCACC  
TCGCGGTATTGCGTCTCGTTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGACAT  
AAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCCGGTTACCCGGGCAGT  
CTCGCTAGAGTGCTCAACTTAATGGTAGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCT  
TCCTGCCCCGAAGGGCTTCCCCGATTAAGGGTAATTCAGGAGATGTCAAGTCTAGGT  
AAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCC  
CGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGGGTACTTATT  
GTGTTAACGGCGGCACGGAAGGAGTCGATACCTCCCACACCTAGTACCCATCGTTT  
ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCA  
GCGTCAGTTACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTAATCTCTAC  
GCATTTACCGCTACACTAGGAATTCACCTTCCCTCTCCTGCACTCTAGATACCAGT  
TTCAAATGCAGCACCCAAGTTGAGCCCGGGTATTTACATCTGACTTAAGTATCCGC  
CTACACTCCCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCG  
CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCCTCCTCAGGTACCGTCATTATCGTC  
CCTGAAGACAGAGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTGC  
ATCAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG  
GCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTC  
GCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTTGAA  
GCGGATTACTCCTTTAATCAATTCATCATGCGATGTAAGTATGCGGTATTAAT  
CCTCCTTTCGGAGGGCTATCCCCACTTCAAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACC  
CGTCCGCCGCT

### 2.3.1.9 DOO-5563

CGGACTTCGGGTGTTACCAGCTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG  
GGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCAACTCCAGCTTCATGT  
AGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTACTGAGATAGGTTTTATAAGTTTTGCTCCACC  
TCACGGTCTTGCGTCTTATTGTACCTACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGACAT  
AAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCTGGTTACCCAGGCAGTCT  
CATTAGAGTGCTCAACTTAATGGTAGCAACTAATAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCAG  
GACTTAACCTAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCC  
TTGCCCCGAAGGGCTTCACCTATCTCTAGGCTATGCAAGGGATGTCAAGTCCAGGTA  
AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCC  
GTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTATTGT  
GTTAACTGCGGCACAGGGGGAGTTGATACCCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACG  
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGTGCCTCAGCG  
TCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTAATCTCTACGCA  
TTTCACCGCTACACTAGGAATTCCGCTTTCCTCCTGCACTCTAGATATCCAGTTTG  
GAATGCAGCCCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACATCCCCTTAAACATCCGCCTA  
CGCACCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGCG  
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCTCCTCTGGTACCGTCATTATCGTCCCA  
GAAAACAGGGCTTTACAATCCGAAGACCTTCATCACCCACGCGGCGTTGCTGCGTC  
AGGGTTTTCCCCATTGCGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC  
CGTTTCTCAGTTCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCC  
TTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTCAAAGCAA  
TAAATCTTTGATAAGAAAATCATGCGATTCTCTCATATTATGCGGTATTAATCTTCCTT  
TCGGAAGGCTATCCCCACTTTGAGGCAGGTTACCCACGTGTCACTCACCCGTCCG  
CCGCT

### 2.3.1.10 DOO-5564

CGGACTTCGGGTGTTACCAGCTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG  
GGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCAACTCCAGCTTCATGT  
AGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTACTGAGATAGGTTTTATAAGTATTGCTCCACC  
TCACGGTCTTGCGTCTTATTGTACCTACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGACAT  
AAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCTGGTTACCCAGGCAGTCT  
CATTAGAGTGCTCAACTTAATGGTAGCAACTAATAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCAG

GACTTAACCTAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCC  
TTGCCCCGAAGGGCTTCACCTATCTCTAGGCTATGCAAGGGATGTCAAGTCCAGGTA  
AGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCC  
GTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTATTGT  
GTTAACTGCGGCACAGGGGGAGTTGATACCCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACG  
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGTGCCTCAGCG  
TCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTAATCTCTACGCA  
TTTCACCGCTACACTAGGAATTCGCTTTCCTCTCCTGCACTCTAGATATCCAGTTTG  
GAATGCAGCCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTACATCCCCTAAACATCCGCCTA  
CGCACCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGCG  
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCTCCTCTAGTACCGTCATTATCGTCCTA  
GAAAACAGGGCTTTACAATCCGAAGACCTTCATCACCCACGCGGGCGTTGCTGCGTC  
AGGGTTTCCCCATTGCGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC  
CGTGTCTCAGTTCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGC  
CTTGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTCAAAGCA  
ATAAATCTTTGATAAGAAAATCATGCGATTCTCTCATATTATGCGGTATTAATCTTCT  
TTCGGAAGGCTATCCCCACTTTGAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCG  
CCGCT

### **2.3.1.11 DOO-5565**

CCCTGTGGTTGTATGGATCTTGGATTTTTCTTTTATGATTAAGAGTATGACGGAGAGT  
AGTGTGGAGGAGGTGAGTGATGGGCTATGAGTGAGATGTGGGGTTAGGTGCTTGAT  
TAAGTTAGGTGAGAGTGTGGCGGAGATAATTTTTTAATGAAAGGAGAATGTGAGGT  
GACTTTAGAATGAGAAGTAGGCACATTTGAATGGAGCCGGGTTAAAATTTTGGTAGG  
GGCTCCCCGAGCCACGATGCGTCTTAGACCTGAGAGGGTGATCGGCCTAACAGG  
GACTGAGATTTCGGCCAGACTCCTATGGGAGGCACCTTAAGGGAATCTTCCCCAAT  
GGACGAAAGCCTGAAAGAATAACGGCCCGCGAGTGATGAAGGCTTTTGGGCCGTCA  
AAATTAGTTGTTAAGGAAGAACAAGTGCTCCCTGCTTAATCTGGTACCTCGACGGCT  
TCCAACCAGATAGACATTGTTCACAATGTGAATTACCGGGCGTTAAGACCCCTCCGG  
TACATTTCAAACCAAATGCTCCGTTGATACTACACCCCCCTTCACTCCTATTATG  
CTCCATCTCCCCGCCACACGGAGAGGATATAGAATAATGGAACAATATAATGCATA  
AACGACCTAGCCACTCCCTCCTTCATCTCCCACTCCTATTACGTTTTGTCTGACCATT  
ATTCGACCCCGCCTCTATCATATGTCATTATAACACTCGTCAATCCGCCGAGCACAC  
GCTTCTCCTCCCCTGTTATCACCTATCCCCACAACATTGATAACGTCCCCGATTCTC

TCTTTTCCTTTTTGTTCTCTACGCGCCTATCCGCTTAGATTTTGGCCACTTACCTTCTT  
GTGTAAACTTTTCTTACTACCTAATTCTTTNCCAACCCCGCACCCCTCTCTTATCCA  
TCCCGTCTCCGGCTCTACTCATACTT

Paralelamente se desarrolló el mismo protocolo para las bacterias *C. septicum* (Vacuna comercial), *C. chauvoei* (Vacuna comercial) y *C. sordellii* (Laboratorio comercial). Las bacterias *C. septicum* (Vacuna comercial) y *C. chauvoei* (Vacuna comercial) eran bacterias de referencia importadas (ATCC) y se utilizan en la producción de biológicos. La bacteria *C. sordellii* (Laboratorio comercial) se aisló en el departamento del Tolima, municipio de Armero en una finca en donde se presentó un brote epidémico de mortalidad. El objetivo fue comparar la similaridad filogenética de dichas bacterias con las bacterias aisladas en este trabajo. Las secuencias fueron:

### **2.3.1.12 *Clostridium septicum* Laboratorio comercial**

CGAACTTTGGGTATTGCCAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG  
GGAACGTATTCACCGCGACATGCTGATTCGCGATTACTAGCAACTCCAGCTTCATGT  
AGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGACAAGTTTTATAGTTTAGCTCCACCT  
CGCGGTATTGCATCTCGTTGACTTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGACATA  
AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCCGGTTAACCCGGGCAGTC  
TCGCTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCG  
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCAT  
CCTGTCCCCGAAGGGACTTCTCGATTAAGAGTAATGCAGGAGATGTCAAGTCTAGG  
TAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCC  
CCGTCAATTCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTAAT  
GTGTTAACGGCGGCACGGAAGGAGTTGATACCTCCCACACCTAGTATCCATCGTTTA  
CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAG  
CGTCAGTTACAGTCCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTAATCTCTACG  
CATTTACCGCTACACTAGGAATTCACCTCTCCTCTCCTGCACTCTAGACTTCCAGTT  
TGAAATGCAGCCCCAGGTTGAGCCCGGGTATTTACATCTCACTTAAAAGTCCGCC  
TACGCTCCCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGC  
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTCCTCAGGTACCGTCATTATCGTCC  
CTGAAGACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTGCAT  
CAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG

CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCG  
CCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTTGTAG  
CGGATTACTCCTTTAATTGCTGCTCCATGCGAAGCTGCAATGTTATGCGGTATTAATC  
TCCCTTTCGGGAGGCTATTCCCCTCTACAAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCC  
GTCCGCCGCT

### **2.3.1.13 *Clostridium chauvoei* Laboratorio comercial**

CGAACTTTGGGTATTGCCAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCTCG  
GGAACGTATTCACCGCGACATGCTGATTCGCGATTACTAGCAACTCCAGCTTCATGT  
AGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGACAAGTTTTATAGTTTAGCTCCACCT  
CGCGGTATTGCATCTCGTTGTACTIONTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGACATA  
AGGGGCATGATGATTTGACGTCACCCCCACCTTCCTCCCGGTTAACCCGGGCAGTC  
TCGCTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCG  
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTGAT  
CCTGTCTCCGAAGAGACTTCCTCGATTAAGAGTAATGCAGGAGATGTCAAGTCTAGG  
TAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCTA  
GCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTAAT  
GTGTTAACGGCGGCACGGAAGGAGTTGATACCTCCCACACCTAGTATCCATCGTTTA  
CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAG  
CGTCAGTTACAGTCCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTAATCTCTACG  
CATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTIONTCCCTCTCCTGCACTIONTACTTCCAGTT  
TGAAATGCAGCACCCAAGTTGAGCCCGGGTATTTACATCTCACTIONTACAAGTCCGCC  
TACGCTCCCTTTACGCCAGTAAATCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGC  
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCTCCTCAGGTACCGTCATTATCGTCC  
CTGAAGACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTIONTACGCGGCGTTGCTGCAT  
CAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG  
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCG  
CCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTTGTAG  
CGGATTGCTCCTTTAATTACTGCTCCATGCGAAGCTGCAATATTATGCGGTATTAATC  
TTCCCTTTCGGAAGGCTATTCCCCTCTACAAGGCAGGTTGCCACGATCTTACTCACCC  
GTCCGCCGCT

### 2.3.1.14 *Clostridium sordellii* Laboratorio comercial.

CCGGCTTCGGGCGCCCCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCC  
GGGAACGCATTACCCGCAGCATTCTGATCTGCGATTACTAGTAACTCCAGCTTCATG  
TAGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGGGATTAGCTCCAC  
CTCACGGCTTGGCAACCCTCTGTACCACCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAAGCA  
TAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCGAGTTATCCTCGGCAGT  
CCCTCTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAAGGCAAGGGTTGCGCTCGTTG  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT  
CACCCTGTCCCCGAAGGGAAATCTCCGATTAGGGAGAGGTCARTGGGATGTCAAG  
CTTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCGCTACTTGTGC  
GGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCACTCTTGCGAGCGTACTTCCCAGGCGGAGT  
ACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGAGGGGGTAACCCCCGACACCTAGTACTCAT  
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTG  
CCTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGAGAGCCGCTTCGCTACTGGTGTTCCTCCTAATA  
TCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTCCT  
ACAGTTCCAAAAGCTTACTACGGTTGAGCCGTAGCCTTTCACTTCTGGCTTGAAAGA  
CCGCCTACGCACCCTTTACGCCAGTAATTCGGATAACGCTAGCCCCCTACGTATT  
ACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCCTCCTCAAGTACCGTCATTAT  
CTTCCTTGAGGACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCATCGCTCACGCGGCGTTG  
CTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT  
TTGGACCGTGTCTCAGTTCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACTGATC  
GTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGTCCATCCTG  
TACCGCCGGAGCTTTGATAYAAAAGCCATGCGACTCTCATAYDTTATCCCGTATTAG  
CATACCTTTCGGTATGTTATCCGTGTGTACAGGGCAGGTTACCCACGCGTACTCAC  
CCGTCCGCCGCT

En la tabla 2.5 se indica el tipo de *Clostridium* aislado lo mismo que el tamaño de los amplímeros de las secuencias del gen 16SrARN. También se indica el tamaño de los amplímeros de las secuencias del gen 16SrARN de *Clostridium* utilizado en la producción de vacuna por un laboratorio comercial.

**Tabla 2 5** Tamaño de los amplímeros de las secuencias del gen 16SrARN de *Clostridium spp.* aislados; Tamaño de los amplímeros de las secuencias del gen 16SrARN de *Clostridium* utilizado en la producción de vacuna por un laboratorio comercial.

Num	SECUENCIA	CODIGO	BACTERIA	PB
1	Secuencia 1: gi	DOO5555	<i>Clostridium chauvoei</i>	1318 pb
2	Secuencia 2: gi	DOO5556	<i>Clostridium sordellii</i>	1317 pb
3	Secuencia 3: gi	DOO5557	<i>Clostridium sordellii</i>	1317 pb
4	Secuencia 4: gi	DOO5558	<i>Clostridium botulinum</i>	1315 pb
5	Secuencia 5: gi	DOO5559	N. N.	1316 pb
6	Secuencia 6: gi	DOO5560	<i>Clostridium botulinum</i>	1315 pb
7	Secuencia 7: gi	DOO5561	<i>Clostridium sordellii</i>	1317 pb
8	Secuencia 8: gi	DOO5562	<i>Clostridium botulinum</i>	1317 pb
9	Secuencia 9: gi	DOO5563	<i>Clostridium botulinum</i>	1315 pb
10	Secuencia 10: gi	DOO5564	<i>Clostridium botulinum</i>	1315 pb
11	Secuencia 11: gi	DOO5565	N. N.	941 pb
12	Secuencia 12: gi	LABORATORIO	<i>Clostridium septicum</i>	1318 pb
13	Secuencia 13: gi	LABORATORIO	<i>Clostridium chauvoei</i>	1318 pb
14	Secuencia 14: gi	LABORATORIO	<i>Clostridium sordellii</i>	1316 pb

Las secuencias de las bacterias *Clostridium septicum* AB558163, *Clostridium chauvoei* EU106372, *Clostridium botulinum* NC\_010723.1, *Clostridium limosum* EU118811, *Clostridium botulinum* ABDP01000028, *Clostridium difficile* ABHE02000055 y *Clostridium sordellii* AB550230 se obtuvieron de la base de datos del Gen Bank de NCBI y se utilizaron para determinar la similaridad de sus secuencias con las secuencias de las bacterias aisladas. Las características de dichas bacterias son:

*Clostridium septicum* AB558163 secuencia parcial del gen 16S ribosomal RNA. La bacteria fue obtenida de la colección de microorganismos del instituto BioResource Center, división de microbiología, Japón (Sakamoto, M., 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

*Clostridium chauvoei* EU106372 aislamiento CC6, secuencia parcial del gen 16S ribosomal RNA. Corresponde a la diversidad de especies de *Clostridium* de la India. Universidad Bharathiar, Biotecnología, División Biotecnología Microbial (Sathish, S. & Swaminathan, K., 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Tabla 2 6** Porcentaje de similaridad de secuencias de *Clostridium* spp. Secuencia de bacterias aisladas; secuencias de bacterias de laboratorio comercial.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
<i>C.sordellii</i> DOO5556	1																			
<i>C.sordellii</i> DOO5557	2	99.0																		
<i>C.sordellii</i> DOO5561	3	99.0	99.0																	
<i>C.sordellii</i> lab	4	98.0	98.0	98.0																
<i>C.sordellii</i> AB550230G.B.	5	98.0	98.0	98.0	99.0															
<i>C.difficile</i> ABHE020000551G	6	95.0	95.0	95.0	96.0	96.0														
<i>C.chauvoei</i> DOO5555	7	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	86.0													
<i>C.septicum</i> AB558163G.B.	8	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	86.0	100.0												
<i>C.limosum</i> EU118811G.B	9	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	91.0	91.0											
<i>C.chauvoei</i> EU106372G.B	10	84.0	84.0	84.0	84.0	84.0	84.0	98.0	98.0	90.0										
<i>C.botulinum</i> NC010723G.B.	11	85.0	85.0	85.0	84.0	85.0	84.0	94.0	94.0	90.0	93.0									
<i>C.septicum</i> lab	12	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	100.0	100.0	91.0	98.0	94.0								
<i>C.chauvoei</i> lab	13	84.0	84.0	84.0	84.0	84.0	85.0	98.0	98.0	90.0	99.0	94.0	98.0							
<i>C.botulinum</i> DOO5562	14	84.0	84.0	84.0	84.0	84.0	85.0	95.0	95.0	91.0	94.0	93.0	95.0	95.0						
<i>C.botulinum</i> DOO5560	15	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	91.0	91.0	92.0	90.0	90.0	91.0	90.0	91.0					
<i>C.botulinum</i> DOO5564	16	84.0	85.0	85.0	85.0	85.0	84.0	91.0	91.0	92.0	90.0	90.0	91.0	90.0	91.0	99.0				
<i>C.botulinum</i> DOO5563	17	84.0	84.0	84.0	84.0	85.0	84.0	91.0	91.0	92.0	90.0	90.0	91.0	90.0	91.0	99.0	99.0			
<i>C.botulinum</i> DOO5558	18	84.0	84.0	84.0	84.0	84.0	84.0	91.0	91.0	91.0	90.0	90.0	90.0	90.0	91.0	98.0	98.0	99.0		
<i>C.botulinum</i> ABDP01000028G.B.	19	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	84.0	91.0	91.0	92.0	90.0	90.0	91.0	90.0	91.0	100.0	99.0	99.0	98.0	

*Clostridium botulinum* NC\_010723.1 secuencia parcial del gen 16S ribosomal RNA. Trabajos desarrollados en el Laboratorio Nacional Los Alamos NM, Estados Unidos (Brinkac, L. M., Brown, J. L., Bruce, D., Detter, C., Munk, C., Smith, L. A., Smith, T. J., Sutton, G. and Brettin, T. S., 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

*Clostridium limosum* cepa VA3187/2007, accesion EU118811, secuencia parcial del gen 16S ribosomal RNA. Aislado de una herida de un hombre de 21 años de edad, el 24 de agosto de 2007. Instituto fuer Klinische Mikrobiologie, Universidad Erlangen, Wasserturmstr.Alemania (Geissdoerfer, W., von Stockmar von Wangenheim, C. & Schoerner, C. 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

*C. botulinum* ABDP01000028- secuencia parcial del gen 16S ribosomal RNA. Fue aislado de un caso de botulismo infantil. J. Instituto Craig Venter. Rockville, Estados Unidos (Harkins, D. M.; Shrivastava, S.; Brinkac, L. M.; Durkin, A. S. & Sutton, G. 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



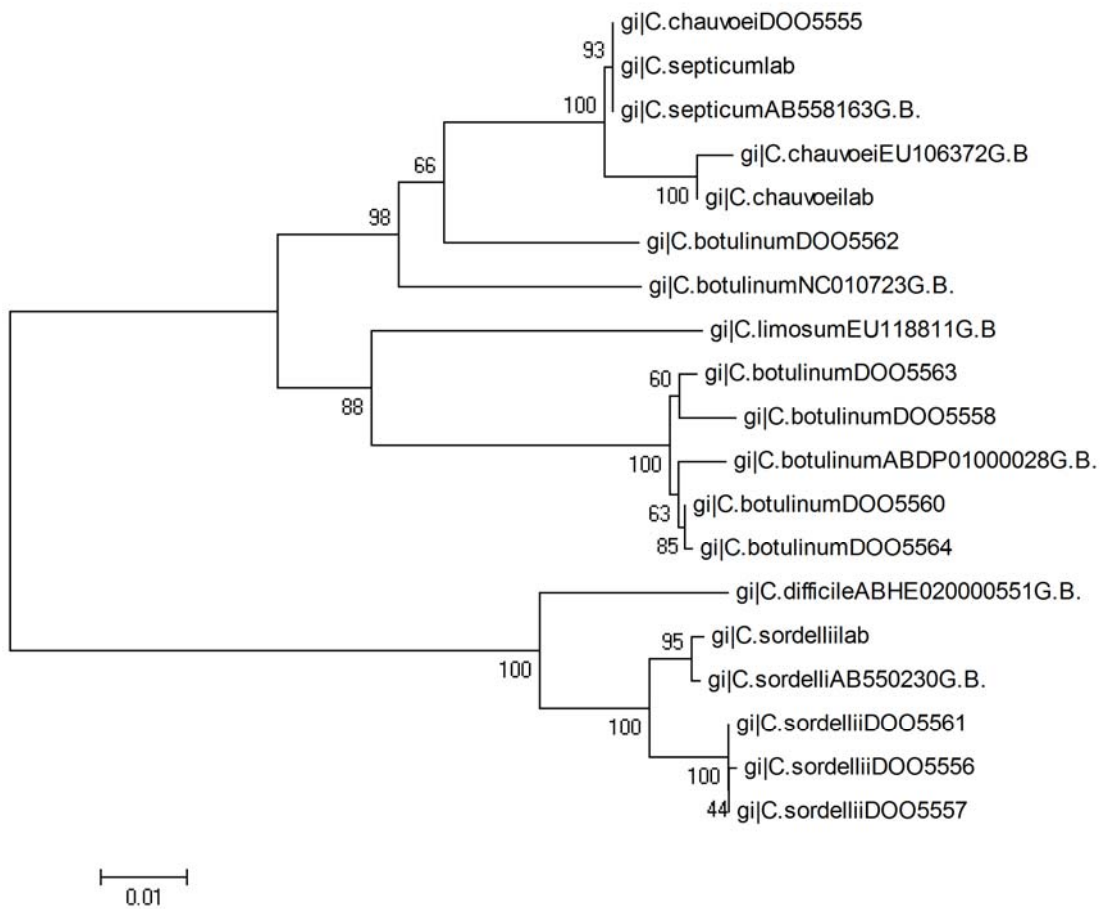


Figura 2 10 Dendrograma relaciones filogenéticas de *Clostridium* spp. basado en secuencias de 16SrDNA. Los valores Bootstrap (expresados como porcentajes de 10000 replications) son demostrados en las ramas. Modelo Kimura 2 – Parámetros. (Mega 4®).

*Clostridium difficile* QCD-76w55 NZ\_ABHE02000055, secuencia de todo el genoma. El aislamiento fue hecho por el Dr. A. Dascal, en el Jewish General Hospital de Montreal, Quebec, Canadá (Dias, J., Hernandez, C., Pinsonnault, C., Leveque, G., Marquis, P., Nagy, C., Villeneuve, A., Blanchette, R., Brukner, I., Oughton, M., Forgetta, V., Markovic, C., Nelson, J., Mardis, E., Gerding, D., Dascal, A. y Dewar, K, el 3 de enero de 2009 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

*Clostridium sordellii* secuencia parcial del gen 16S rRNA, AB550230, cepa: JCM 3814. La bacteria fue obtenida de la colección de microorganismos del instituto BioResource

Center, división de microbiología, Japón (Sakamoto, M. 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Con las secuencias de las bacterias se realizaron los alineamientos correspondientes (anexo 4) y se estimó la divergencia evolutiva de las secuencias. También se estimó el porcentaje de similaridad (Tabla 2.6). Otros trabajos realizados en clostridios (Collins *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 2001), han utilizado esta metodología, e indican que los trabajos basados en análisis de la secuencia de ADN son necesarios para mejorar las herramientas diagnósticas para éstas bacterias.

### 2.3.2 Análisis filogenético

Las bacterias aisladas y clasificadas bioquímicamente fueron comparadas con las secuencias de bacterias reportadas en el Gen Bank. De acuerdo con la información de la secuencia de ADN del gen 16S rRNA, la bacteria DOO5558 fue clasificada como *C. sordellii* y presentó valores altos de similaridad de su secuencia con *C. botulinum*; la bacteria DOO5561 clasificada como *C. botulinum* presentó similaridad de su secuencia con *C. sordellii*; la bacteria DOO5562 clasificada como *C. tertium* presentó similaridad con *C. botulinum*; la bacteria DOO5563 clasificada como *C. limosum* presentó similaridad con *C. botulinum*; la bacteria DOO5564 clasificada como *C. glycolicum* presentó similaridad con *Clostridium botulinum*, por lo que para el análisis final se adoptó esta identidad.

En la figura 2.10 se observa el primer dendograma obtenido. Los valores de distancia se indican en la tabla 2.7. El dendograma muestra las relaciones filogenéticas de los clostridios. En el primer cluster obtenido se observa que las menores medidas de distancia (0,00000) se encontraron entre los aislamientos *C. sordellii* (DOO5557) y *C. difficile* (DOO5561); la identidad encontrada entre las secuencias de estas dos bacterias fue de 99%. *C. sordellii* (DOO5556) y *C. sordellii* (DOO5557) presentaron un valor de medida de distancia de 0,00077; la identidad encontrada entre las secuencias de estas dos bacterias fue de 99%. Este mismo resultado se presentó en el 100% de las replicas después de un procedimiento de remuestreo de 10000 replicas, realizado por la metodología de bootstrapping. En este primer cluster se agruparon las bacterias *Clostridium sordellii*, obtenidas de un laboratorio comercial y *Clostridium sordellii*

(AB550230), secuencia obtenida del Gen Bank con un valor de medida de distancia de (0.00232); la identidad encontrada entre las secuencias de estas dos cepas fue de 99%.

Este resultado se presentó en el 95% de las replicas después de un procedimiento de remuestreo de 10000 replicas. La secuencia de *Clostridium difficile* ABHE020000551 obtenida del Gen Bank se agrupó con los anteriores secuencias, aunque con un mayor valor de medida de distancia de 0,03725; la identidad encontrada entre la secuencia de esta bacteria y las del cluster fue de 96%, distribución observada en el 100% de las replicas después de un procedimiento de remuestreo de 10000 replicas.

**Tabla 2 7** Distancia evolutiva de *Clostridium spp.*, bacterias aisladas, bacterias de laboratorio comercial y cepas de referencia (GenBank). Diez fincas de los municipios de Mariquita, Nemocón, Puerto López y Ubaté. Modelo Kimura 2 – Parámetros. (Mega 4®).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 #gij C. sordellii DOO5556													
2 #gij C. sordellii DOO5557	0.00077												
3 #gij C. sordellii DOO5561	0.00077	0.00000											
4 #gij C. sordellii laboratorio	0.01486	0.01400	0.01407										
5 #gij C. sordellii AB550230	0.01723	0.01645	0.00165	0.00320									
6 #gij C. difficile ABHE020000551	0.04719	0.04638	0.04638	0.03644	0.03725								
7 #gij C. chauvoei DOO5555	0.15460	0.15366	0.15366	0.14970	0.14869	0.14776							
8 #gij C. s. septicum AB558163	0.15460	0.15366	0.15366	0.14970	0.14869	0.14776	0.00000						
9 #gij C. limosum EU118811	0.16309	0.16215	0.16215	0.16012	0.15909	0.15165	0.09407	0.09407					
10 #gij C. chauvoei EU106372	0.17003	0.16908	0.16908	0.16503	0.16597	0.16403	0.01560	0.01560	0.10468				
11 #gij C. botulinum NC10723	0.15347	0.15254	0.15254	0.15839	0.15735	0.16037	0.05216	0.05216	0.09667	0.06304			
12 #gij C. septicum Laboratorio	0.15460	0.15366	0.15366	0.14970	0.14869	0.14776	0.00000	0.00000	0.09407	0.01560	0.05216		
13 #gij C. chauvoei Laboratorio	0.16518	0.16424	0.16424	0.16021	0.16115	0.15923	0.01167	0.01167	0.10206	0.00387	0.05884	0.01167	
14 #gij C. botulinum DOO5562	0.16131	0.16037	0.16037	0.16031	0.15927	0.15529	0.04382	0.04382	0.08352	0.05372	0.06645	0.04382	0.04959
15 #gij C. botulinum DOO5560	0.16141	0.16047	0.16047	0.15844	0.15641	0.15797	0.08734	0.08734	0.07560	0.10143	0.08957	0.08734	0.09701
16 #gij C. botulinum DOO5564	0.16235	0.16141	0.16141	0.15938	0.15735	0.16892	0.08820	0.08820	0.07645	0.10230	0.09043	0.08820	0.09787
17 #gij C. botulinum DOO5563	0.16535	0.16441	0.16441	0.16235	0.16031	0.17194	0.08731	0.08731	0.07558	0.10139	0.08955	0.08731	0.09696
18 #gij C. botulinum DOO5558	0.16903	0.16808	0.16808	0.16603	0.16398	0.17576	0.09163	0.09163	0.08160	0.10396	0.09389	0.09163	0.09953
19 #gij C. botulinum ABDP01000028	0.16641	0.16547	0.16547	0.16341	0.16136	0.17300	0.09184	0.09184	0.07817	0.10602	0.09404	0.09184	0.10156

Un segundo cluster lo conformaron las bacterias *C. botulinum* (DOO5564) y *C. botulinum* (DOO5560) con un valor de distancia de 0,00077, la identidad encontrada entre las secuencias de estas dos bacterias fue de 99%; Esta distribución se presentó en el 85% de las replicas. La bacteria *C. botulinum* ABDP01000028 obtenida del Gen Bank se agrupa con las anteriores con un valor de medida de distancia de (0,00698), la identidad encontrada entre las secuencias de estas dos bacterias fue de 99%, distribución que se presentó en el 63% de las replicas. Las bacterias *C. botulinum* (DOO5558) y *C. botulinum* (DOO5563) se agruparon en este cluster con un valor de medida de distancia de (0,00854); la identidad encontrada entre las secuencias de estas dos bacterias fue de 99%, distribución que se presentó en el 60% de las replicas.

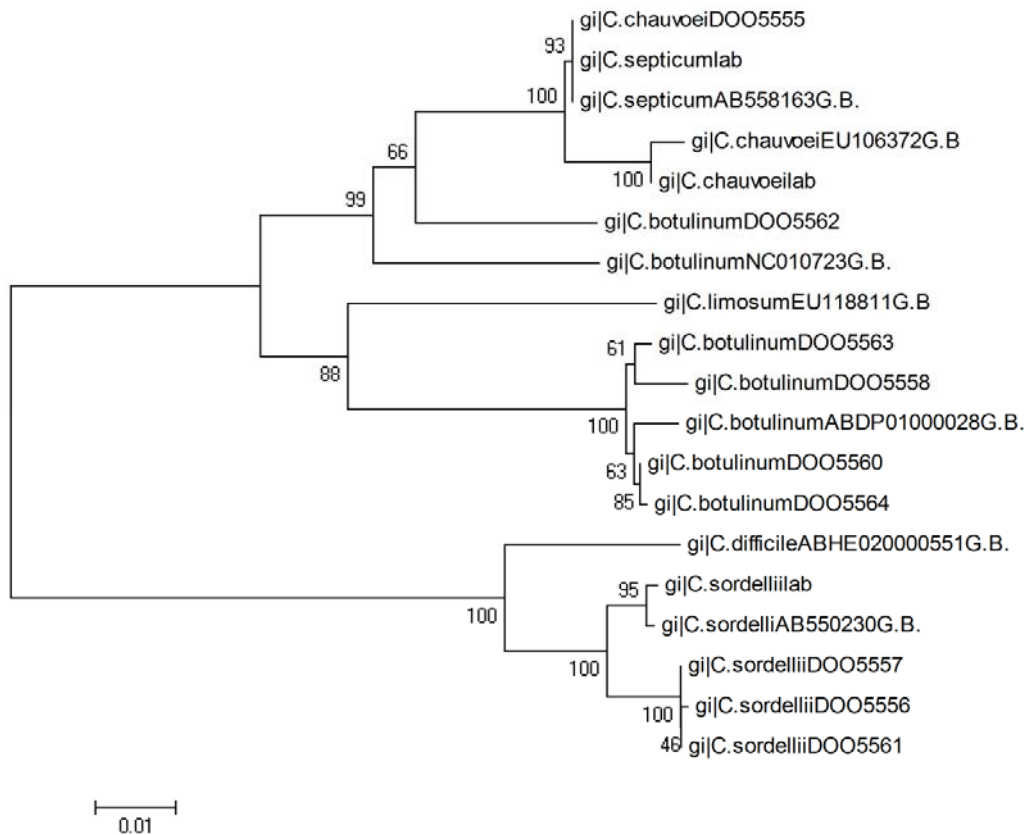


Figura 2 11 Dendrograma, relaciones filogenéticas de clostridios basado en secuencias de 16SrDNA. Los valores Bootstrap (expresados como porcentajes de 1000 replicaciones) son demostrados en las ramas. Modelo Tamura 3 – Parámetros. (Mega 4®). La barra representa el 10% de divergencia genética

El tercer cluster lo formaron las bacterias de *C. septicum* obtenidas del laboratorio comercial, *C. septicum* AB558163 obtenida del Gen Bank y *C. chauvoei* DOO5555 entre las que presentaron una distancia de (0.00000) igualmente, la identidad encontrada entre las secuencias de estas bacterias fue de 100%. Esta agrupación se presentó en el 93% de las replicas. Muy cercanos se agregaron *C. chauvoei* obtenida de laboratorio comercial y *C. chauvoei* EU106372 obtenida de Gen Bank los cuales presentaron una distancia de (0,000387) entre ellos; la identidad encontrada entre las secuencias de estas dos bacterias fue de 99%., la distribución que presentaron se observó en el 100% de las replicas.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos se desarrolló otro análisis filogenético estimando los valores de similaridad genética, mediante el uso de la medida de Tamura (Tamura, 2007), con el cual se obtuvieron cluster bacterianos similares a los obtenidos por el método Kimura (Kimura, 1980).

Los resultados se observan en la figura 2.11 y en la tabla 2.8, donde se presentan las distancias filogenéticas.

**Tabla 2 8** Distancia evolutiva de *Clostridium spp.*, bacterias aisladas, bacterias de laboratorio comercial y cepas de referencia (GenBank). Diez fincas de los municipios de Mariquita, Nemocón, Puerto López y Ubaté. Modelo Tamura 3 – Parámetros. (Mega 4®).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 #g C. sordellii DOO5556																			
2 #g C. sordellii DOO5557	0.00077																		
3 #g C.sordellii DOO5561	0.00077	0.00000																	
4 #g C.sordellii laboratorio	0.01486	0.01408	0.01408																
5 #g C. sordelliiAB550230	0.01723	0.01645	0.00165	0.00232															
6 #g C.difficile ABHE020000551	0.04720	0.04638	0.04638	0.03644	0.03725														
7 #g C. chauvoei DOO5555	0.15464	0.15371	0.15371	0.14975	0.14873	0.14779													
8 #g C.septicum AB558163	0.15464	0.15371	0.15371	0.14975	0.14873	0.14779	0.00000												
9 #g C.limosum EU118811	0.16313	0.16218	0.16218	0.16016	0.15913	0.15168	0.09409	0.09409											
10 #g C.chauvoei EU106372	0.17007	0.16912	0.16912	0.16508	0.16602	0.16407	0.01560	0.01560	0.10470										
11 #g C.botulinum NC10723	0.15349	0.15256	0.15256	0.15842	0.15738	0.16039	0.05217	0.05217	0.09668	0.06304									
12 #g C.septicum Laboratorio	0.15464	0.15371	0.15371	0.14975	0.14873	0.14779	0.00000	0.00000	0.09409	0.01560	0.05217								
13 #g C.chauvoei Laboratorio	0.16523	0.16428	0.16428	0.16026	0.16120	0.15926	0.01167	0.01167	0.10208	0.00387	0.05885	0.01167							
14 #g C.botulinum DOO5562	0.16136	0.16042	0.16042	0.16038	0.15933	0.15533	0.04383	0.04383	0.08353	0.05373	0.06645	0.04383	0.04959						
15 #g C. botulinum DOO5560	0.16145	0.16051	0.16051	0.15848	0.15645	0.16800	0.08736	0.08736	0.07561	0.10144	0.08958	0.08736	0.09702	0.08493					
16 #g C. botulinum DOO5564	0.16239	0.16145	0.16145	0.15942	0.15739	0.16895	0.08821	0.08821	0.07646	0.10231	0.09044	0.08821	0.09789	0.08578	0.00077				
17 #g C. botulinum DOO5563	0.16539	0.16445	0.16445	0.16240	0.16036	0.17197	0.08732	0.08732	0.07559	0.10140	0.08955	0.08732	0.09698	0.08489	0.00309	0.00387			
18 #g C. botulinum DOO5558	0.16907	0.16812	0.16812	0.16607	0.16403	0.17580	0.09165	0.09165	0.08160	0.10398	0.09390	0.09165	0.09954	0.09001	0.01010	0.01088	0.00854		
19 #g C. botulinum ABDP01000028	0.16845	0.16551	0.16551	0.16345	0.16140	0.17304	0.09185	0.09185	0.07817	0.10603	0.09404	0.09185	0.10158	0.08942	0.00620	0.00698	0.00932	0.01639	

En la secuencia de las bacterias aisladas se determinaron zonas de variabilidad ubicadas en la posición 793, en la cual las bases consenso ACT fueron reemplazadas por las bases TTC, en las bacterias *C. chauvoei* DOO5555, *C. septicum* AB558163G.B, *C. chauvoei* EU106372G.B, *C. septicum* lab, *C. chauvoei* lab (Anexo 6).

En la posición 811 la secuencia consenso TTA fue reemplazada por AGC en las bacterias *C. chauvoei* DOO5555, *C. septicum* AB558163G.B, *C. limosum* EU118811G.B, *C. chauvoei* EU106372G.B, *C. botulinum* NC010723G.B, *C. septicum* lab, *C. chauvoei* lab, *C. botulinum* DOO5562, *C. botulinum* DOO5560, *C. botulinum* DOO5564, *C. botulinum* DOO5563, *C. botulinum* DOO5558, *C. botulinum* ABDP01000028G.B. (Anexo 6).

En la posición 1202 la secuencia consenso CCGGAG fue reemplazada por la secuencia TTACTC en las bacterias *C. chauvoei* DOO5555, *C. septicum* AB558163G.B, *C. limosum* EU118811G.B; por TT-CTC en las bacterias *C. chauvoei* EU106372G.B; por TTACTC en las bacterias *C. botulinum* NC010723G.B, *C. septicum* lab, *C. chauvoei* lab, *C. botulinum* DOO5562 (Anexo 6).

En la posición 1215 la secuencia consenso ACAAAG fue reemplazada por la secuencia TGCTGCT en las bacterias *C. chauvoei* DOO5555, *C. septicum* AB558163G.B; por la secuencia CATTTCOA en la bacteria *C. limosum* EU118811G.B; por TACTGCT en la bacterias *C. chauvoei* EU106372G.B; por TGCCGTTT en la bacteria *C. botulinum* NC010723G.B; por TGCTGCT en *C. septicum* lab; por la secuencia CA-TTCAT en la bacteria *C. botulinum* DOO5562 (Anexo 6).

## 2.4 Discusión

### 2.4.1 Caracterización bioquímica

Para identificar bacterias clostridiales se utilizan los métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y costo los hace más asequibles. Los métodos genotípicos suelen reservarse para las bacterias que no se pueden identificar con métodos convencionales. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características "observables" de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas que reflejan el metabolismo. El cultivo, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos (Smith *et al.*, 1968; Smith *et al.*, 1975; Dowel *et al.*, 1976; Smith, 1977; Hateway, 1988-1990; Bou *et al.*, 2011).

Los resultados de caracterización bioquímica permitieron dar una clasificación aproximada de las bacterias aisladas; sin embargo esta no es exacta como lo reporta Bou *et al.*, (2011). La caracterización bioquímica fue confrontada con la caracterización molecular, encontrando que bacterias clasificadas como *C. sordellii*, *C. tertium*, *C.*

*limosum* y *C. glycolicum* resultaron ser molecularmente *C. botulinum*. Una bacteria *C. botulinum* resultó ser molecularmente *C. sordellii*, por lo que los resultados de clasificación bioquímica de esas bacterias no eran los correctos.

A pesar de lo indicado anteriormente es necesario revisar los protocolos de caracterización bioquímica principalmente lipasa y lecitinasa para buscar los correctivos ya que muchas observaciones de los medios de cultivo resultan subjetivas. Las reacciones de lipasa y lecitinasa por parte de las bacterias se demostraron en agar yema de huevo. La lipasa transforma las grasas en glicerol y ácidos grasos dando una capa iridiscente que cubre la superficie de la colonia; la lecitinasa ( $\alpha$  toxina, fosfolipasa C) produce un halo opaco alrededor de la colonia por lisis de la lecitina, características de alguna utilidad en la caracterización bioquímica de las mismas, pero que no son exactas algunas veces, por lo que se requiere el uso de herramientas más específicas.

Se pudo comprobar que algunas especies de clostridios son sacarolíticos (fermentan la glucosa), otras producen hidrólisis de la gelatina y otras pueden tener ambas características.

## 2.4.2 Caracterización molecular

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no definitiva. Para solventar los problemas presentados por los sistemas de identificación fenotípica —no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica; una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos; y las limitaciones en la base de datos de bacterias correspondiente, entre otros— se han impuesto los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos (Alba, 2011; Bou *et al.*, 2011).

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en las distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa (Bou *et al.*, 2011).

El análisis de la secuencia del ARNr 16S constituye una herramienta muy útil en el estudio de la diversidad bacteriana en muestras clínicas y ambientales, por lo que se ha estudiado en un gran número de especies bacterianas. Aunque las secuencias disponibles en las bases de datos presentan un tamaño variable, suelen analizarse entre 500 y 1.500 pb. Actualmente, GenBank es la base de datos con mayor información ya que contiene más de 2 millones de secuencias depositadas del gen ARNr 16S (Bou *et al.*, 2011).

Las bacterias caracterizadas molecularmente en este trabajo resultaron  $\beta$  hemolíticas, situación indicada por Hately (1988; 1990) y por Smith (1968), quienes reportaban que este criterio podía ser un indicativo de patogenicidad de los clostridios.

Desde hace unos años se había demostrado el uso del gen 16S rADN para permitir un diagnóstico más rápido de las infecciones causadas por diferentes especies de *Clostridium*, indicando que la secuencia de algunas regiones del gen 16S rADN presenta homología en todas las bacterias, pero que en otras regiones de este gen se pueden demostrar considerables diferencias (Urtler *et al.*, 1991), por lo que constituye una alternativa para identificar los clostridios de importancia clínica (patógenos), entre los cuales se describen los aislados en este trabajo.

#### **2.4.2.1 *Clostridium botulinum***

De las nueve bacterias caracterizadas molecularmente, las cuales demostraron 100% toxicidad en cultivo celular y en ratones, cinco (55.5%) correspondieron a *C. botulinum*, por lo que constituyó la bacteria de mayor frecuencia en este estudio. Tres de ellas (33,3%) se aislaron en el municipio de Mariquita, departamento del Tolima. Otra se aisló en el municipio de Nemocón, departamento de Cundinamarca (11,1%) y la quinta se aisló en el municipio de Puerto López departamento del Meta (11.1%).

El *C. botulinum* se encuentra comúnmente en muestras de suelos y sedimentos acuáticos. Hauschild (1989) ha proporcionado un resumen completo de los estudios sobre muestras de suelo y sedimentos acuáticos de América del Norte y América, Europa, Asia, África del Sur, Islandia y Nueva Zelanda. Él ha intentado proporcionar una



estimación de la densidad de las esporas (número más probable por kilogramo de suelo o sedimento) para cada zona de estudio. La densidad de esporas en el suelo oscilan entre 1 y 6 (Gran Bretaña) a 2.500 (los campos de papa Países Bajos), y aquellos en los sedimentos van de 1 (Islas Feroe, el Golfo de Maine) a 920 (el lago Michigan). Los tipos A y B son predominantes en los suelos de la parte continental de Estados Unidos, pero de tipo E es el más común en los suelos de Alaska, el norte de Europa, y Japón.

Es importante destacar que a través de las neurotoxinas C y D el *C. botulinum* está comprometido en intoxicaciones alimentarias en bovinos caracterizadas por producir brotes de mortalidad con cuadro clínicos de tipo nervioso y parálisis motora del tren posterior (Hateway, 1988; Titball *et al.*, 2003; Ortiz & Villamil, 2008). Sus neurotoxinas son termolábiles y se desnaturalizan fácilmente.

Los resultados de este trabajo indican que *C. botulinum* (DOO5560) y *C. botulinum* (DOO5564) (0,00077) tienen un origen filogenético similar, situación compatible con el aislamiento *C. botulinum* (DOO5558) y *C. botulinum* (DOO5563) (0,000854). A pesar de demostrar el efecto toxigénico de los sobrenadantes de cultivo se hace necesario en una fase futura de investigación implementar los protocolos de neutralización (Hateway, 1990; Ortiz, 2000) para determinar el tipo de toxina producida por éstas bacterias y estandarizar los protocolos para secuenciar los genes productores de BoNT (Urtler *et al.*, 1991).

Los aislamientos de *Clostridium botulinum* presentes en los suelos de fincas afectadas por brotes epidémicos demuestran la importancia de desarrollar futuros estudios epidemiológicos. Dicho microorganismo participa como agente causal de intoxicaciones alimentarias en bovinos, asociadas a casos de muerte súbita (neurotoxinas C y D) (Hateway, 1988, 1990; Ortiz, 2000).

El análisis del gen 16S rRNA en las especies de *Clostridium* aislados corroboran lo descrito en la literatura en donde se ha demostrado que las cepas de *Clostridium botulinum* forman cuatro grupos diferentes (Grupos I, II, III y IV) (Hateway, 1990; Smith, 1977) que representan los grupos fisiológicos basados en análisis del mismo gen. De esta forma la filogenia de éstas especies basada en análisis molecular ha soportado la taxonomía actual que también está basada en los atributos fisiológicos de las especies y

en las neurotoxinas botulínicas (BoNTs) producidas (Hill *et al.*, 2010), las cuales los clasifican en siete grupos serológicamente diferentes (serotipos A hasta G) (Hateway, 1995).

En el Brasil, en la zona de No Sul de Goiás, a partir de 1977 se desencadenó la mortalidad de millares de bovinos, ocasionado por la sustitución gradual de pastos nativos cuyo suelo era deficiente en fósforo, por pastos cultivados, principalmente gramíneas poco exigentes, y la introducción de bovinos seleccionados para rápido crecimiento. El síndrome se caracterizó por afectar principalmente vacas en avanzado estado de gestación o en el inicio de la lactancia, fase donde los requerimientos de fósforo eran mayores. Los bovinos que pastaban en esos suelos deficientes en fósforo, adquirían instintivamente el curioso hábito de roer huesos (alotriofagia - osteofagia) de cadáveres para suplir la deficiencia de fósforo de la alimentación (De Souza & Langenegger, 1987). Para investigar el brote de mortalidad se realizó un estudio de aislamiento y caracterización de cepas de *C. botulinum* aisladas de suelo (CT-Bariloche, 2002). Se aisló un 39% de cepas de *C. botulinum* tipos C y D lo cual suministró información para la caracterización de los tipos de *C. botulinum* responsables por el botulismo bovino en el Brasil. La utilización de cepas aisladas en ese país para la producción de toxoides se convirtió en un factor que mejoró los índices de protección frente a los desafíos de campo (CT-Bariloche, 2002).

El botulismo epidémico ocurre en animales criados extensivamente en pasturas pobres en fósforo sin suplementación mineral adecuada, debido al hábito de los animales de roer huesos (alotriofagia), con mayor incidencia en el período de lluvias, en el auge del ciclo vegetativo de las plantas forrajeras. La prevalencia de la enfermedad afecta por orden de frecuencia a las vacas en gestación y/o lactación con cría al pie, raramente ataca terneros y más raramente aún otros animales adultos.

Cuadros similares se describen en Australia desde 1992, donde se responsabilizó al botulismo como el causante de la mortalidad no solamente en bovinos sino en aves acuáticas (Gregory *et al.*, 1996; Gregory & Main, 1996).

Las épocas de presentación de los brotes epidémicos generalmente en épocas de lluvia o después de ellas, las deficiencias minerales en la nutrición de los animales, la

sintomatología aguda de los animales afectados, la ausencia de hallazgos macro y microscópicos en cadáveres, los grupos etarios afectados (hembras en buena condición corporal), hacen presumir que este tipo de intoxicación alimentaria está presente en otras áreas del país elevando los indicadores de mortalidad, por lo que se hace necesario desarrollar estrategias de diagnóstico, entre las cuales se pueden considerar las desarrolladas en este trabajo.

#### **2.4.2.2 *Clostridium sordellii***

De las nueve bacterias caracterizadas molecularmente, tres (33,3%) correspondieron a *Clostridium sordellii*, dos de ellas (22,2%) aisladas en el municipio de Ubaté Cundinamarca y la otra (11,1 %) en el municipio de Puerto López departamento del Meta. Estos aislamientos coinciden con lo encontrado en Costa Rica (Gamboa *et al.*, 2005) en donde *C. sordellii* (42 %) fue la bacteria más frecuente presente en los suelos.

La caracterización molecular de los aislamientos a partir de muestras de suelo de *C. sordellii* DOO5556, en el municipio de Ubaté, Cundinamarca; *C. sordellii* DOO5557, en el municipio de Puerto López, Meta; *C. sordellii* del Laboratorio comercial, Armero, Tolima y *C. sordellii* DOO5561, del municipio de Ubaté, Cundinamarca, permitió establecer las distancias filogenéticas más pequeñas demostrando la importancia de dichas bacterias en estas zonas. *C. sordellii* produce dos principales factores de virulencia, la toxina hemorrágica y la toxina letal (LT), que están causalmente relacionadas con diarrea y enterotoxemia en animales domésticos y con gangrena gaseosa; además la exposición a la toxina hemorrágica induce actividad hemorrágica, mientras que la exposición a LT causa edemas severos (Just *et al.*, 1996).

Las primeras cepas de *C. sordellii* se aislaron de heridas infectadas en humanos. Posteriormente, el organismo fue implicado como causa de muerte de ganado en Nevada (Hall, 1929). MacLennan (1962) lista *C. sordellii* como uno de seis clostridios involucrados en gangrena gaseosa histotóxica, ligada a infecciones. Más recientemente, infecciones fatales causadas por *C. sordellii* se han observado en asociación con cirugías obstétricas, incisiones (episiotomía) (Hatheway, 1990).

La bacteria *C. sordellii* aislada por un laboratorio comercial en el municipio de Armero en un brote epidémico de mortalidad en la década del noventa y que fue incluida en un biológico utilizado para prevenir la enfermedad, fue caracterizada molecularmente en este trabajo y demuestra la cercanía filogenética con los *C. sordellii* aislados en otras zonas geográficas, indicando que las cepas tropicales tienen el mismo origen filogenético.

### **2.4.2.3 *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum***

En este estudio también se aisló *Clostridium chauvoei* en el municipio de Nemocón (11,1 %) departamento de Cundinamarca. Esta bacteria es causante de la enfermedad conocida con el nombre de "Pierna Negra", la cual afecta bovinos de cualquier edad, caracterizada por fiebre, depresión, cojeras y altos índices de mortalidad. Esta bacteria tiene similitud filogenética con *Clostridium septicum*, el cual produce síntomas clínicos similares a *C. chauvoei*, lo que indica que dichas bacterias actúan como agentes causales de parte de la mortalidad encontrada (Kuhnert *et al.*, 1996). *Clostridium chauvoei*, presenta reacción cruzada con *Clostridium septicum*, con el que tiene alta similitud inmunogénica (Kojima *et al.*, 2000).

En Zambia (África), Mudenda *et al.*, (2000), realizaron un estudio retrospectivo de enfermedades del ganado en producción extensiva, y encontraron que en suelos donde se aislaron *C. septicum* y *C. chauvoei*, hubo presencia de edema maligno y de pierna negra en bovinos. Se tomaron muestras de suelo de 5 regiones y observaron la presencia de Clostridios utilizando metodologías convencionales; aislaron *C. septicum* y *C. chauvoei* los cuales se caracterizaron por medio de inmunofluorescencia directa (IFA). El aislamiento de Clostridios a partir de suelo es de gran importancia ya que demostraron que en los sitios donde aislaron bacterias había relación con casos clínicos en bovinos documentados. Por lo tanto el análisis de los suelos y su correcta localización fue de gran utilidad para implementar planes de vacunación y de prevención.

Kuhnert *et al.* (1996), determinaron las secuencias de los genes 16S rADN (genes *rrs*) de *Clostridium chauvoei* y de *Clostridium septicum*, y encontraron una gran relación filogenética entre los dos. Amplificaron un fragmento de 1507 pb localizado en el gen *rrs*;

el análisis de similaridad de las secuencias reveló la estrecha relación filogenética de *C. chauvoei* y *C. septicum* y se encontró que 99,3% de los nucleótidos en los genes de *C. chauvoei* y *C. septicum* son iguales.

Similares resultados fueron encontrados en el presente trabajo donde las bacterias *C. septicum* laboratorio comercial y *C. chauvoei* laboratorio comercial presentaron una identidad de la secuencia de (98,6%), lo que señala una estrecha relación filogenética, pero dificulta la identificación exacta de cualquiera de ellas a partir de métodos convencionales por lo que las metodologías utilizadas en este trabajo se podrían convertir en una buena alternativa de diagnóstico.

Los métodos convencionales para la detección de *Clostridium* patógenos en muestras clínicas o en muestras de alimentos se basan en técnicas de cultivo bacteriano (Peterson *et al.*, 1996), cultivos celulares para evaluar la citotoxicidad de las toxinas producidas por éstas bacterias (Delmee *et al.*, 2005), o bioensayos en ratones (Lindstrom *et al.*, 2001). Sin embargo, estos ensayos requieren mucho tiempo, ya que se necesitan varios días para obtener resultados completos. Como consecuencia, dichos métodos no brindan resultados oportunos afectando el desempeño o la vida de los pacientes. Recientemente, se ha demostrado la utilidad que tiene el PCR múltiplex para la detección de *Clostridium spp.*, lo que se constituye en una alternativa rápida de identificación de bacterias patógenas (Janvilisri *et al.*, 2010).

En la literatura se reportan artículos que indican el uso de técnicas como PCR para la identificación y diferenciación de clostridios. Sasaki *et al.*, en el año 2000, reportan el desarrollo de PCR para detectar DNA de *Clostridium chauvoei* usando primer derivados de 16S rADN. Sus resultados fueron demostrados en 37 cepas de *Clostridium* y en 3 cepas de otros géneros, sugiriendo que esta prueba puede ser utilizada para la identificación de *Clostridium chauvoei* (Sasaki *et al.*, 2001), situación comparable a lo descrito en este trabajo.

### **2.4.3 Variables climatológicas y del suelo**

Fue posible establecer tendencias de las frecuencias de aislamientos obtenidos en los diferentes municipios con variables climatológicas como temperatura y precipitación; los

municipios de Puerto López y Mariquita presentaron valores superiores de precipitación y de temperatura ambiental y en ellos se aislaron un mayor número de bacterias corroborando lo señalado por Escobar (2009) y Mandigan *et al.* (2000) quienes indicaban respectivamente que el exceso de agua en el suelo suele causar encharcamiento y pérdida de oxígeno en los capilares del suelo lo cual hace que disminuyan los microorganismos aerobios y aumenten los anaerobios y la temperatura es uno de los factores ambientales que afecta el crecimiento y la supervivencia microbiana.

La diversidad de clostridios en el suelo está asociada con la geografía de la zona, el pH, el clima, el tipo de suelo y la presencia de otros microorganismos, pero a la vez tienen la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones medioambientales pues tienen la facultad de esporular. En Costa Rica, Gamboa *et al.*, procesaron 117 muestras de diferentes regiones de las cuales aislaron 1945 cepas de clostridios (en su mayoría *C. sordellii* y *C. perfringens*). El rango de pH de los suelos fue de 3.8 - 8.2 los cuales no mostraron diferencias significativas en las zonas geográficas estudiadas (Gamboa *et al.*, 2005), hallazgos similares a los encontrados en este trabajo.

#### **2.4.4 Otras consideraciones**

Aunque los dendogramas realizados se obtuvieron por dos métodos diferentes, los resultados son similares. En ambos dendogramas se forman grupos diferenciados, en los cuales se demuestra que las bacterias aisladas corresponden a *Clostridium* y muestran algunas diferencias al alinearlas con las secuencias de las bacterias obtenidas en el GenBank (el valor de bootstrapping es de 100%). La técnica de PCR se puede recomendar como una alternativa para el diagnóstico de estas enfermedades, ya que es más sensible que la caracterización bioquímica.

Se hace necesario implementar estudios epidemiológicos que permitan dar a conocer las bacterias actuantes en las zonas de riesgo con el fin de establecer programas de prevención y control en las épocas más indicadas. Se hace necesario trabajar en conjunto con los laboratorios productores de biológicos para que promuevan el desarrollo de dichos productos con aislamientos locales o por lo menos que se verifique la efectividad de las cepas utilizadas para el control de las enfermedades en campo.

Con base en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad en zonas de riesgo las autoridades encargadas de la sanidad animal puede implementar medidas de prevención y ajustar sus programas preventivos vacunales para que realmente se reflejen en disminuir los indicadores de mortalidad.





# **3. Epidemiología de clostridios patógenos asociados a los suelos, causantes de mortalidad en bovinos, en zonas ganaderas de Colombia**

## **3.1 Introducción**

La presencia de brotes epidémicos de mortalidad en el ganado bovino ocasionados por clostridios, producen pérdidas económicas importantes para los sistemas de producción de las sabanas tropicales colombianas y son un reflejo del desequilibrio ambiental que a través de los años se ha venido observando en el país. Dentro del concepto de inspección del rebaño (Blood, Radostits & Henderson, 1986), la presencia de un brote de mortalidad es en últimas la evidencia de algún tipo de desequilibrio ecológico en la finca o región; dichos cambios se manifiestan en las variables climáticas (veranos prolongados, inviernos más fuertes) y se reflejan en condiciones favorables para que los agentes patógenos tengan mejores condiciones (temperatura y humedad) para multiplicarse y afectar las poblaciones bovinas (Ortiz & Benavides, 2004). Por lo tanto las soluciones a largo plazo deben considerar aspectos de manejo, nutrición, genética y de inmunidad de la población (Ortiz & Benavides, 2004).

Dada la corta duración de los procesos desencadenados por clostridios a los bovinos, generalmente las lesiones desarrolladas, tanto macroscópicas, como microscópicas, son sutiles; por lo tanto, la diferenciación de las causas requiere de una gran capacidad de observación del personal que convive con el ganado, sumado a apropiados exámenes de necropsia y de histopatología; adicionalmente de la recolección de evidencia epidemiológica, sobre el cuadro clínico y patrones demográficos, temporales y espaciales de ocurrencia de la enfermedad (Thrusfield, 2005).

Los brotes epidémicos de mortalidad se hacen alarmantes ya que los animales afectados son animales en muy buena condición corporal, los cuales no evidencian signos y síntomas de alguna patología; de un momento a otro sufren la enfermedad que se presenta de curso agudo matando los animales sin que se encuentre explicación (Benavides; Ortiz & Benavides, 2000).

Actualmente se conocen más de 100 especies de *Clostridium*, de las cuales, trece especies son consideradas patógenas. En condiciones adversas tienen la habilidad de convertirse en formas resistentes, conocidas como esporas, formas potencialmente infectantes durante largos periodos de tiempo. Son ubicuas, están presentes en el tracto intestinal de muchas especies animales y se asocian a los suelos de las zonas en pastoreo (Lobato & Assis, 2005).

Por estas razones y dada la complejidad biológica y los principales aspectos de la epidemiología de los organismos asociados con el suelo, se destaca la necesidad de utilizar un abordaje epidemiológico cuando se requiera adelantar investigaciones sobre la relación de causalidad de estos microorganismos asociados a casos de enfermedad y o mortalidad en el hombre, pero particularmente en animales domésticos (Seifert *et al.*, 1996).

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones y con el ánimo de recolectar evidencia epidemiológica, se desarrolló un estudio de corte para investigar la prevalencia de clostridiosis en bovinos en cuatro municipios (Mariquita, Puerto López, Nemocón y Ubaté) de los departamentos de Tolima, Meta y Cundinamarca. El trabajo se basó en la aplicación de una encuesta epidemiológica estructurada (ver anexo 1) a productores de las zonas mencionadas, actividad que se llevó a cabo durante el año 2007.

## **3.2 Materiales y métodos**

El criterio de inclusión de los departamentos y de los municipios seleccionados se basó en los reportes de casos de mortalidad dados por productores de la zona y por los laboratorios productores de biológicos, quienes advertían que en sus zonas ganaderas se estaban presentando brotes epidémicos de mortalidad bovina a pesar de que

utilizaban productos biológicos para inmunizar sus ganados. Dichos reportes se verificaron con los diagnósticos hechos por el Instituto Colombiano Agropecuario en los centros de diagnóstico y referenciados en el Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica Colombia, sanidad animal. Para el año 2006, se indicó que el total de predios afectados por brotes de mortalidad ocasionados por clostridios (carbón sintomático y otras Clostridiosis) fueron 54, con un total de predios a riesgo de 3431 (vigilancia pasiva) (Orjuela *et al.*, 2006; 2007).

El criterio de selección de las fincas se basó en la ubicación geográfica, es decir que los predios estuvieran ubicados en las zonas de riesgo indicadas y se verificaron con los diagnósticos realizados por el ICA o por los laboratorios para que fueran incluidos como casos positivos. El criterio de exclusión de los predios fue dirigido a fincas que no fueran explotaciones ganaderas, es decir que se dedicaran exclusivamente a la agricultura; un factor adicional tenido en cuenta fue el deseo de colaboración del ganadero. La selección de las fincas se realizó mediante un muestreo aleatorio a partir de los listados de las bases de datos de los censos e inventarios de predios de los Comités de Ganaderos de las zonas de influencia, los cuales se originaron en los ciclos de vacunación contra fiebre aftosa (Fondo Nacional del Ganado, 2006; Martin *et al.*, 1997).

Es claro que en este estudio no se pretende demostrar la causalidad de los factores ya que no hubo seguimiento de los animales (antecedencia) y sus resultados deben ser interpretados con cautela, debido a que la información obtenida se originó de encuestas de opinión aplicadas a los propietarios de las fincas incluidas y por esta razón, está sometida a la influencia de la veracidad de los datos aportados, por las creencias y percepciones que ellos tienen acerca del problema y por la información sobre el tema que han introducido laboratorios e instituciones asistenciales y de gobierno.

El objetivo de este estudio de corte (Cross sectional) radicó en permitir un acercamiento inicial a la asociación entre un factor de riesgo y un efecto (predios afectados por mortalidad ocasionada por clostridios), si bien, dicha asociación puede no ser causal. La característica fundamental en este diseño, consistió en averiguar en los predios la presencia o la ausencia de mortalidad por esta causa y relacionarla con los factores de riesgo hipotéticos en el mismo momento. Los estudios de corte permiten un acercamiento

a la enfermedad, configurando una hipótesis de causalidad que posteriormente deberá ser sometida a prueba mediante otro tipo de estudios (analíticos o de intervención).

En este estudio de corte existen dos grupos y en ellos se observa la presencia o no, de los factores de riesgo, que se supone tiene relación con la patología en estudio (clostridiosis) en el momento en que se realiza la investigación.

Mediante las preguntas formuladas en las encuestas se determinó la presencia o no de clostridiosis en los predios involucrados situación que se verificó visitando los potreros donde se enterraron los animales si la finca se incluía como positiva y se verificaba el número de animales muertos. La medida de frecuencia que se obtuvo a partir del análisis fue la prevalencia para fincas y para animales, dado que no hubo seguimiento de la población en estudio, tan sólo se mide cuales eran los predios y los animales afectados por clostridiosis en el momento del estudio.

Una vez seleccionados los predios en el muestreo, recolectadas las muestras y la información pertinente, se consolidaron y depuraron las bases de datos y se procedió a su procesamiento, análisis y clasificación. El análisis se realizó partiendo del efecto, conformando dos grupos, uno con individuos que presentaron el efecto (predios afectados por clostridiosis) y otro grupo con individuos que no presentaron el efecto (predios no afectados por clostridiosis).

El tamaño de la muestra se determinó siguiendo la metodología para estimar la prevalencia de una enfermedad en poblaciones grandes, los resultados se observan en la tabla 2.1. (Otte, 1991; De Blas *et al.*, 1998):

$$n = \{p \times (100 - p) \times z^2\} / EE^2, \text{ ó}$$

$$n = \{p \times q \times z^2\} / EE^2$$

n=Población desconocida  
p= 12  
Donde q = 100 - p; q = 88  
 $12 \times 88 \times 1.96^2 / 5^2 = 165$  Predios,  
Confianza = 1.96  
Precisión absoluta del estimado = 5%

**Tabla 3 1** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Estimación del tamaño de la muestra, partiendo de poblaciones grandes. 2007

Tamaño de la población	3431
Prevalencia esperada	12
Error aceptado	5
Nivel de confianza	95
Fracción de muestreo	4,81
Tamaño de la muestra	165

### 3.2.1. Población estudiada

El levantamiento epidemiológico del estudio se desarrolló tomando como marco de muestreo el total de hatos de la zona de influencia que eran 3431 (Fondo Nacional del Ganado., 2006). En el municipio de Mariquita; departamento del Tolima 845 hatos; en el municipio de Puerto López, departamento del Meta 875 hatos; en el departamento de Cundinamarca, municipio de Nemocón 848 hatos y municipio de Ubaté 863 hatos. Utilizando la fracción de muestreo de 4,81, se calculó el tamaño de la muestra para cada municipio, resultando 41 fincas a estudiar en el municipio de Mariquita, 42 fincas en el municipio de Puerto López, 41 fincas en el municipio de Nemocón y 41 fincas en el municipio de Ubaté para un total de 165 fincas. Como unidad de muestreo se estableció cada hato. De acuerdo a estudios realizados previamente (Ortiz, 2000) se estableció una prevalencia para hatos de 12%.

La información se obtuvo en las fincas, entrevistando a los propietarios, arrendatarios ó mayordomos. Se aplicó el formato de encuesta estructurada (Thrusfield, 2005) que se presenta en el Anexo 7, la cual constaba de 40 preguntas, dentro de las cuales existía una pregunta clave de categorización (+/-) para definir la presencia o no, de casos de clostridiosis. La pregunta específicamente se planteó de la siguiente forma: “En bovinos se presentan enfermedades agudas que producen muertes repentinas, que afectan generalmente animales en muy buena condición corporal. ¿En ésta finca se han presentado casos de muertes de animales con éstas características?” (variable dependiente). Esta pregunta se cruzó con las variables cualitativas (variables independientes), obtenidas en la encuesta para obtener de esta forma los resultados estadísticos. Simultáneamente con la aplicación de la encuesta se georeferenciaron los potreros donde habían muerto los animales, utilizando para ello navegador personal (Garmin

eTrex Vista® HCx), con el cual se tomaron los datos de coordenadas (altitud, longitud) y la altura sobre el nivel del mar (msnm). Las fincas negativas también se georeferenciaron.

Las variables que se trabajaron se agruparon en temas generales que incluyeron identificación del predio, información general de la explotación; descripción de la finca, manejo de praderas; población animal, manejo animal, plantas tóxicas; pesticidas, manejo sanitario.

### **3.2.2. Análisis estadístico**

El análisis de la información recogida en el campo consistió en categorizar las variables de la encuesta en forma de preguntas y posteriormente se analizaron por medio de listados, frecuencias y tablas estadísticas, seleccionando, listando y priorizando algunos criterios, para calcular frecuencias y cruces de variables. Los listados se utilizaron para depurar inicialmente la información. Una vez se obtuvo la base de datos depurada se realizó un análisis de frecuencia en el cual se contó cada categoría para una variable especificada y se obtuvieron los resultados absolutos y frecuencias relativas para cada una. El análisis determinó primero el número de casos, seguido del porcentaje acumulado. Si el campo era numérico se presentó también la suma, promedio y desviación estándar (Londoño, 1996; Dean *et al.*, 1992).

Se determinaron las proporciones de fincas afectadas por clostridiosis expuestas a un factor y se compararon con las proporciones de fincas afectadas por Clostridiosis no expuestas al factor (Otte, 1991; De Blas *et al.*, 1998).

Con los resultados obtenidos se procesó la información en forma analítica. Las variables categóricas se analizaron utilizando la prueba  $\chi^2$  de asociación (Chi<sup>2</sup> de asociación), con el objetivo de determinar la asociación entre los grupos (Martínez & Martínez, 1997; Dean *et al.*, 1992, De Blas *et al.*, 1998). Para estimar el riesgo y determinar la significancia de una asociación entre la muerte de bovinos y un factor causal hipotético, se utilizó la Razón de Prevalencias (RP) (Thrusfield, 2005; Dean *et al.*, 1992).

De esta forma el conjunto total de individuos se dividió en cuatro grupos estando representado el número de hatos de cada grupo por las letras A, B, C y D, tal como se indica en la tabla 3-2:

**Tabla 3 2** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Tabla de contingencia 2x2 para análisis de información epidemiológica. 2007

	EXPUESTOS		
	SI	NO	TOTAL
Enfermos	A	B	M1=A+B
Sanos	C	D	M0=C+D
TOTAL	N1=A+C	N0=B+D	T=A+B+C+D

Siendo:

A, B, C, D= número de hatos en cada grupo

N1, N0= número total de hatos expuestos / no expuestos

M1, M0 = número total de hatos enfermos / sanos

T= número total de hatos

La asociación entre enfermedad y exposición se expresó por medio de la Razón de Prevalencias que se calculó a partir de la tabla de contingencia 2x2, como:

$$RP= (A/A+C)/ (B/B+D) = A (B+D)/B (A+C)$$

A pesar de que el “Odds Ratio” suele citarse en los estudios transversales, proporciona un valor sobreestimado de la asociación entre el factor y la enfermedad (especialmente en enfermedades no esporádicas). Por tanto, la Razón de Prevalencias fue el parámetro preferido en este estudio transversal (Silva, 1995; Londoño, 1996; Martin *et al.*, 1997, Otte, 1991; De Blas *et al.*, 1998).

### 3.2.3 Variables bioclimáticas

Para relacionar los casos de mortalidad con las variables bioclimáticas se utilizó el software Diva-Gis® (<http://www.diva-gis.org>). El software viene con un archivo de clima (World Clim) por defecto para todo el mundo excepto para los cuerpos de

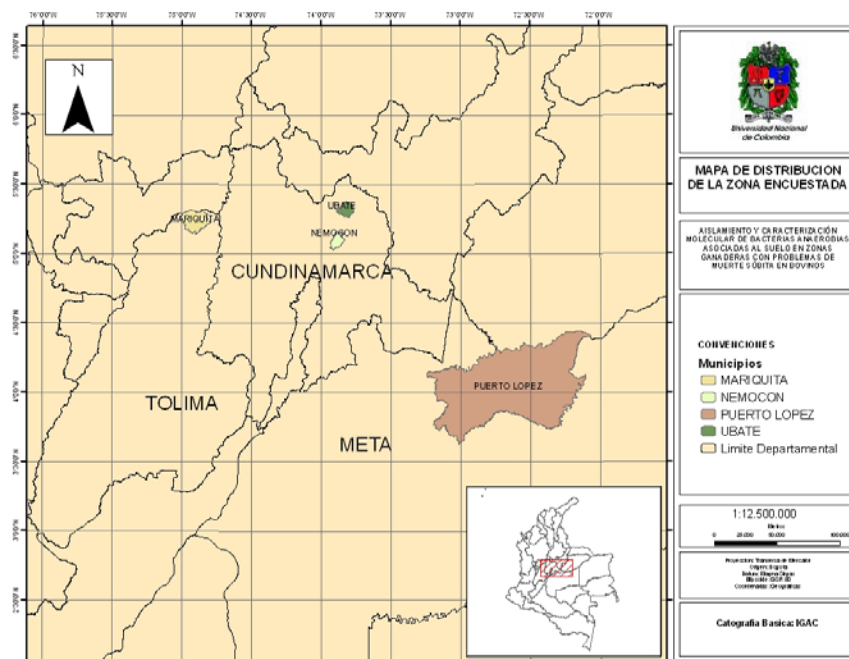
agua mayores (océanos) y para la Antártida. Estos datos son almacenados en un formato especial (archivos CLM) (Hijmans *et al.*, 2004; Hijmans *et al.*, 2005).

Los datos climáticos están incluidos para los climas presentes y también para climas futuros. Los datos fueron estimados a partir de un número de modelos climáticos diferentes y corridas de modelos provistos por el Intergovernmental Panel on Climate Change Data Distribution Center (1999). Estos dataset originales fueron todos remuestreados (interpolados) a una cuadrícula de diez minutos (Hijmans *et al.*, 2004; Hijmans *et al.*, 2005).

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1 Distribución geográfica del área encuestada

En la figura 3-1 se indican las zonas geográficas incluidas.



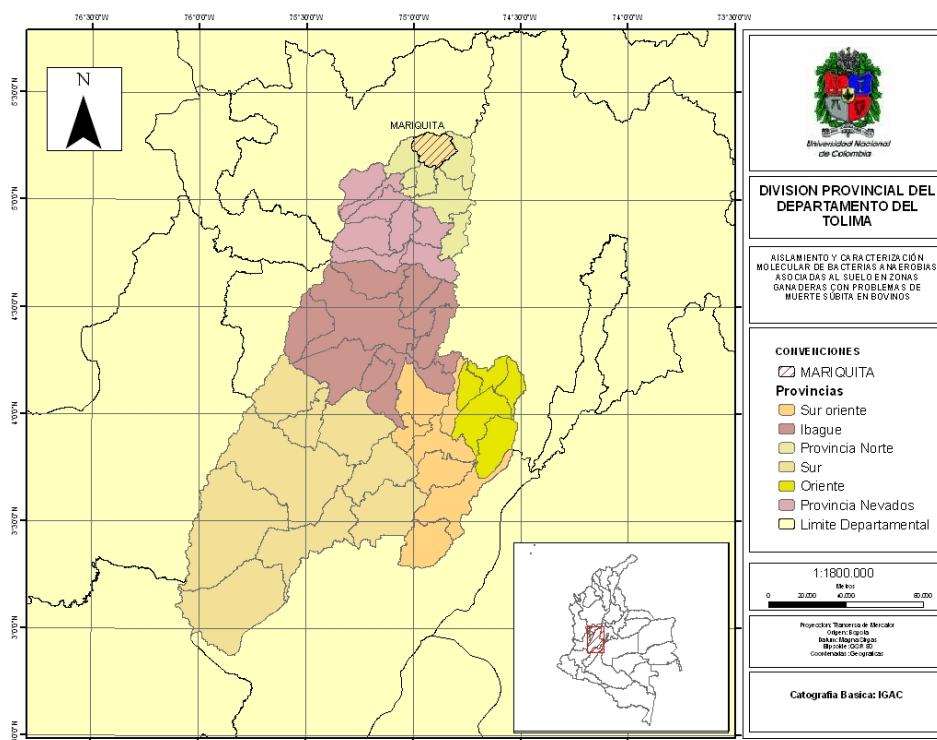
**Figura 3 1** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Departamento de Cundinamarca, municipios de Ubaté y Nemocón; Departamento del Meta, municipio de Puerto López y Departamento del Tolima municipio de Mariquita. Se indica en colores diferentes los municipios seleccionados en los tres departamentos. 2007



### 3.3.1.1 Departamento de Tolima, municipio de Mariquita

El departamento de Tolima está dividido en 47 municipios, 30 corregimientos, 217 inspecciones de policía, así como, numerosos caseríos y sitios poblados. Tiene una extensión de 23.992 km<sup>2</sup>, con un área urbana de 103,2 km<sup>2</sup> y un área rural de 23.888,31 km<sup>2</sup> (Figura 3.2). En el Departamento del Tolima se agruparon sus municipios en las siguientes Provincias: Norte, Oriente, Sur, Ibagué, Suroriente y Nevados (Hijmans *et al.*, 2004; Malagón *et al.*, 1988).

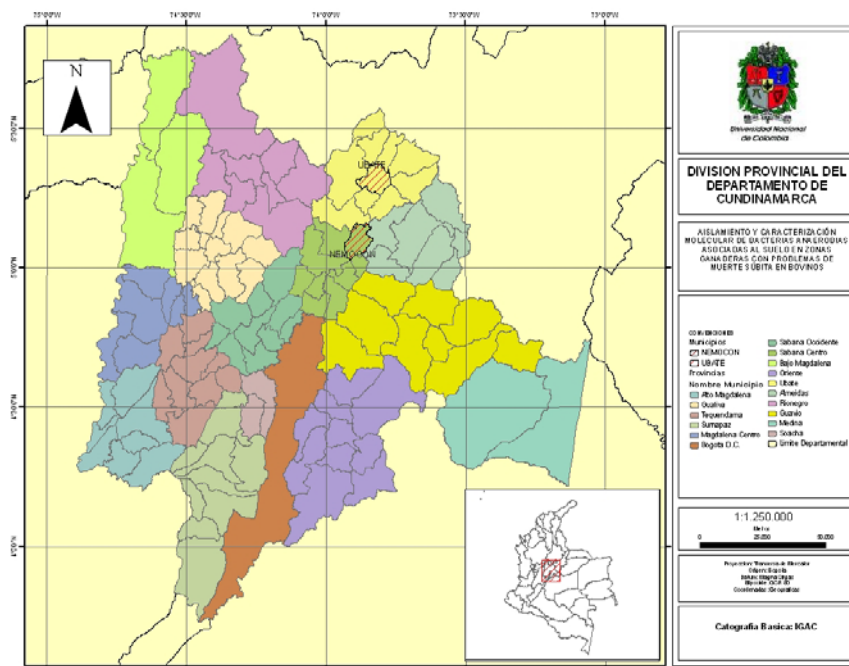
El municipio de Mariquita se ubica en la provincia Norte y limita con los Municipios de Honda, Armero, Guayabal y Fresno. La Extensión total del municipio de Mariquita es de 296,4 Km<sup>2</sup> con una extensión del área urbana de 3,95 Km<sup>2</sup>; la extensión del área rural es de 292,42 Km<sup>2</sup>. La altitud promedio es de 495 metros sobre el nivel del mar, con un rango de temperatura promedio al año de 19,7 – 29,5° C y una precipitación promedio anual de 2.726 mm (Hijmans *et al.*, 2004; Malagón *et al.*, 1988).



**Figura 3 2** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Distribución geográfica departamento del Tolima. Provincias. Se indica en líneas rojas el municipio de Mariquita ubicado en la Provincia Norte del departamento. Epidemiología de brotes de mortalidad bovina en zonas ganaderas de Colombia. 2007

### 3.3.1.2 Departamento de Cundinamarca, Municipios de Nemocón y Ubaté.

El departamento de Cundinamarca tiene una extensión de 24.210 Km<sup>2</sup> que corresponden al 2,1% del territorio colombiano, limita al norte con Boyacá, al occidente con Caldas y Tolima, al oriente con Boyacá y Meta y al sur con Meta, Huila y Tolima. La fisiografía del departamento corresponde en su mayoría a la Cordillera Oriental, en la que alcanza alturas de 3.500 msnm en los páramos de Sumapaz y Chingaza y desciende a 300 msnm en las riveras del Río Magdalena en su flanco occidental (figura 3.3). Se destaca la Sabana de Bogotá a 2.600 msnm situada en la zona central como el lugar más poblado con el 60% de los habitantes del departamento. Al costado oriental se cruza la cordillera hasta descender a los Llanos Orientales. Cuenta con 116 municipios reunidos en 15 provincias (Hijmans *et al.*, 2004; Malagón *et al.*, 1988).



**Figura 3 3** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Distribución geográfica departamento de Cundinamarca. Provincias. Se indica en líneas rojas los municipios de Nemocón, Provincia Sabana Centro y el Municipio de Ubaté, Provincia Ubaté, zona de influencia del estudio epidemiológico. Epidemiología de brotes de mortalidad bovina en zonas ganaderas de Colombia 2007

El municipio de Nemocón, área de influencia de este estudio, se encuentra localizado en la provincia de Sabana Centro del Departamento de Cundinamarca y pertenece a la cuenca alta del río Bogotá. El relieve pertenece a la Sabana de Bogotá, en su mayoría plano con algunas inclinaciones moderadas. La mayor parte del territorio es de clima frío. La precipitación media anual 630 mm y un número promedio mensual de 153 días con precipitación de al año. El periodo más lluvioso va de septiembre a diciembre y el más seco de diciembre a marzo. Limita por el norte con el Municipio de Tausa, oriente con el Municipio de Suesca, Sur con los Municipios de Gachancipá y Zipaquirá y Occidente con el Municipio de Cogua, y los ríos Neusa y Checua. La extensión total del municipio es de 9.811 hectáreas. La extensión del área urbana es de 61,2 hectáreas. La extensión del área rural es de 9.750 hectáreas. La altura sobre el nivel del mar es de 2.585 metros, con temperatura media de 12,8° Centígrados (Hijmans *et al.*, 2004; Malagón *et al.*, 1988).

Ubaté es un municipio del departamento de Cundinamarca, cuenta dentro de su división administrativa con un casco urbano y un sector rural conformado por 9 veredas. Su nombre oficial es “Villa de San Diego de Ubaté” en honor a su fundador. Esta localizado en la parte norte de la Sabana de Bogotá. La Provincia limita al Norte; Noroeste y Noreste con el Departamento de Boyacá, al Occidente con la Provincia de Rionegro; al Sur con la Provincia de Sabana Centro y al Sureste y Oriente con la provincia de Almeidas.

Su extensión es de 102 km<sup>2</sup> con una extensión urbana de 40 hectáreas. La altitud de la cabecera municipal es de 2.556 msnm, con una temperatura media de 14 ° C.

### **3.3.1.3 Departamento del Meta Municipio de Puerto López**

El Departamento del Meta está situado en la parte central del país, en la región de la Orinoquia. Está dividido en 29 municipios los cuales se distribuyen en cuatro regiones naturales: Ariari, Capital, Piedemonte y Río Meta; 115 inspecciones de policía, así como, numerosos caseríos y sitios poblados (figura 3.4).

Cuenta con una superficie de 85.635 Km<sup>2</sup> lo que representa el 7,5% del territorio nacional. Limita por el Norte con el Departamento de Cundinamarca y los ríos Upía y

Meta que lo separan del departamento del Casanare; por el Este con el departamento del Vichada, por el Sur con el Departamento del Caquetá y el río Guaviare que lo separa del departamento de Guaviare; y por el Oeste con los Departamentos de Huila y Cundinamarca (Hijmans *et al.*, 2004; Malagón *et al.*, 1988).

El municipio de Puerto López seleccionado para este estudio, pertenece a la unidad bioclimática de la megacuenca de sedimentación de la Orinoquía. El área central del municipio tiene unas lluvias que promedian los 2.100 – 2.300 mm/año distribuidos en aproximadamente 120 días, donde los meses de junio y julio son los más lluviosos, y enero y febrero los más secos. La temperatura promedio está entre los 26 ° C y 26,5 ° C, siendo febrero y marzo los meses más cálidos con valores entre los 27 ° C y 28 ° C y junio y julio los más fríos con valores promedios de 24 ° C.

Las temperaturas máximas absolutas han superado los 38,5 ° C y las mínimas absolutas han descendido hasta los 14 ° C (Hijmans *et al.*, 2004; Malagón *et al.*, 1988). Limita al Norte con los municipios de Cumaral, Cabuyaro y el departamento de Casanare; al oriente con el municipio de Puerto Gaitán; al sur con el municipio de San Martín, y al occidente con los municipios de San Carlos De Guaroa y Villavicencio. La extensión total es de 6.740 km<sup>2</sup> (hasta las márgenes de los ríos que sirven de limite) y 6.898 Km<sup>2</sup> (incluyendo los cuerpos de agua). La extensión del área urbana es de 9,5 Km<sup>2</sup>. La extensión del área rural es de 6.730,5 Km<sup>2</sup>. La altitud de la cabecera municipal es de 17 msnm (Hijmans *et al.*, 2004; Malagón *et al.*, 1988).

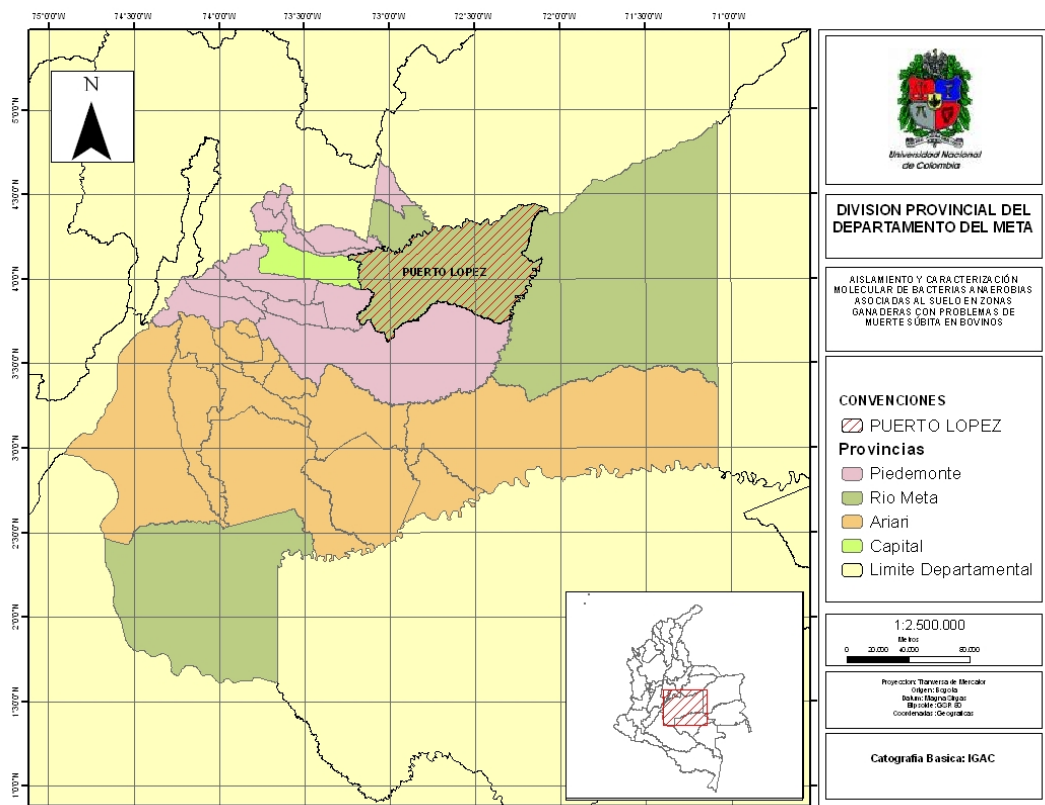
### **3.3.2. Descripción de los predios encuestados**

Se encuestaron 165 predios. En el departamento del Tolima, municipio de Mariquita, 41 predios. En el departamento de Cundinamarca 82 predios, 41 predios en el municipio de Nemocón y 41 predios en el municipio de Ubaté. En el departamento del Meta, municipio de Puerto López 42 predios.

El total de hectáreas cubiertas fue de 20.068,3 en las 165 fincas; el promedio del tamaño de las fincas por hectárea fue de 121,62. Los resultados estratificados por departamento y por municipio se observan en la tabla 3.3.

El promedio de tamaño por hectárea de las fincas encuestadas presentó diferencias significativas al comparar los municipios ( $p < 0,05$ ), conformando un grupo los municipios de Ubaté y Nemocón, un segundo grupo el municipio de Mariquita y un tercer grupo el municipio de Puerto López.

El total de fincas menores de 40 ha fue de 89 (53,93%), de las cuales 20 (12,1%) resultaron positivas a clostridiosis; el mayor porcentaje de positividad se presentó en el municipio de Nemocón (4,8 %). No se encontraron diferencias significativas al comparar las fincas positivas y negativas. La prevalencia de punto para fincas menores de 40 ha afectadas por clostridiosis fue 22,4%.



**Figura 3 4** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Distribución geográfica departamento del Meta. Regiones Naturales. Se indica en líneas rojas el municipio de Puerto López, Región Natural Río Meta, zona de influencia del estudio epidemiológico. Epidemiología de brotes de mortalidad bovina en zonas ganaderas de Colombia. 2007

Las fincas de menor tamaño (menores de 40 ha) se encontraron principalmente en el departamento de Cundinamarca municipio de Nemocón (18,8 %). El total de fincas entre

41-100 ha fueron 33 (20%), de las cuales 10 (6,06%) resultaron positivas a mortalidad en bovinos; el mayor porcentaje de positividad se presentó en los municipios de Mariquita (2,4%) y Nemocón (2,4%), el menor en Ubaté (1,2%). En el municipio de Puerto López no se presentaron fincas con mortalidad bovina en este estrato. Al comparar fincas con mortalidad y fincas sin mortalidad se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). La prevalencia de punto para fincas entre 41 – 100 has, afectadas por brotes de mortalidad fue 30,3%.

**Tabla 3 3 Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Hectáreas/predio (promedio) de las fincas entrevistadas en los municipios de Mariquita, Puerto López, Nemocón y Ubaté; distribución porcentual de fincas según su tamaño. Comparación fincas positivas y negativas a mortalidad bovina. 2007**

Factor		Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté	Total
		Tolima	Cundinamarca	Meta	Cundinamarca	
Número de fincas	Pos	17 (10,3%)	12 (7,27%)	6 (3,6%)	10 (6,06%)	45 (27,3%)
	Neg	24 (14,5%)	29 (12,1%)	36 (21,8%)	31 (18,8%)	120 (72,7%)
Total ha	Pos	1490	291	3803	609	6193
	Neg	4971	783,5	7242	878,8	13875,3
Tamaño/ha (Prom)	Pos	87,67	24,25	633,83	60,9	137,6
	Neg	207,1	27,01	201,16	201,16	115,63
p		0,26	0,73	0,045	0,037	0,34
Rango (ha)		3,5 – 2,0 <sup>ab</sup>	1 – 80 <sup>a</sup>	3,0 – 2.715 <sup>b</sup>	2,0 - 210 <sup>a</sup>	1,0 – 2.715
Distribución porcentual de fincas según tamaño		Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté	p
< 40 ha	Pos	6 (3,6%)	8 (4,8%)	1 (0,6%)	5 (3%)	0,69
	Neg	10 (6,06%)	23 (13,9%)	10 (6,06%)	26 (15,8%)	
41-100 ha	Pos	4 (2,4%)	4 (2,4%)	0 (0%)	2 (1,2%)	0,4668
	Neg	5 (3%)	6 (3,6%)	8 (4,8%)	4 (2,4%)	
> 100 ha	Pos	7 (4,24%)	0 (0%)	4 (2,4%)	3 (1,8%)	0,86
	Neg	9 (5,5%)	0 (0%)	19 (11,5%)	1 (0,6%)	

Pos= Fincas Positivas a mortalidad. Neg= Fincas negativas a mortalidad. Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p= nivel de significancia.

El total de fincas mayores de 100 ha fue de 43 (26,6%), de las cuales 14 (8,5 %) resultaron positivas a mortalidad, siendo el municipio de Mariquita el que presenta un mayor porcentaje de positividad (4,24%). Al comparar fincas positivas y negativas a brotes epidémicos de mortalidad no se encontraron diferencias significativas. La prevalencia de punto para fincas mayores de 100 ha afectadas por mortalidad fue 32,5%.

Las fincas con mayor tamaño se observaron en el Departamento del Meta, municipio de Puerto López.

Al comparar el tamaño por hectárea de las fincas positivas y negativas a mortalidad se encontraron diferencias significativas en los municipios de Puerto López ( $p=0,045$ ) y Ubaté ( $p=0,037$ ). En el municipio de Puerto López las fincas positivas a mortalidad resultaron ser de mayor tamaño y en Ubaté las fincas positivas a mortalidad resultaron ser de menor tamaño. Al comparar los resultados sin estratificar por municipio no se encontraron diferencias significativas entre fincas positivas y negativas a mortalidad bovina ( $p=0,34$ ).

**Tabla 3 4** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Topografía de las fincas clasificadas en planas, onduladas. Se indica cuales son inundables y se relacionan con la positividad a mortalidad bovina. 2007

Características de los Predios		Mariquita			Nemocón			Puerto López			Ubaté		
		POS CLOS	NEG CLOS	p	POS CLOS	NEG CLOS	p	POS CLOS	NEG CLOS	p	POS CLOS	NEG CLOS	P
Planas	SI	7	5	0,14	8	20	0,58	4	35	0,048	10	30	0,75
	NO	10	19		4	9		2	1		0	1	
Onduladas	SI	10	19	0,14	4	9	0,58	2	1	0,048	0	1	0,75
	NO	7	5		8	20		4	35		10	30	
Inundables	SI	3	7	0,32	5	12	0,62	2	16	0,48	9	25	0,44
	NO	14	17		7	17		4	20		1	6	

Pos= Fincas Positivas a mortalidad. Neg= Fincas negativas a mortalidad. Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p= nivel de significancia.

La tabla 3-4 describe la topografía de las fincas encuestadas y en ella se observa que la mayoría de las fincas de los municipios incluidos son fincas planas, excepto el municipio

de Mariquita en donde el 71% de los predios se encontraban en zonas onduladas en las cuales se encontró una vocación ganadera y agrícola, situación que se relaciona con la mayor prevalencia de mortalidad en predios (41,5%) discutida en la sección anterior. El municipio que presenta un mayor porcentaje de predios inundables es el municipio de Ubaté (83%), seguido de Puerto López (57,1%) y Nemocón (41,5%). El municipio que presentó un menor número de predios inundables fue el municipio de Mariquita (24,3%).

**Tabla 3 5** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Área (ha) de pastoreo del ganado y tamaño total de las fincas. Se estratifican las fincas por tamaño y número de potreros; se indican sus respectivas áreas. 2007

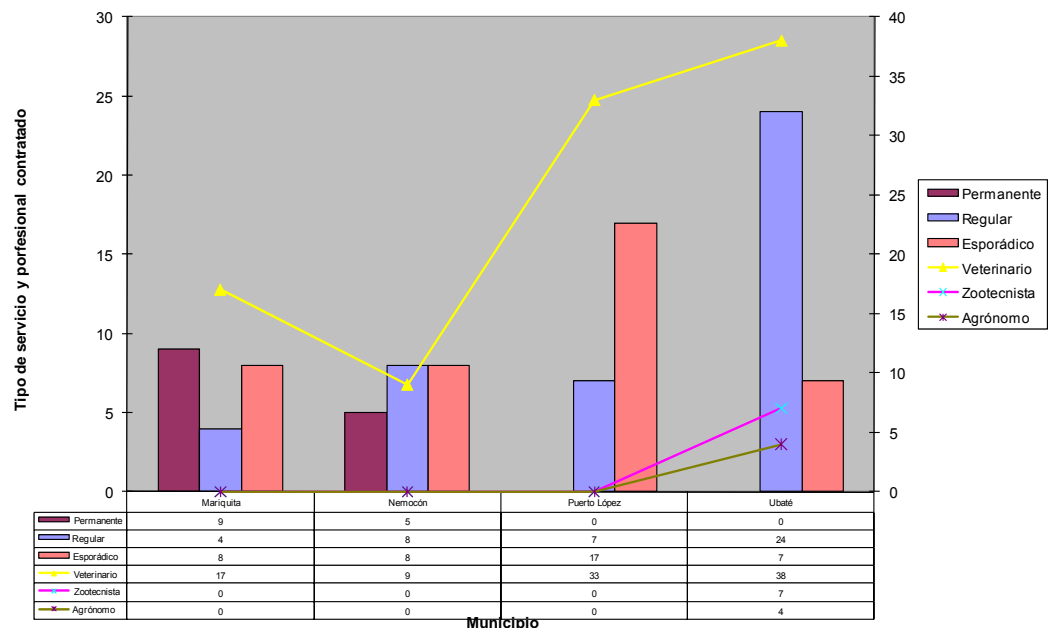
Características de los Predios	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté
Total fincas	41	41	42	41
Área pastoreo ganado (ha)	4 350	951	8 028	1 482
Prom	106,08 <sup>b</sup>	23,34 <sup>a</sup>	191,1 <sup>c</sup>	36,29 <sup>a</sup>
DS	151,51	20,82	154,6	43,5
Área Total predios (ha)	6 462	1 075	11 045	1 488
Prom	157,59	26,2	262,97	36,28
DS	330,84	23,07	494,1	43,44
Fincas < 40 ha	16 (39,02%)	31 (75,6%)	11 (26,19%)	31 (75,6%)
Número de potreros (mediana)	6,5 <sup>ab</sup>	8,0 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>a</sup>	10,00 <sup>b</sup>
Área cultivos	30 <sup>c</sup>	17 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>
Fincas 40-100 ha	9 (21,95%)	10 (24,39%)	8 (19,1%)	6 (14,6%)
Número de potreros (mediana)	7 <sup>a</sup>	22,5 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>	33,5 <sup>b</sup>
Área cultivos	2,5	4,7	0	0
Fincas >100 ha	16 (39,02%)	0	23 (54,76%)	4 (9,75%)
No potreros (mediana)	16,5 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	58 <sup>b</sup>
Área cultivos	8,56	0	29,6	0

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. Prom= Promedio. DS= Desviación estándar.

En la tabla 3.5 se discrimina para cada municipio el total de hectáreas de pastoreo de ganado el cual es muy similar al área total de los predios, lo que indica que en estos el uso de tierra para agricultura o agroforestería es mínimo. En el municipio de Mariquita se reportaron otras actividades agropecuarias como siembra de frutales. En el Municipio de Puerto López parte de las fincas se conservan como zonas de bosques. Para lograr una mejor descripción se estratifican los predios por su tamaño. Se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el número de potreros entre los municipios, conformando varios grupos en los tres tamaños de categorización. Se observa que el municipio de Ubaté es el que reporta un mayor número de potreros en los diferentes tamaños, lo que se relaciona con el grado tecnológico de la zona, ganadería especializada leche, situación



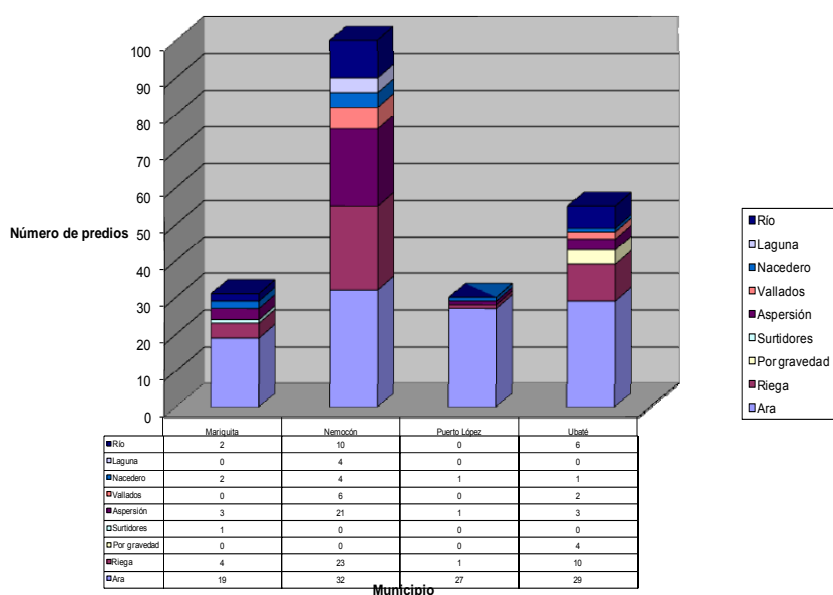
que es reportada por Pulido *et al.*, 2005. El municipio de Puerto López es el que demuestra en los tres estratos un menor número de potreros, situación que está relacionada con los sistemas de producción que son de tipo extensivo (Ortiz, 2000 a).



**Figura 3 5** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Asistencia técnica en predios encuestados. 2007

La figura 3.5 relaciona el tipo de asistencia técnica utilizada en las fincas encuestadas, y que se califica como permanente (viven en la finca), regular (visitas bimestrales o trimestrales contratadas previamente) y esporádica (los llaman cuando se presentan en las fincas casos de urgencia). La contratación de profesionales calificados (agrónomos, médico veterinarios y zootecnistas) en forma permanente es muy escasa, por el contrario en algunas zonas (lechería especializada) la contratación de médicos veterinarios en forma regular es mayor y está ligada a diagnóstico reproductivo. La contratación de agrónomos y de zootecnistas se observa en Puerto López y en Ubaté en forma regular y esporádica.

La disponibilidad de recursos hídricos y su uso se describen en la figura 3.6; se observa que las ganaderías de leche especializada, municipios de Nemocón y Ubaté, utilizan una gran variedad de fuentes de agua. Todos indican que la tierra se ara regularmente.



**Figura 3 6** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Disponibilidad de Recurso Hídrico y Usos. 2007.

### 3.3.3 Inventario ganadero, capacidad de carga

La población ganadera en los hatos se obtuvo por información directa de las personas encuestadas; no se realizó un censo ganadero. La estructura absoluta y porcentual de los hatos se describe en la tabla 3.6; se indican las diferencias entre los municipios con su nivel de significancia. El total de bovinos inventariados en la encuesta fue de 18.963 en las ciento sesenta y cinco fincas. Terneros 2.081, terneras 2.542; novillas 2.653; novillos 2.760, vacas en producción 6.055; vacas horras 2.194 y toros 678.

Los terneros forman dos grupos diferenciados, el primero lo integran los municipios de Mariquita y de Puerto López, ganaderías de carne y doble propósito, donde el ternero es esencial para la práctica de ordeño y una vez se desteta se ceba. El segundo lo integran los municipios de Nemocón y Ubaté, en donde se observan poblaciones muy pequeñas debido a que en las ganaderías de leche especializadas los machos se venden uno o dos días después de nacer.

En el grupo de terneras se observa una agregación similar, las poblaciones de Mariquita y de Puerto López tienen una población más numerosa y conforman un grupo; el otro grupo está conformado por los municipios de Nemocón y Ubaté.

El grupo poblacional de novillas presentó diferencias significativas entre municipios, de tal forma que los municipios de Puerto López y Ubaté se comportan como un grupo y los municipios de Mariquita y Nemocón forman un segundo grupo.

**Tabla 3 6** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Estructura absoluta y porcentual de los hatos/grupos de edad en 165 fincas encuestadas en los municipios de Nemocón, Mariquita, Puerto López y Ubaté. 2007

Grupo de edad	MUNICIPIO				Total	P
	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté		
Terneros	772 <sup>b</sup>	99 <sup>a</sup>	1171 <sup>b</sup>	39 <sup>a</sup>	2081	0.000001
	13,67%	5%	16,10%	0,95%	10,90%	
Terneras	894 <sup>b</sup>	341 <sup>a</sup>	694 <sup>b</sup>	613 <sup>a</sup>	2542	0,0075
	15,83%	17,40%	9,54%	14,98%	13,40%	
Novillas	642 <sup>a</sup>	318 <sup>a</sup>	891 <sup>b</sup>	802 <sup>b</sup>	2653	0,0115
	11,37%	16,53%	12,25%	19,60%	13,90%	
Novillos	522 <sup>b</sup>	16 <sup>a</sup>	2062 <sup>b</sup>	160 <sup>a</sup>	2760	0,00001
	9,24%	0,81%	28,36%	3,91%	14,50%	
Vacas producción	1824 <sup>b</sup>	914 <sup>a</sup>	1257 <sup>a</sup>	2060 <sup>b</sup>	6055	0,00037
	32,31%	46,65%	17,29%	50,35%	31,90%	
Vacas horras	882 <sup>b</sup>	233 <sup>a</sup>	684 <sup>b</sup>	395 <sup>a</sup>	2194	0.00001
	15,62%	11,89%	9,40%	9,65%	11,50%	
Toros	108 <sup>b</sup>	38 <sup>a</sup>	510 <sup>b</sup>	22 <sup>a</sup>	678	0,0001
	1,91%	1,93%	7,01%	0,53%	3,50%	
Total	5644 <sup>b</sup>	1959 <sup>a</sup>	7269 <sup>b</sup>	4091 <sup>a</sup>	18963	0,0001
	100%	100%	100%	100%	100%	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos.

p= nivel de significancia.

Los novillos tienen una población más abundante en los municipios de Mariquita y Puerto López, caso similar al de los terneros, por lo que estos dos municipios conforman un grupo. El otro grupo lo conforman los municipios de Nemocón y Ubaté. Las vacas en producción forman dos grupos, el de los municipios de Nemocón y Puerto López, y el segundo grupo el de Mariquita y Ubaté.

Las vacas horras se agregan poblacionalmente en dos grupos, Nemocón y Ubaté y el otro Mariquita y Puerto López. Lo mismo sucede para el grupo de los toros.

**Tabla 3 7** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Estructura de los hatos/grupos de edad. Comparación y significancia entre fincas positivas y negativas a mortalidad en 165 fincas encuestadas en los municipios de Nemocón, Mariquita, Puerto López y Ubaté. 2007

Grupo de edad	Mortalidad	Municipio				Total
		Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté	
Terneros	si	274	15	240	7	536
	no	498	84	931	32	1545
	p	0.64	0.98	0.47	0.84	0.47
Ternerass	si	281	101	185	326	893
	no	613	240	509	287	1649
	p	0.97	0.96	0.21	0.07	0.18
Novillas	si	337	119	432	254	1142
	no	305	199	459	548	1511
	p	0.25	0.61	0.05	0.05	0.003
Novillos	si	287	0	643	26	956
	no	235	16	1419	134	1804
	p	0.81	0.13	0.01	0.36	0.58
Vacass Producción	si	449	343	475	725	1992
	no	1375	571	782	1335	4063
	p	0.86	0.84	0.08	0.28	0.33
Vacass horras	si	314	71	226	175	786
	no	568	162	458	220	1408
	p	0.56	0.86	0.25	0.03	0.01
Toro	si	51	6	17	3	77
	no	57	32	493	19	601
	p	0.43	0.89	0.28	0.2	0.32
Total	si	19.93	655	2218	1516	6382
	no	3651	1304	5051	2575	12581
	p	0.77	0.46	0.06	0.1	0.18

Si= Fincas Positivas a mortalidad. No= Fincas negativas a mortalidad. p= nivel de significancia.

Quando se compararon las poblaciones animales con la presencia de mortalidad en las fincas, se encontraron diferencias significativas en el grupo de novillas en los municipios de Puerto López ( $p=0,049$ ) y Ubaté ( $p=0,049$ ), de tal forma que el número de animales en fincas positivas es menor que en las fincas negativas. En la misma forma se encontraron diferencias significativas en el grupo de novillos en el municipio de Puerto López

( $p=0,014$ ) y en el grupo etario de vacas horras en el municipio de Ubaté ( $p= 0,026$ ) con poblaciones inferiores en las fincas positivas. Los resultados se describen en la tabla 3.7, e indican que las fincas positivas a mortalidad por alguna razón tienen poblaciones más bajas de dichos grupos etarios.

La capacidad de carga aproximada se estableció teniendo en cuenta los coeficientes por categorías que permiten calcular la carga animal si no se registran datos de peso en la finca, utilizando coeficientes para igualar animales a unidades de 500 Kg (Serrano, 1996). Los coeficientes utilizados fueron: Terneros: 0,25; Terneras: 0,20; Novillas: 0,70; Vacas: 1; Novillos de uno a dos años: 0,75; Novillos dos a tres años: 0,9 y toros: 1,2.

La capacidad de carga se determinó independientemente para cada finca. Los resultados estadísticos se describen en la tabla 2.8, los cuales permiten identificar diferencias significativas entre los cuatro municipios. La mayor capacidad de carga se encuentra en el municipio de Ubaté, la menor en el municipio de Puerto López.

**Tabla 3 8** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Carga ganadera/ha en 165 hatos de los municipios de Nemocón, Mariquita, Puerto López y Ubaté. 2007

CARGA ANIMAL	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté	p
UGG/ha	1,073 <sup>b</sup>	1,82 <sup>b</sup>	0,76 <sup>a</sup>	2,73 <sup>bc</sup>	0.00001
UGG/ha (LC95%)	0,83 – 1,31	1,5 - 2,15	0,6 - 0,92	2,21 – 3,24	0,00001

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos.  $p=$  nivel de significancia.

Los promedios de las razones puntuales poblacionales por municipio se describen en la tabla 3.9. En municipios de zonas frías (Nemocón, Ubaté), las ganaderías venden los machos recién nacidos, solamente dejan hembras, lo que explica los valores bajos de la razón Ternero/vaca. Los municipios de clima cálido dejan los machos los cuales se crían y posteriormente se ceban.

La razón novillas/novillos presenta un comportamiento similar, es menor en municipios fríos y mayor en zonas cálidas. La razón novillas vacas es mayor en el municipio de Mariquita, Los municipios de Nemocón y Ubaté tienen el valor más bajo. La razón novillos vaca demostró diferencias significativas entre municipios, los municipios de Nemocón y Ubaté se comportan iguales con valores bajos; los municipios de Mariquita y Puerto López forman otro grupo con valores más altos. En los municipios lecheros (fríos) se engordan los animales de desecho, es muy raro el sistema que se especialice en engordar animales para consumo. La razón vaca toro es mayor en el municipio de Mariquita, la menor es en el municipio de Nemocón, a pesar de que las lecherías deberían tener una mayor razón por el uso de técnicas como la inseminación artificial.

**Tabla 3 9** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Razones poblacionales aproximadas en 165 fincas encuestadas en los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón (Cund.), Puerto López (Meta); Ubaté (Cund.). 2007

Razón Poblacional	MUNICIPIO				P
	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté	
Temero/vaca	1,13	0,788	0,785	0,236	0,0624
Novillas/Novillos	0,59	0,80	0,90	0,34	0,792
Novillas/Vaca	0,67	0,26	0,32	0,26	0,091
Novillos/Vaca	0,30 <sup>ab</sup>	0,009 <sup>a</sup>	1,01 <sup>ab</sup>	0,057 <sup>a</sup>	0,04
Vaca/Toro	18,41	9,36	11,33	16,84	0,1119
Novillas vaca/Toro	21,94	11,7	15,34	19,38	0,19

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p= nivel de significancia.

En la tabla 3-10 se indica el tipo de bovinos utilizados por el productor. En los municipios de Mariquita y Puerto López se utilizan *Bos indicus* (Brahman, Nellore, Gir) y cruces con *Bos taurus* (Holstein, Romosinuano, BON (Blanco Orejinegro), Sanmartinero), los que se utilizan en la producción de leche. En lecherías especializadas se utiliza *Bos taurus*, principalmente Holstein y se está extendiendo el uso de ganado Jersey el cual según indican los productores mejora la composición grasa de la leche.

**Tabla 3 10** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Relación absoluta y porcentual de las razas bovinas utilizadas por los productores en 165 fincas encuestadas en los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón, Ubaté (Cundinamarca); Puerto López (Meta). 2007

Razas Bovinas presentes en predios	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté
Cebú	20 (48,8%)	0 (0%)	37 (88,1%)	0 (0%)
Cruces	20 (48,8%)	0 (0%)	4 (9,5 %)	0 (0%)
Holstein	0 (0%)	40 (97,5%)	2 (4,8%)	40 (97,5%)
Jersey	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (7,3%)
Otros	1 (2,4%)	6 (14,6%)	11 (26,2%)	2 (4,5%)

La tabla 3- 11: indica el inventario de otras especies animales que se encontraron en las fincas encuestadas. En las poblaciones de ovinos, equinos y aves se encontraron diferencias significativas entre municipios. El municipio de Puerto López presenta el mayor número de ovinos, equinos y aves. La población de caninos es abundante en los cuatro municipios.

**Tabla 3 11** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Otras especies animales encontradas en las encuestas de 165 fincas de los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón, Ubaté (Cundinamarca); Puerto López (Meta). 2007

Otras Especies	MUNICIPIO				Total	p
	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté		
Ovinos	4 <sup>a</sup>	59 <sup>b</sup>	117 <sup>c</sup>	50 <sup>b</sup>	230	0,0018
Equinos	275 <sup>b</sup>	106 <sup>a</sup>	316 <sup>b</sup>	91 <sup>a</sup>	788	0,00005
Caninos	100	111	102	102	315	0,89
Porcinos	75	6	50	19	150	0,06
Aves	721 <sup>b</sup>	278 <sup>a</sup>	1610 <sup>c</sup>	193 <sup>a</sup>	6055	0,00001

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p=nivel de significancia

### 3.3.4. Forrajes y manejo de praderas

El tipo de forrajes que utilizan los productores en su mayoría son gramíneas, se describen en la tabla 3.12.

**Tabla 3 12** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Forrajes utilizados en 165 fincas de los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón (Cundinamarca), Puerto López (Meta) y Ubaté (Cundinamarca). 2007

Tipo de Forraje (% de fincas)	Mariquita (% fincas)	Nemocón (% fincas)	Puerto López (% fincas)	Ubaté (% fincas)
Angleton ( <i>Dichantium aristatum</i> )	26,83	NR	NR	NR
Avena forrajera ( <i>Avena sativa</i> )	2,44	19,51	NR	12,2
<i>Brachiaria spp.</i>	97,56	NR	69,05	NR
Caña forrajera ( <i>Saccharum officinarum</i> )	7,32	NR	11,9	NR
Estrella ( <i>Cynodon puemfurnsis</i> )	2,44	NR	21,43	NR
Kikuyo ( <i>Pennisetum clandestinum</i> )	NR	29,3	NR	24,4
King grass ( <i>Pennisetum hybridum</i> )	2,44	NR	9,52	NR
Maralfalfa ( <i>Pennisetum violaceum</i> )	24,39	2,44	19,05	2,44
Pangola ( <i>Digitaria decumbens</i> )	7,32	NR	NR	NR
Pasto corte	29,27	34,15	35,71	14,63
Puntero ( <i>Hyparrhenia rufa</i> )	39,02	NR	NR	NR
Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> )	NR	60,98	NR	51,22
Tanzania ( <i>Panicum maximun</i> )	2,44	NR	NR	NR
Total fincas	41	41	42	41

NR: No registra información

El 99% de los productores de los municipios de Nemocón y Ubaté (Departamento de Cundinamarca) reportan que abonan praderas. Los principales productos utilizados son abonos químicos (Urea y triple 15) y en menor proporción abonos orgánicos (*humus*). Por el contrario los productores de los municipios de Mariquita y Puerto López reportan que el uso de gallinaza en sus praderas es mayor. El pastoreo de tipo rotacional es el más utilizado. La rotación de pasto con otros cultivos es muy utilizada en el municipio de Nemocón. Por el contrario en el municipio de Ubaté no se utiliza (Tabla 3.13).



### 3.3.5 Prevalencia de punto para fincas y tasa de mortalidad

La prevalencia global en fincas afectadas por mortalidad fue de 27,3% (Mariquita 41,5%; Nemocón 29,3%; Puerto López 14,3%, Ubaté 24,4%). La tasa de mortalidad calculada fue de 3,14%, siendo la más alta en el municipio de Puerto López 4,25% y la más baja en el municipio de Nemocón 1,79%. Los resultados se observan en la tabla 3.14.

**Tabla 3 13** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Manejo de praderas en 165 fincas de los municipios de Mariquita (Tolima), Nemocón, Ubaté (Cundinamarca); Puerto López (Meta). 2007

Características de Manejo de praderas (% de fincas)	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté
Abona praderas	36,59	92,68	64,29	92,68
Cal	NR	2,44	30,95	24,39
Gallinaza	19,51	9,76	26,19	4,88
Humus	2,44	2,44	NR	2,44
Pastoreo alterno	NR	NR	2,38	NR
Pastoreo continuo	7,32	9,76	14,29	NR
Pastoreo rotacional	90,24	82,93	83,33	97,56
Rota potrero con cultivo	9,76	17,07	2,38	NR
Triple 15	2,44	2,44	2,38	24,39
Urea	24,39	21,95	11,90	63,41
Total fincas	41	41	42	41

NR: No registra información

El municipio con mayor número de fincas afectadas fue Mariquita (10.3%) y el municipio menos afectado fue Puerto López (3.6%). Los municipios del departamento de Cundinamarca presentan alto número de fincas afectadas. Los resultados se indican en la tabla 3.14. Con respecto a la prevalencia de animales muertos es mayor en los municipios de Puerto López (4.25%) y Mariquita (3.05%) y menor en los municipios de Ubaté (1.93%) y Nemocón (1.79%), indicando que en los climas cálidos es mayor la casuística, sin descartar la importancia de los casos de mortalidad en climas fríos.

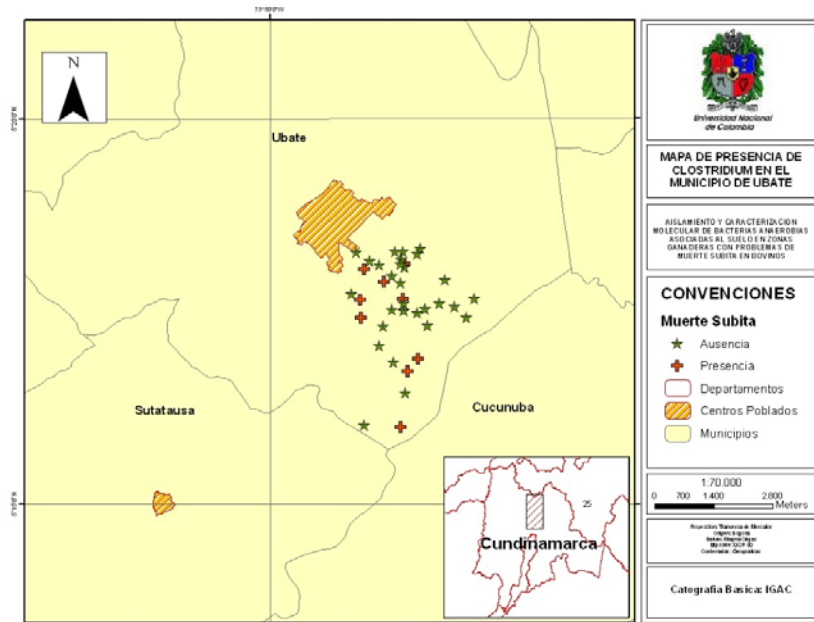
**Tabla 3 14** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Relación absoluta y porcentual de fincas afectadas por municipio. Total de animales muertos por municipio. Prevalencias de punto en fincas y tasas de mortalidad. 2007

Indicadores de mortalidad	MUNICIPIO			
	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté
Total fincas	41(24,8%)	41 (24.8%)	42(25.5%)	41 (24.8%)
Fincas afectadas	17 (10.3%)	12 (7.3%)	6 (3.6%)	10 (6.06%)
Total animales muertos	172	35	309	79
Promedio	4,19	0,85	7,35	1,92
LC 95%	2,29-6,08	0,25-1,44	2,30-12,39	0,45-3,38
Ds	6,19	1,93	16,69	4,79
Prevalencia Fincas	41,46	29,27	14,29	24,39
Población bovinos	5644	1959	7269	4091
Tasa de mortalidad	3,05	1,79	4,25	1,93

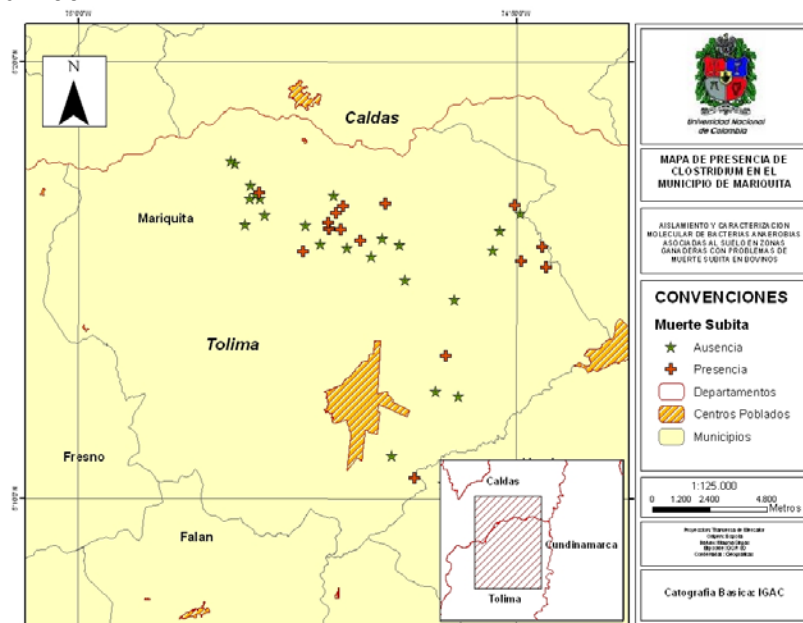
**Tabla 3 15** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Época de muerte. Relación absoluta y porcentual de fincas afectadas por Clostridiosis en los municipios y distribución de las mismas en las épocas climáticas. 2007

EPOCA DE MUERTE	MUNICIPIO				Total
	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté	
Total fincas	41(24,8%)	41 (24.8%)	42(25.5%)	41 (24.8%)	165 (100%)
Fincas afectadas	17 (10.3%)	12 (7.3%)	6 (3.6%)	10 (6.06%)	45 (27.3%)
Muerte en invierno	8 (4.8%)	8 (4.8%)	1 (0.6%)	2 (1.2%)	19 (11.5%)
Muerte en verano	8 (4.8%)	3 (1.8%)	5 (3%)	8 (4.8%)	24 (14.5%)
Muerte en periodos de transición	1 (0.6%)	1 (0.6%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.2%)

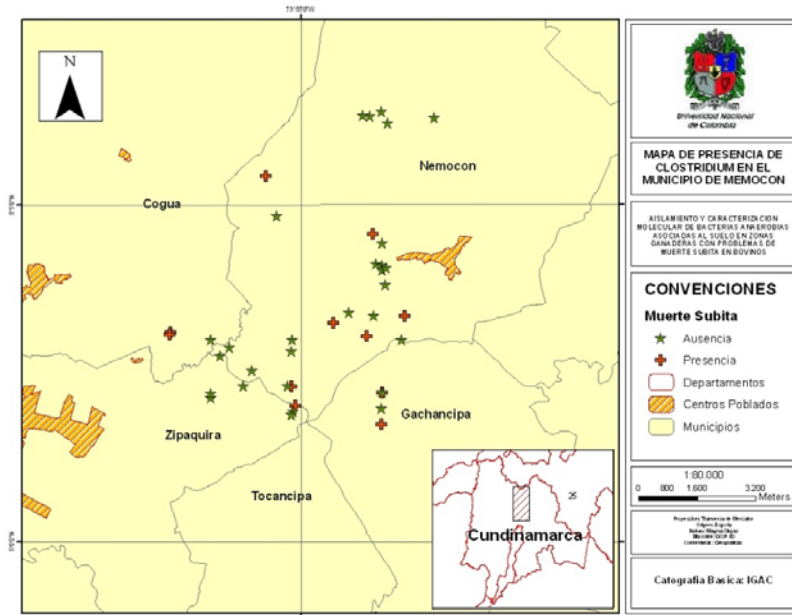
La mortalidad según reportan los productores sucede en mayor proporción en épocas de verano, las cuales corresponden a los trimestres de enero, febrero, marzo y junio, julio, agosto. También reportan mortalidad en época de invierno en los trimestres de marzo, abril, mayo y septiembre, octubre, noviembre. En el municipio de Nemocón los propietarios indican que mueren en invierno. En los municipios de Puerto López y Ubaté en época de verano. En el municipio de Mariquita mueren en invierno y verano. Los resultados se indican en la tabla 3.15.



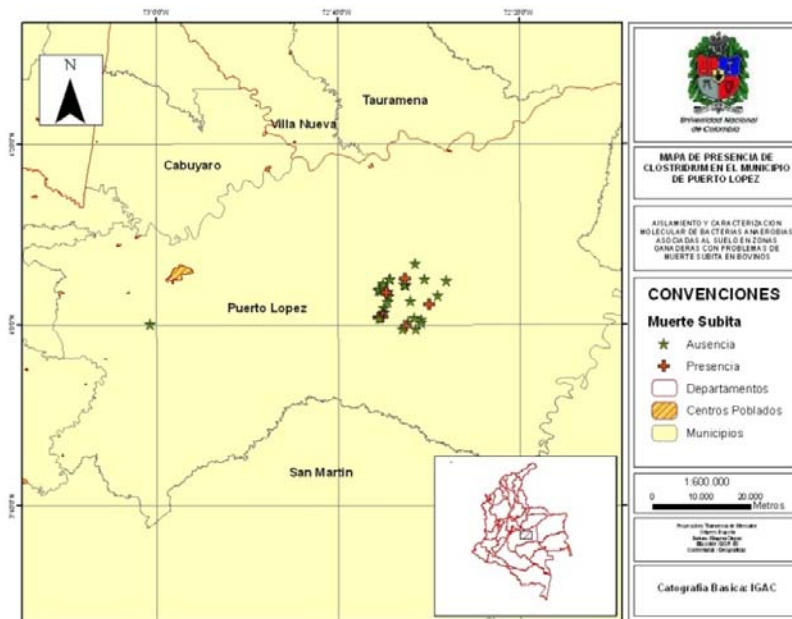
**Figura 3 7** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Municipio de Mariquita (departamento del Tolima). Ubicación de predios positivos a casos de Mortalidad. 2007



**Figura 3 8** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Municipio de Ubaté (departamento de Cundinamarca). Ubicación de predios positivos a casos de Mortalidad. 2007



**Figura 3 9** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Municipio de Nemocón (departamento de Cundinamarca). Ubicación de predios positivos a casos de Mortalidad. 2007



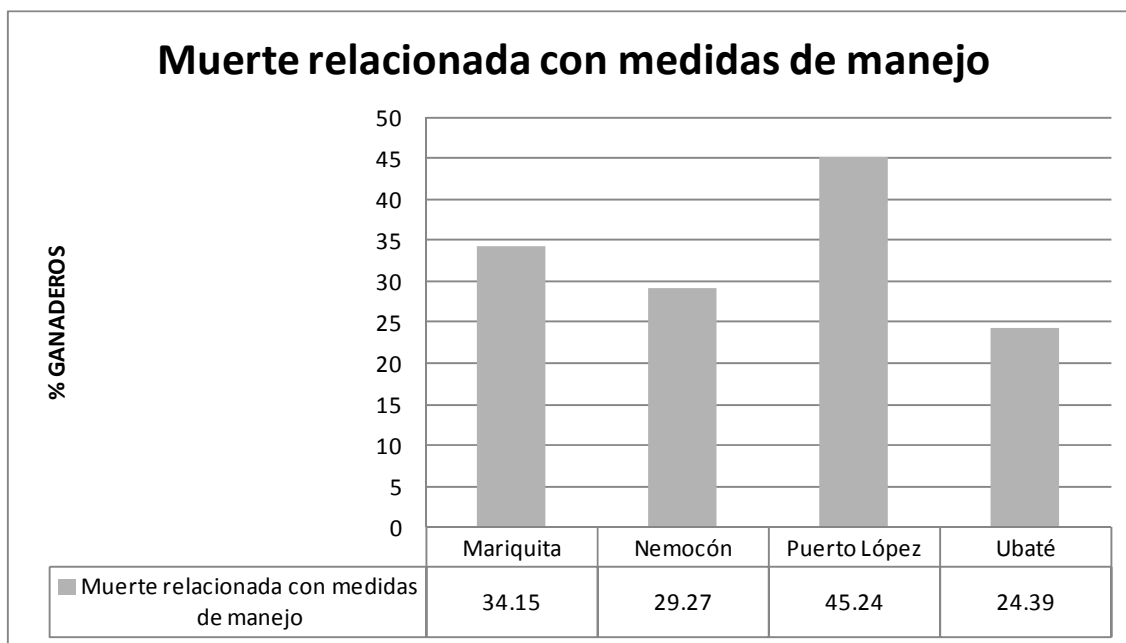
**Figura 3 10** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Municipio de Puerto López (departamento del Meta). Ubicación de predios positivos a casos de Mortalidad. 2007

Las figuras 3-7, 3-8, 3-9 y 3-10 ubican las fincas encuestadas estratificándolas en fincas positivas y fincas negativas a casos de mortalidad en los municipios incluidos en el estudio.

### 3.3.6 Clostridiosis, relación con otras variables determinantes

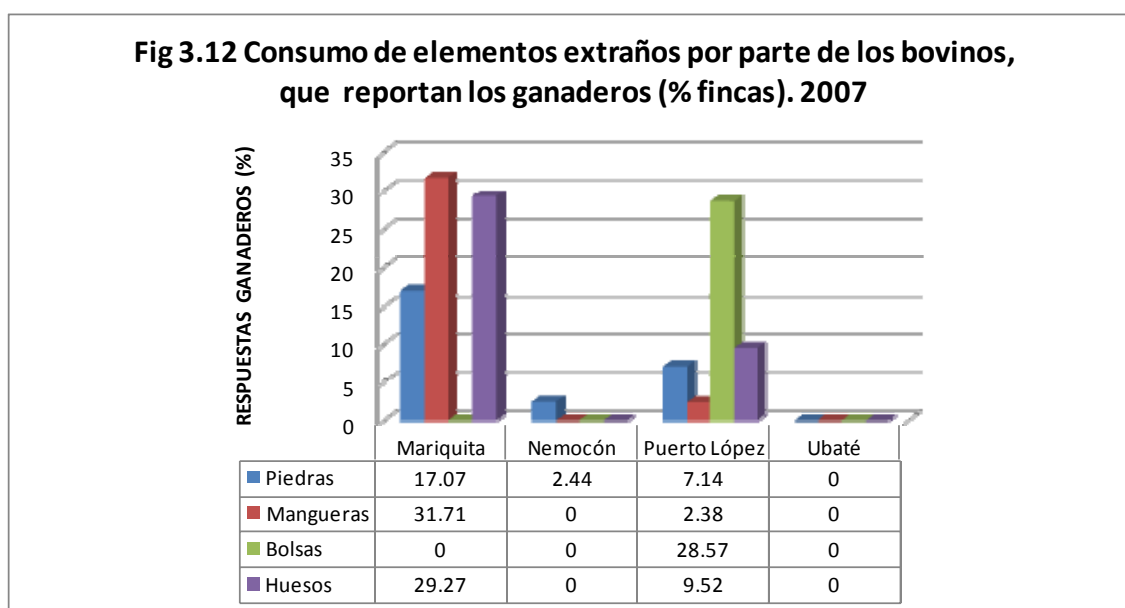
Con base en la experiencia del productor se relacionaron los casos de mortalidad con otras variables determinantes con el fin de establecer factores causales.

a figura 3-11 indica la relación porcentual de las respuestas de los ganaderos cuando se les preguntó si relacionaban la muerte de sus animales con medidas de manejo; se observa que el municipio de Puerto López es el que presenta un mayor valor, seguido por el municipio de Mariquita. En sus respuestas dichas medidas incluyeron palpaciones, vacunaciones, marcaje de animales, topización (descorne) de terneros y terneras, orquiectomías entre otras.



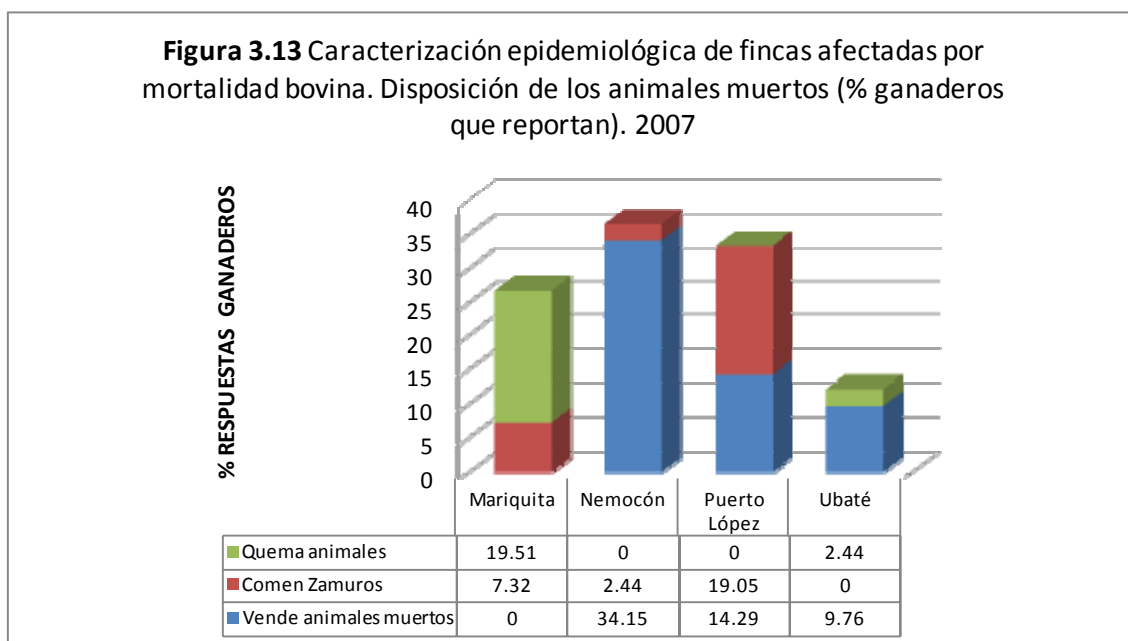
**Figura 3 11** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Mortalidad bovina que el ganadero relaciona con medidas de manejo (Relación porcentual) 2007

Con respecto a las respuestas dadas por los productores sobre el consumo de elementos extraños en la dieta de sus animales, los resultados se indican en la figura 3.12. El consumo de piedras es mayor en los municipios de Mariquita y Puerto López, lo mismo que el consumo de huesos y de mangueras. Los municipios de clima frío no reportan esta situación, posiblemente se deba a que los suelos de éste clima superan en calidad los suelos de clima cálido (Corpoica, 2007).



**Figura 3 12** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina Consumo de elementos extraños reportado por los ganaderos (% fincas). 2007

En la figura 3-13, se indican las respuestas de los ganaderos sobre la disposición de los animales muertos. Los ganaderos reportan que utilizan varias formas para disponer de los cadáveres, de animales que han muerto por esta condición. Una de ellas es la venta de los animales muertos, la cual es una costumbre entre los ganaderos en la mayoría de municipios; dichos animales son faenados y generalmente se utilizan para el consumo humano o para la industria de embutidos con los riesgos que ello representa para la salud humana y animal. Otros propietarios de fincas de tres municipios indican que los animales que mueren por esta causa, que no se venden, no se entierran y se dejan autolisar en el medioambiente, generalmente son consumidos por animales carroñeros, principalmente zamuros (chulos). Solamente dos propietarios indican que queman los animales utilizando combustible (querosene) para su combustión.



**Figura 3 13** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Disposición de los animales muertos (% fincas que reportan). 2007

### 3.3.7 Variables bioclimáticas

El comportamiento de las variables bioclimáticas utilizadas para analizar la información obtenida en las encuestas aplicadas en el año 2007 en las zonas relacionadas con este estudio se observan en la tabla 3.16, la cual compara los valores (promedios) de las fincas afectadas con los valores de las fincas no afectadas. Se presentan 19 variables bioclimáticas, entre las que se incluyen Isotermas, las cuales son isoyetas (línea trazada sobre un mapa con la que se unen puntos donde se registra igual cantidad de precipitación) que representan líneas con porcentajes de temperatura igual. Las isothermas indicadas están representadas cada 2,5 grados.

La temperatura estacional corresponde a la temperatura predecible a partir de una serie de tiempo calculada a partir de las repeticiones en el periodo de un año.

Las comparaciones de las variables bioclimáticas (temperatura mínima y máxima y precipitación) entre fincas afectadas y fincas no afectadas permiten determinar variaciones

entre ellas y formular hipótesis que puedan ser demostradas en otros estudios epidemiológicos para explicar los brotes de mortalidad y la asociación con dichas variables. Se demostró al analizar dichas variables que existían diferencias significativas en isotermas ( $p=0.014$ ), temperatura estacional ( $p=0.03$ ), niveles de precipitación en el mes más seco ( $p=0.047$ ), niveles de precipitación en el trimestre más seco ( $p=0.05$ ) y en niveles de precipitación del trimestre más caliente ( $0.024$ ), encontrando un mayor valor de éstas variables en las fincas que presentaron mortalidad que en las que no se presentó mortalidad.

**Tabla 3 16** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables bioclimáticas de fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad bovina. 2007

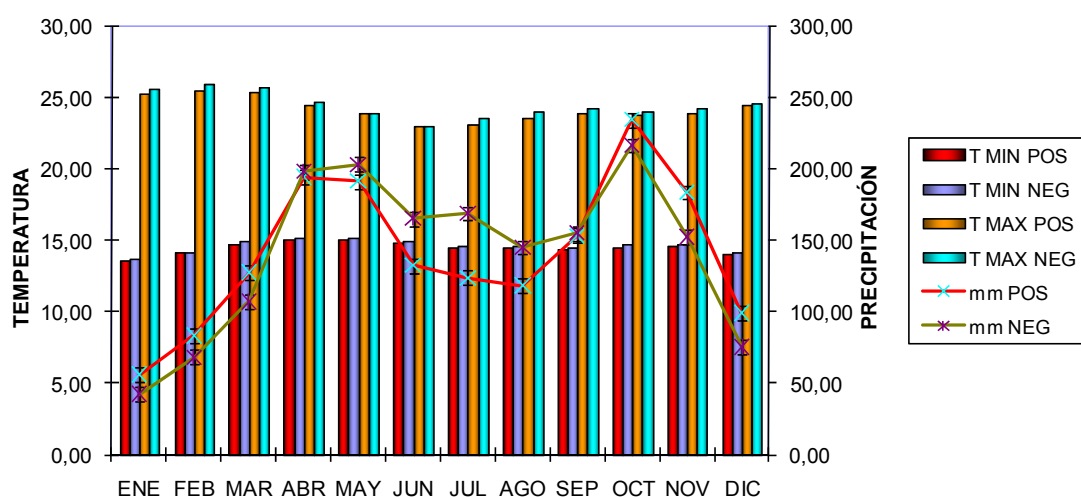
VARIABLES CLIMÁTICAS WORLD CLIM	Variables bioclimáticas		
	FINCAS POSITIVAS	FINCAS NEGATIVAS	P
PROMEDIO TEMP ANUAL (1)	19,40	19,50	0,9500
RANGO PROMEDIO TEMP MENSUAL (2)	9,90	9,75	0,0900
ISOTERMAS (2/7) (* 100) (3)	80,13	77,90	0,0147
TEMP ESTACIONAL (STD*100) (4)	45,90	56,60	0,0300
> TEMP MES MÁS CALIENTE(5)	25,80	26,10	0,8000
< TEMP MES MÁS FRÍO (6)	13,50	13,50	0,9500
RANGO TEMP ANUAL (5-6) (7)	12,34	12,60	0,1000
PROM TEMP TRIMESTRE MÁS LLUVIOSO (8)	19,20	19,20	0,9800
PROM TEM TRIMESTRE MÁS SECO (9)	19,60	19,70	0,8900
PROM TEM TRIMESTRE MÁS CÁLIDO (10)	19,90	20,20	0,8400
PROM TEM TRIMESTRE MÁS FRÍO (11)	18,80	18,79	0,9000
PRECIPITACIÓN ANUAL (12)	1694,70	1696,20	0,9900
PRECIPITACIÓN MES MÁS LLUVIOSO (13)	250,60	251,60	0,9600
PRECIPITACIÓN MES MÁS SECO (14)	56,00	42,43	0,0478
PRECIPITACIÓN ESTACIONAL (CV) (15)	43,48	46,60	0,0900
PRECIPITACIÓN TRIMESTRE MÁS HÚMEDO (16)	630,10	648,40	0,7000
PRECIPITACIÓN TRIMESTRE MÁS SECO (17)	216,95	172,91	0,0500
PRECIPITACIÓN TRIMESTRE MÁS CALIENTE (18)	332,50	281,60	0,0240
PRECIPITACIÓN TRIMESTRE MÁS FRÍO (19)	567,60	584,20	0,8000

p=nivel de significancia

Los valores resultantes demostraron ocurrencia de mortalidad en épocas secas, en las fincas que presentaron mayor precipitación en dicha época. Al comparar la temperatura máxima y la temperatura mínima se encontró que los valores más extremos (picos) se



ubicaban en los meses de diciembre y enero, que corresponde a los meses en donde la precipitación fue menor. Al comparar las fincas positivas y negativas se encontraron diferencias significativas en la variable precipitación en los meses de diciembre y enero, sugiriendo que esta variable está asociada a los casos de mortalidad. La precipitación es la más baja, pero los valores resultantes en las fincas positivas son mayores comparados con los valores de las fincas negativas (figura 3.14).



**Figura 3 14** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Comparación de variables climatológicas temperatura máxima, temperatura mínima y precipitación entre fincas positivas y fincas negativas a mortalidad. 2007

### 3.3.8 Variables relacionadas con las características del suelo

Los valores de pH de los suelos de las fincas incluidas en este estudio se describen en la tabla 3.17. Dichos valores se compararon entre fincas positivas y negativas con el fin de proponer alguna relación con los casos de mortalidad. Se encontraron diferencias significativas ( $p=0,02$ ) en los valores de pH en el municipio de Nemocón, al comparar las fincas con mortalidad ( $pH= 5,56$ ) y sin mortalidad ( $pH=5,22$ ). En los otros municipios no hubo diferencias en los pH del suelo. Cuando se compararon los pH del suelo de los municipios incluidos en este estudio, se observaron diferencias significativas en el pH de los suelos de Mariquita y Nemocón ( $p=0,0108$ ); Mariquita y Puerto López ( $p=0,0042$ ); Mariquita y Ubaté ( $p=0,0335$ ). Cuando se compararon los valores entre Nemocón y

Puerto López se encontraron diferencias significativas ( $p=0,0303$ ); Nemocón y Ubaté no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,0679$ ), Ubaté y Puerto López no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,6352$ ).

**Tabla 3 17** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. pH de los suelos de fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	n	Prom pH	LCI 95%	LCS 95%	P
MARIQUITA	POSITIVO	17	6,09	3,22	8,96	0,230 <sup>a</sup>
	NEGATIVO	24	5,84	3,53	8,15	
NEMOCON	POSITIVO	12	5,56	2,45	8,67	0,020 <sup>b</sup>
	NEGATIVO	29	5,22	3,34	7,10	
PUERTO LÓPEZ	POSITIVO	6	3,90	0,81	6,99	0,460 <sup>c</sup>
	NEGATIVO	36	3,99	2,70	5,28	
UBATÉ	POSITIVO	10	4,46	1,72	7,20	0,810 <sup>bc</sup>
	NEGATIVO	31	4,42	2,88	5,96	
TOTAL	POSITIVO	45	5,29	3,76	6,82	0,001
	NEGATIVO	120	4,77	3,93	5,61	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos.  $p$ =nivel de significancia

Las fincas con los suelos más ácidos se encuentran en el municipio de Puerto López; las fincas con los suelos más neutros se encuentran en el municipio de Mariquita. Se encontraron diferencias significativas ( $p<0,001$ ), al comparar las fincas positivas y las fincas negativas, encontrando que un valor de pH que se acerque más a la neutralidad ( $pH=5,29$ ), favorece la presentación de brotes de mortalidad.

El drenaje natural de los suelos fue discriminado entre fincas positivas y negativas. Su distribución se observa en la tabla 3.18 en la que se indica el número de fincas, su distribución porcentual y el tipo de drenaje encontrado. De las 165 fincas, 45 fincas tienen casos de mortalidad, de las cuales 21 fincas (12,72%) están en suelo bien drenado, 13 fincas (7,87%) están en suelo muy pobremente drenado, 7 fincas (4,24%) están en suelo moderadamente bien drenado y 4 fincas (2,42%) están en suelo con drenaje excesivo. No se encontraron diferencias significativas entre las fincas positivas y las fincas negativas (Corpoica, 2007).

El paisaje de los predios fue discriminado en Altiplanicie, altillanura; lomerío; montaña; piedemonte; planicie llanura y valle. Los resultados se observan en la tabla 3.19, en el

cual se indican las comparaciones que se efectuaron entre fincas positivas a mortalidad y fincas negativas a mortalidad con el fin de establecer posibles factores de riesgo. Se encontraron diferencias significativas en el municipio de Ubaté, el cual se localiza en un paisaje de planicie ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3 18** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Drenaje natural de suelos. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	Bien drenado	Excesivo	Imperfectamente Drenado	Moderadamente Bien Drenado	Muy Pobremente Drenado	Total	p
MARIQUITA	POS	12 (18,4%)	4 (2,42%)		1 (0,60%)		17	0,94
	NEG	18 (27,7%)	5 (3,03 %)		1 (0,60%)		24	
NEMOCON	POS	7 (4,2%)				5 (3,03 %)	12	0,12
	NEG	15 (9,09 %)		4 (2,42%)	5 (3,03%)	5 (3,03%)	29	
PUERTO LÓPEZ	POS	2 (1,21%)			4 (2,42%)		6	0,67
	NEG	9 (5,45%)		4 (2,42%)	23 (13,93%)		36	
UBATÉ	POS				2 (1,21%)	8 (4,84 %)	10	0,36
	NEG				11 (6,66%)	20 (12,12%)	31	
TOTAL	POS	21 (12,72%)	4 (2,42%)	0	7 (4,24%)	13 (7,87%)	45	0,04
	NEG	42 (25,45%)	5 (3,03%)	8 (4,84 %)	40 (24,24%)	25 (15,15%)	120	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos.  $p$ =nivel de significancia

Los predios incluidos en este estudio fueron clasificados de acuerdo a la capacidad de uso. Esta clasificación es un ordenamiento sistemático de carácter práctico e interpretativo, fundamentado en la aptitud natural que presenta el suelo para producir pastos constantemente, bajo tratamiento continuo y usos específicos. Las divisiones o grupos de capacidad comprenden categorías menores de clasificación, que son las clases de capacidad. Estas se diferencian unas de otras por el grado de limitaciones

permanentes o riesgos que involucra el uso de los suelos (Seidl, 1991; Pulido *et al.*, 2005; Corpoica, 2007).

**Tabla 3 19** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Paisaje de fincas. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	Altiplanicie, altillanura	Lomerío	Montaña	Piedemonte	Planicie/ Llanura	Valle	Total	P
MARIQUITA	POS		4 (2,42%)	8 (4,84%)	5 (3,03%)			17,00	0,90
	NEG		5 (3,03%)	13 (7,87%)	6 (3,63%)			24,00	
NEMOCON	POS			7 (4,24%)		5 (3,03%)		12,00	0,70
	NEG			15 (9,09%)		14 (8,48%)		29,00	
PUERTO LÓPEZ	POS		4 (2,42%)				2 (1,21%)	6,00	0,65
	NEG	1 (1,21%)	29 (17,57%)		1 (1,21%)		5 (3,03%)	36,00	
UBATÉ	POS					10 (6,06%)		10,00	0,00
	NEG					31 (18,78%)		31,00	
TOTAL	POS		8 (4,84%)	15 (9,09%)	5 (3,03%)	15 (9,09%)	2 (1,21%)	45,00	0,48
	NEG	1 (1,21%)	34 (20,6%)	28 (16,96%)	7 (4,24%)	45 (27,27%)	5 (3,03%)	120,00	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p=nivel de significancia

El primer grupo comprende cuatro clases de capacidad, que van de la Clase I a la Clase IV. La Clase I es considerada la mejor y se supone que carece prácticamente de limitaciones, las cuales aumentan de la clase I a la clase IV. El segundo grupo está integrado por las Clases V y VI, y sus limitaciones aumentan progresivamente de la V a la VI. El tercer grupo consta solo de la Clase VII y agrupa suelos apropiados generalmente para la explotación forestal. Por último, el cuarto grupo consta solo de la Clase VIII y presenta tales limitaciones que son inapropiadas para fines agropecuarios o de explotación forestal.

**Tabla 3 20** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Capacidad de uso del suelo. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase VI	Clase VII	Total	p
MARIQUITA	POSITIVA		5 (3,03%)	4 (2,42%)	1 (0,60%)		10,00	0,17
	NEGATIVA		6 (3,63%)	3 (1,81%)	7 (4,04%)		16,00	
NEMOCON	POSITIVA	5 (3,03%)				7 (4,24%)	12,00	0,40
	NEGATIVA	10 (6,06%)		4 (2,42%)		15 (9,09%)	29,00	
PUERTO LÓPEZ	POSITIVA	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	6,00	0
	NEGATIVA	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	36,00	
UBATÉ	POSITIVA	2 (1,21%)	8 (4,84%)				10,00	0,36
	NEGATIVA	11 (6,66%)	20 (12,12%)				31,00	
TOTAL	POSITIVA	7 (4,24%)	13 (7,87%)	4 (2,42%)	1 (0,60%)	7 (4,24%)	32,00	0,74
	NEGATIVA	21 (12,72%)	26 (15,75%)	7 (4,24%)	7 (4,24%)	15 (9,09%)	76,00	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p=nivel de significancia Nc: Información no disponible.

El 16,96% de las fincas se ubicaron en la clase II. Las fincas en su mayoría (23,63%) se ubicaron en suelos de clase III. El 13,33% de las fincas se clasificaron en suelos de clase VII. Los suelos de las fincas identificados y descritos en este trabajo se agruparon en las Clases II, III, IV, VI y VII. Las Clases I, V y VIII no se identificaron. Los resultados se observan en la tabla 3.20.

La mayoría de fincas positivas a mortalidad (7,87%) se clasificaron en suelos de la clase III; en los suelos clase II y clase VII se clasificaron el 4,24% de las fincas positivas respectivamente. Las fincas positivas restantes 2,42% y 0,60% se clasificaron en las clases IV y VI. No se encontraron diferencias significativas entre fincas positivas y negativas ( $p > 0,05$ ). El análisis en la zona de Puerto López no se pudo efectuar porque la zona carece de información.

**Tabla 3 21** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Espesor Horizonte (cm). Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	N	Prom Espesor Horizonte	LCI 95%	LCS 95%	P
MARIQUITA	POSITIVA	17 (10,3%)	20,882	11,06	30,71	0,465 a
	NEGAVTIVA	24 (14,54%)	23,125	13,97	32,28	
NEMOCON	POSITIVA	12 (7,27%)	35,500	15,62	55,38	0,105 a
	NEGAVTIVA	29 (17,57%)	25,172	16,10	34,24	
PUERTO LÓPEZ	POSITIVA	6 (3,63%)	14,000	2,91	25,09	0,801 b
	NEGAVTIVA	36 (21,8%)	14,389	9,74	19,04	
UBATÉ	POSITIVA	10 (6,06%)	22,400	8,66	36,14	0,373 a
	NEGAVTIVA	31 (18,8%)	20,387	13,28	27,49	
TOTAL	POSITIVA	45 (27,3%)	24,200	17,20	31,20	0,000
	NEGAVTIVA	120 (72,7%)	20,290	16,70	23,88	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p=nivel de significancia

La variable espesor del horizonte (cm) se analizó con el propósito de determinar las diferencias de esta variable entre las fincas con brotes de mortalidad y las fincas sin brotes de mortalidad. Se llama horizontes del suelo a una serie de niveles horizontales que se desarrollan en el interior del mismo y que presentan diferentes caracteres de composición, textura, adherencia, etc. El *perfil del suelo* es la ordenación vertical de todos estos horizontes (Pulido *et al.*, 2005).

Los resultados se indican en la tabla 3.21 en la cual se observa que en ningún municipio hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre fincas positivas y negativas, pero si se encontraron diferencias entre municipios ( $p < 0,05$ ). Los municipios de Mariquita, Nemocón y Ubaté forman un grupo, el cual se caracteriza por poseer horizontes más ricos en materia orgánica, a diferencia del otro grupo, el horizonte del municipio de Puerto López, que es más pobre en este tipo de material (Corpoica, 2007).

El piso térmico fue comparado entre los grupos y los resultados absolutos y relativos se describen en la tabla 3.22 en la que se demuestran las fincas positivas y negativas a mortalidad bovina. La mayoría de los predios ubicados en Mariquita y Puerto López se localizan en piso térmico cálido, húmedo, mientras que la mayoría de predios de los municipios de Nemocón y Ubaté son de piso térmico frío.

**Tabla 3 22** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Piso térmico. Relación absoluta y porcentual, comparación entre fincas afectadas y fincas no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	Cálido, Húmedo	Cálido, Húmedo y Muy húmedo	Cálido, seco	Frío, seco	Medio, húmedo	Muy Frío seco transicional a frío seco	Total
MARIQUITA	POSITIVA	7 (4,24%)		9 (5,45%)		1 (0,60%)		17
	NEGATIVA	6 (3,63%)		11 (6,66%)		7 (4,24%)		24
NEMOCON	POSITIVA				7 (4,24%)		5 (3,03%)	12
	NEGATIVA				20 (12,12%)		9 (5,45%)	29
PUERTO LÓPEZ	POSITIVA	4 (2,42%)	2 (1,21%)					6
	NEGATIVA	34 (20,6%)	2 (1,21%)					36
UBATÉ	POSITIVA				10 (6,06%)			10
	NEGATIVA				31 (18,78%)			31
TOTAL	POSITIVA	11 (6,66%)	2 (1,21%)	9 (5,45%)	17 (10,3%)	1 (0,60%)	5 (3,03%)	45
	NEGATIVA	40 (24,24%)	2 (1,21%)	11 (6,66%)	51 (30,9%)	7 (4,24%)	9 (5,45%)	120

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p=nivel de significancia

El porcentaje de ocupación de las fincas se tuvo en cuenta para determinar su relación con las fincas positivas y negativas con el fin de identificar posibles relaciones de causalidad, los resultados se observan en la tabla 3.23. No se encontraron diferencias significativas entre fincas ( $p > 0,05$ ), pero en general los valores de ocupación en las fincas positivas están por debajo de los valores de las fincas negativas. Tampoco se encontraron relaciones al comparar los municipios.

**Tabla 3 23** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje de ocupación. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	n	Prom % ocupación	LCI 95%	LCS 95%	P
MARIQUITA	POSITIVA	17	0,430	0,228	0,632	0,097
	NEGAVTIVA	24	0,521	0,315	0,727	
NEMOCON	POSITIVA	12	0,375	0,165	0,585	0,661
	NEGAVTIVA	29	0,395	0,253	0,537	
PUERTO LÓPEZ	POSITIVA	6	0,417	0,087	0,747	0,899
	NEGAVTIVA	36	0,418	0,283	0,553	
UBATÉ	POSITIVA	10	0,270	0,104	0,436	0,373
	NEGAVTIVA	31	0,286	0,186	0,385	
TOTAL	POSITIVA	45	0,378	0,269	0,487	0,348
	NEGAVTIVA	120	0,399	0,328	0,469	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p=nivel de significancia

También se relacionaron los valores en porcentaje de arcilla. Este elemento fue comparado entre fincas positivas y negativas, encontrando que en el municipio de Nemocón hay diferencias significativas ( $p=0,020$ ), siendo el valor más bajo en las fincas positivas (33,7%), mientras que en las fincas negativas el valor es mayor (37,2%). En los otros municipios no se encontraron diferencias significativas, tabla 3.24.

**Tabla 3 24** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje Valor Arcilla. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	n	Prom % Val Arcilla	LCI 95%	LCS 95%	p
MARIQUITA	POSITIVA	17	18,706	9,904	27,507	0,098
	NEGATIVA	24	13,333	8,053	18,613	
NEMOCON	POSITIVA	12	33,703	14,828	52,578	0,020
	NEGATIVA	29	37,237	23,823	50,652	
PUERTO LÓPEZ	POSITIVA	6	12,000	2,496	21,504	0,183
	NEGATIVA	36	9,222	6,240	12,204	
UBATÉ	POSITIVA	10	39,600	15,306	63,894	0,373
	NEGATIVA	31	41,613	27,114	56,112	
TOTAL	POSITIVA	45	26,454	18,804	34,105	0,829
	NEGATIVA	120	25,182	20,723	29,642	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p=nivel de significancia



Los valores porcentuales de arena en los suelos fueron comparados entre fincas positivas y negativas a brotes de mortalidad y entre municipios, sin encontrar relaciones estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ). Los resultados se observan en la tabla 3.25.

**Tabla 3 25** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje Valor Arena. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	n	Prom % Valor Arena	LCI 95%	LCS 95%	P
MARIQUITA	POSITIVA	17	56,353	29,838	82,868	0,190
	NEGAVTIVA	24	43,167	26,073	60,261	
NEMOCON	POSITIVA	12	5,247	2,308	8,185	0,285
	NEGAVTIVA	29	9,749	6,237	13,261	
PUERTO LÓPEZ	POSITIVA	6	70,000	14,560	125,440	0,285
	NEGAVTIVA	36	69,444	46,991	91,898	
UBATÉ	POSITIVA	10	30,400	11,750	49,050	0,373
	NEGAVTIVA	31	28,387	18,496	38,278	
TOTAL	POSITIVA	45	39,156	27,832	50,480	0,936
	NEGAVTIVA	120	38,777	31,910	45,644	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos.  $p$ =nivel de significancia

Finalmente los valores porcentuales de limo en los suelos fueron comparados entre fincas positivas y negativas y entre municipios encontrando diferencias significativas en el municipio de Nemocón ( $p=0,02$ ), con un valor superior en las fincas positivas (61,05%) comparado con el valor de las fincas negativas (53,01%). Los resultados se observan en la tabla 3.26. En el municipio de Ubaté las fincas incluidas tienen un valor promedio similar en esta variable (30%), por lo que no se presentan diferencias significativas.

**Tabla 3 26** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje Valor Limo. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	N	Prom % Val Limo	LCI 95%	LCS 95%	P
MARIQUITA	POSITIVA	17	12,000	6,354	17,646	0,182
	NEGAVTIVA	24	8,083	4,882	11,284	
NEMOCON	POSITIVA	12	61,050	26,860	95,240	0,020
	NEGAVTIVA	29	53,014	33,916	72,112	
PUERTO LÓPEZ	POSITIVA	6	18,000	3,744	32,256	0,165
	NEGAVTIVA	36	21,333	14,436	28,231	
UBATÉ	POSITIVA	10	30,000	11,596	48,404	0
	NEGAVTIVA	31	30,000	19,547	40,453	
TOTAL	POSITIVA	45	29,880	21,239	38,521	0,689
	NEGAVTIVA	120	28,578	23,517	33,639	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos.  $p$ =nivel de significancia

**Tabla 3 27** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Variables relacionadas con el tipo de suelo. Porcentaje de pendiente. Comparación fincas afectadas y no afectadas por casos de mortalidad. 2007

MUNICIPIO	FINCAS	0 %	3 %	7 %	12 %	25 %	50 %	Total	P
MARIQUITA	POSITIVA	4 (2,42%)	1 (0,60%)		4 (2,42%)	5 (3,03%)	3 (1,81%)	17 (10,30%)	0,81
	NEGATIVA	5 (3,03%)	1 (0,60%)		3 (1,81%)	12 (7,27%)	3 (1,81%)	24 (14,54%)	
NEMOCON	POSITIVA	5 (3,03%)					7 (4,24%)	12 (7,27%)	0,70
	NEGATIVA	14 (8,48%)					15 (9,09%)	29 (17,57%)	
PUERTO LÓPEZ	POSITIVA	2 (1,21%)	2 (1,21%)	2 (1,21%)				6 (3,63%)	0,20
	NEGATIVA	6 (3,63%)	8 (4,84%)	22 (13,33%)				36 (21,81%)	
UBATÉ	POSITIVA	10 (6,06%)						10 (6,06%)	--
	NEGATIVA	31 (18,78%)						31 (18,78%)	
TOTAL	POSITIVA	21 (12,72%)	3 (1,81%)	2 (1,21%)	4 (2,42%)	5 (3,03%)	10 (6,06%)	45 (27,27%)	0,25
	NEGATIVA	56 (33,94%)	9 (4,456%)	22 (13,33%)	3 (1,81%)	12 (7,27%)	18 (10,90%)	120 (72,72%)	

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p=nivel de significancia

La variable pendiente se analizó para determinar posibles factores determinantes, se observa que en el municipio de Mariquita algunas fincas presentan porcentajes de pendiente entre 12 a 50%, encontrando que las fincas positivas están en su mayoría ubicadas en este rango. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre fincas positivas y negativas a mortalidad bovina, ni entre municipios. Los resultados se describen en la tabla 3.27.

## 3.4 Discusión

### 3.4.1 Descripción de los predios encuestados

Las fincas encuestadas en los municipios de Nemocón y Ubaté en este trabajo se distribuyen en forma similar a lo descrito por Pulido *et al.*, 2005 quien desarrolló un trabajo de caracterización de los sistemas de producción de leche del trópico de altura en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Este autor encontró que los sistemas de producción de lechería predominantes en la microrregión Valles de Ubaté y Chiquinquirá

corresponden a medianos productores (5 a 19 ha) que ocupan un área de 14 485,4 has, seguidos por los grandes (19 a 51 has), pequeños (< 5 has) y muy grandes (> de 51 has), los cuales participan con el 6,3 %, 5,5 % y 4,9 % de esta microrregión (Pulido *et al.*, 2005), situación comparable con lo encontrado en el municipio de Mariquita en donde también se indica una estructura minifundista con vocación agrícola y ganadera (Urpa, 2000). Las fincas del municipio de Ubaté presentaron el mayor número de potreros, característica que se relaciona con el grado tecnológico de la zona, ganadería especializada leche, aspectos que Pulido *et al.* (2005) reportaron en sus trabajos.

Por el contrario en el municipio de Puerto López se encontraron fincas con ganaderías de tipo extensivo, situación que está relacionada con los sistemas de producción de esta región del país (Ortiz, 2000). Las fincas de mayor extensión, las cuales tienen el menor número de potreros, se encontraron en el departamento del Meta, municipio de Puerto López, en donde sigue predominando la estructura latifundista en la que el 4,7% de los predios del departamento son mayores de 500 ha y abarcan el 72,8% de la superficie total del departamento (3'963.035 ha) en cifras suministradas por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (García, 1998). Con excepción de algunas explotaciones agrícolas comerciales y otros predios atendidos por pequeños y medianos productores en las vegas de los ríos, el resto del recurso suelo está dedicado a la explotación extensiva de la ganadería bovina con estructura netamente latifundista (García, 1998).

La ausencia de asistencia técnica calificada en los predios tiene un efecto directo en la adopción de tecnología y se relaciona con atraso en programas de salud animal, programas de mejoramiento genético, baja en los indicadores de producción y mal uso de los recursos. Dichos indicadores tienen un efecto directo en el aumento de la productividad del hato y se relaciona con el conocimiento científico y de tecnologías que garantiza la contratación de un profesional calificado, las cuales se podrían adoptar a más bajo costo con la ayuda del mismo (CIAT, 1978).

### **3.4.2 Forrajes y manejo de praderas**

Según Pulido *et al.*, 2005, la vegetación natural en la Microrregión del departamento de Cundinamarca, está compuesta por angiospermas siempre verdes. Existen muy pocos

bosques vírgenes. Los árboles más comunes son el eucalipto (*Eucalyptus globulus*), urapán (*Fraxinus sp*), acacia (*Acacia sp*). El uso del suelo actual está compuesto en su gran mayoría por pastos especialmente kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y praderas mejoradas con pastos como tetralites, alfalfa (*Medicago sativa*) y tréboles (*Trifolium repens* y *Trifolium alexandrinum*).

En el departamento del Meta se indica que la mayoría de pastos son introducidos y los más frecuentes en la zona son: *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria humidicola*, *Brachiaria dictyoneura*. Otros pastos introducidos incluyen *Arachis pintoy*, *Brachiaria brizanta*, Carimagua (*Andropogon gayanus*), Estrella (*Cynodun nlemfuensis*), Guinea (*Panicum maximun*), Janeiro (*Eriochloa polystachya*), Puntero (*Hyparrhenia rufa*). Los pastos nativos más frecuentes en la zona son guaratara (*Axonopus purpuss*), saeta (*Schyzachyrium hirtiflorum*) y sabana nativa (Ortiz, 2000).

### **3.4.3 Mortalidad, prevalencia de punto para fincas y tasa de mortalidad**

En el año 2000 en los departamentos de Vichada, Meta, Casanare y Arauca se había reportado una prevalencia global de punto para fincas de 35%, asociada a la epidemia de mortalidad bovina que se presentó en la última década del siglo anterior (Ortiz, 2000). A pesar de que la prevalencia de punto encontrada para fincas en este trabajo era menor no deja de ser preocupante el alto número de fincas afectadas, lo que genera indudablemente un impacto económico negativo para el productor y para el país.

Una prevalencia global para fincas por encima de la encontrada en este estudio fue reportada para el departamento del Meta, en el año 2000 (Ortiz, 2000), en un brote epidémico de mortalidad relacionado con botulismo bovino, en el que se declaró la emergencia sanitaria. Las clostridiosis deben ser una prioridad en los sistemas de salud animal del país. En trabajos anteriores (Caraballo, 1973) se indicaba que en nuestro medio las clostridiosis producían diversas enfermedades en especies animales mayores y menores que causaban grandes pérdidas económicas y se enfatizaba en la falta de métodos para un diagnóstico seguro.

En el informe técnico del Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica del Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Orjuela *et al.*, 2009), se indica que la prevalencia de animales afectados por clostridiosis incluyendo *Clostridium chauvoei* y otros clostridios, oscila entre 1,3% y 1,7%, valores que están por debajo de los encontrados en este trabajo pero que se aproximan a los encontrados en los municipios de Nemocón y Ubaté (Tabla 3.28).

**Tabla 3 28** Caracterización epidemiológica de fincas afectadas por mortalidad bovina. Especie bovina: Condiciones patológicas relacionadas con *Clostridium spp.*, diagnosticadas en Colombia y tasas de morbi-mortalidad. Colombia. 2007

CONDICION PATOLOGICA	PREDIOS AFECTADOS	POBLACION A RIESGO	INCIDENCIA x 100	MORTALIDAD x 100
CARBON SINTOMATICO	75	5778	2	1,3
Otras clostridiosis	29	3071	2	1,7

**Fuente:** Orjuela *et al.*, 2009, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.

Los valores encontrados en los municipios de Mariquita (3,05%) y Puerto López (4,25%) casi duplican las cifras descritas por el ICA. Esta situación se explica porque los reportes del sistema de vigilancia epidemiológica son los que llegan a los centros de diagnóstico y son valores que están por debajo de los que se encuentran a nivel de campo. Se reporta una incidencia de 2% para el año. En un estudio epidemiológico longitudinal en ganadería de carne, se demostró que la tasa anual de mortalidad debido a esta patología es en promedio 12,7% afectando principalmente hembras (Ortiz, 2000 b).

#### 3.4.4 Mortalidad, relación con otras variables determinantes

Algunos autores indican que la influencia de factores ambientales, socioeconómicos y de manejo son claves en la presencia y emergencia de enfermedades clostridiales (Blood, Radostits & Henderson, 1986; Seifert *et al.*, 1996).

Condiciones locales, tales como el tipo de manejo, la naturaleza del suelo y de la vegetación, la frecuencia relativa del organismo, la infestación por parásitos y la presencia de animales susceptibles, son factores importantes que determinan la incidencia de la presencia de Clostridiosis (BVA, 1976).

Las toxinas de clostridios, especialmente *Clostridium botulinum*, una vez producidas son capaces de sobrevivir por largos períodos, sobretodo en el interior de los huesos o cuando se la protege de alguna manera de la lixiviación (Blood, Radostits & Henderson, 1986). 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 (De Souza & Langenegger, 1987). La enfermedad tiende a presentarse en aquellas épocas del año en las que los forrajes contienen menores cantidades de éste elemento, lo que generalmente corresponde con la estación de las lluvias (Smith, 1977). Esta deficiencia se agudiza durante la gestación y la lactación, condiciones que aumentan la demanda de calcio y fósforo, razón por la cual se presenta en mayor proporción en animales en producción (vacas lactantes, animales gestantes), de muy buena condición corporal (Ortiz, 2000 b).

Existe alguna información disponible sobre la disposición de cadáveres de animales que mueren en las fincas por causas patológicas. El manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria de la FAO (1995), indica que si un animal muere sin ser sacrificado para consumo humano deberá eliminarse el cadáver. Los cadáveres deben eliminarse en las debidas condiciones para evitar la difusión de enfermedades; indican finalmente que los cadáveres deben enterrarse en un hoyo profundo o quemarse.

Sin embargo en la parte final del documento se recomienda preferiblemente enterrar los animales, lejos de las fuentes de agua, a 2 metros de profundidad y finalmente cercar la zona para evitar que animales o personas vayan al lugar de enterramiento. Con respecto a la quema de los cadáveres la situación es más compleja ya que se recomienda abrir un canal de 30 cm de ancho por 40 cm de profundo y el largo del animal. Se coloca paja y madera en el interior del canal con llantas de automóviles y encima se coloca el cadáver. Se cubre el animal con otra capa de llantas, paja y madera antes de rociar la pila con querosene o petróleo y prender fuego (FAO, 1995).

En la disertación del Dr. Nosedá, Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (2001), indica que la eliminación de cadáveres es una preocupación permanente de todo establecimiento que padece la enfermedad “muerte súbita” la cual no tiene manifestación

clínica evidente ya que cada animal muerto se transforma en una potencial bomba bacteriológica de contaminación del ecosistema ganadero. Si bien el 79% reconoce haber tomado alguna medida de eliminación, como enterrar 22% o quemarlo 57%, la mayoría de las veces esto solo se logra parcialmente. Buscar métodos eficientes y controlados de eliminación de cadáveres es un verdadero desafío. El método de “tapado controlado” con una cubierta plástica negra del cadáver sin cuerear con una capa de cal y sus bordes fijados por tierra, sería una alternativa que así cerrada por más de 180 días facilitaría la reducción del cadáver para su posterior quemado. Se están realizando evaluaciones de esta metodología a fin de medir su eficiencia (Noseda, 2001).

El método consiste en eliminar el animal muerto en el mismo lugar donde murió. Se fundamenta en hacer competir la flora bacteriana habitual presente en el rumen y en el intestino con las esporas de bacterias anaerobias esporuladas. Se prepara una solución de formaldehído al 5% y se empapa la superficie corporal del animal haciendo énfasis en los orificios naturales. El animal se cubre con un plástico negro “tapado controlado con polietileno” y se deja 240/260 días, tiempo suficiente para destruir posteriormente la materia orgánica del animal. Transcurridos los 240 días de tapado se procede a su desactivación por quemado (Noseda, 2001).

En Colombia se había indicado en trabajos previos la necesidad de desarrollar planes estratégicos de manejo en los hatos para concientizar al ganadero de la importancia de disponer de los cadáveres (Ortiz, 2000 b), ya que en sistemas de manejo extensivo los animales muertos no se entierran constituyendo una permanente fuente de contaminación de los ecosistemas. Se describieron algunos protocolos para disponer de cadáveres.

### **3.4.5 Variables bioclimáticas**

En todo el mundo la diversidad de especies microbianas principalmente se debe a la variabilidad de temperaturas tanto a nivel geográfico, alteración humana o estaciones ambientales; debido a esto el crecimiento a latencia de la célula depende del favorecimiento ambiental (Hansel, *et al.*, 2008).

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afecta el crecimiento y la supervivencia microbiana. Puede afectar a los microorganismos vivos de dos formas muy diferentes. A medida que la temperatura sube, las reacciones enzimáticas son más rápidas y el crecimiento se hace más rápido. Sin embargo por encima de cierta temperatura, las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pueden dañarse irreversiblemente. Por encima de este punto las funciones celulares paran. Por tanto, para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no existe crecimiento, una temperatura óptima a la cual el crecimiento es el más rápido posible y una temperatura máxima rebasada en la cual no existe crecimiento (Mandigan *et al.*, 2000).

Existen cuatro grupos microbianos en relación con su temperatura óptima: psicrófilos, con temperaturas óptimas bajas, mesófilos con temperaturas óptimas medianas, termófilos con temperaturas óptimas más altas e hipertermófilos con temperaturas más altas (Mandigan *et al.*, 2000).

El exceso de agua en el suelo suele causar encharcamiento y pérdida de oxígeno en los capilares del suelo lo que hace que disminuyan los microorganismos aerobios y aumenten los anaerobios (Escobar, 2009)

Las formas vegetativas de las bacterias son menos resistentes a la desecación que los hongos o los actinomicetos. Las endosporas termoestables producidas por las bacterias, como *Bacillus* y *Clostridium*, son resistentes a la desecación. El exceso de agua en el suelo suele causar encharcamiento y pérdida de oxígeno en los capilares del suelo lo cual hace que disminuyan los microorganismos aerobios y aumenten los anaerobios (Escobar, 2009).

La mayor precipitación en las fincas favorece el cambio de las esporas a sus formas vegetativas en un medio adecuado; los pastos tardan por lo menos de 45 a 60 días en recuperarse nuevamente, por lo cual los brotes de mortalidad se observan cuando los animales pastorean las praderas es decir en los meses de diciembre y enero. El mayor pico de precipitación se presentó en el mes de octubre, y dos meses después se relaciona la mortalidad en las fincas categorizadas positivas, en las cuales los niveles de lluvia fueron mayores.



Los terrenos pantanosos que están inundados, tienen poco oxígeno y contienen abundante materia orgánica en descomposición, lo que favorece el desarrollo de bacterias anaerobias (Escobar, 2009).

Las variables climáticas son factores determinantes asociados con la presencia de casos de Clostridiosis y deben relacionarse en los estudios epidemiológicos (Ortiz, 200 b). Algunos autores indican que en sus trabajos existe relación entre las variables climáticas, como precipitación, con los casos de mortalidad por bacterias Clostridiales. En Nigeria, Bagadi (1978), indica que la lluvia juega un papel importante ya que incrementa los casos de pierna negra. Smith *et al.* (1975, 1978) indican que la incidencia de *Clostridium botulinum* es mayor en ambientes acuáticos. Yamakawa & Nakamura (1992), indican que la mayor prevalencia de *Clostridium botulinum* en Japón se presenta en zonas relacionadas con ambientes húmedos, las riveras de los ríos.

#### **3.4.6 Variables relacionadas con las características del suelo**

El suelo no es un medio homogéneo y puede presentar diferentes pH entre micro hábitats (Escobar, 2009). La acidez o alcalinidad del suelo influye sobre el crecimiento microbiano. Algunos microorganismos se desarrollan mejor a pH alto 9-14 alcalófilos, mientras que otros a pH bajo 5-2 acidófilos, estos rangos pueden variar debido a la adaptabilidad de muchas cepas. Aquellos microorganismos que crecen en rangos de pH de 6-8 se llaman neutrófilos; hay que tener en cuenta que el pH intracelular debe permanecer próximo a la neutralidad, aunque el pH externo sea altamente ácido o básico. En muchos casos el microorganismo como consecuencia de su metabolismo crea un gradiente extracelular de iones  $\text{OH}^-$  ó  $\text{H}^+$  (Rico, 2004). Cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo muy bien definido. La mayoría de los ambientes naturales tienen valores de pH de 5,9 y los organismos con pH óptimo equivalente son los habituales (Mandigan *et al.*, 2000).

Trabajos realizados en Costa Rica (Gamboa *et al.*, 1993), encontraron que la presencia de *Clostridium* en los suelos era independiente del pH del suelo ( $p > 0,05$ ), situación que contrasta con lo encontrado en este trabajo donde un pH cercano a la neutralidad se

puede relacionar con la presencia de brotes de mortalidad en las fincas y por ello con la positividad de las mismas; dichos autores encontraron en el mismo trabajo que la presencia de *Clostridium* dependía de un bajo contenido de materia orgánica ( $p < 0,05$ ) situación equiparable con lo encontrado en este trabajo donde la mayoría de fincas positivas a mortalidad bovina se clasificaron en suelos clase III, de fertilidad natural moderada.

En trabajos realizados por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria en la microrregión de Ubaté, paisaje planicie, se encontró que se presentan en este paisaje diferentes zonas clasificadas por el tipo de pendiente, condición de drenaje y estado de erosión. Las zonas con pendientes menores a 25%, con drenaje anaerobio, sin erosión son las zonas donde hay mayor probabilidad de que hayan brotes de mortalidad y corresponde a las fincas que se registran positivas. Las zonas con pendientes superiores a 25% presentan un ambiente edáfico aerobio, por lo cual la probabilidad de encontrar brotes de mortalidad es menor y corresponden en su mayoría a las fincas reportadas como negativas a dicho evento (Pulido *et al.*, 2005).

La capacidad de uso es un ordenamiento que proporciona una información básica la cual muestra la problemática de los suelos bajo los aspectos de limitaciones de uso, necesidades y prácticas de manejo que requieren y también suministra elementos de juicio necesarios para la formulación y programación de planes integrales de desarrollo agrícola (Seidl, 1991; Pulido *et al.*, 2005; Corpoica, 2007).

Los suelos de la clase II son generalmente profundos, de textura franco a franco limosa, de topografía plana, bien drenada, retentiva al agua y de buena capacidad para el suministro de nutrientes vegetales. Presentan mediana fertilidad natural y generalmente buena capacidad productiva, siempre que se les provea en forma continuada de apropiados tratamientos agrícolas. Las pocas limitaciones hacen que requieran prácticas simples de manejo y de conservación de suelos para prevenir su deterioro o para mejorar las relaciones agua-aire cuando son cultivados en forma continua e intensiva. Las mayores limitaciones que presentan están vinculadas al proceso erosivo lateral que ocasionan las aguas de los ríos en creciente y a ligeros riesgos de inundaciones ocasionales (Seidl, 1991; Pulido *et al.*, 2005; Corpoica, 2007).

El manejo de estas tierras debe estar encaminado a la incorporación de material orgánico, como residuos de cosechas, compost, abonos verdes, fertilizantes nitrogenados de tipo orgánico o mineral en dosis adecuadas a las necesidades de los cultivos adaptados y establecidos de acuerdo con un programa racional de abonamiento; a la rotación de cultivos con inclusión de una leguminosa; a cultivos de cobertura con el fin de preservar la humedad del suelo; al control de la erosión lateral mediante la implantación de especies de raíces profundas y de amplia expansión radicular (Seidl, 1991; Pulido *et al.*, 2005; Corpoica, 2007).

Los suelos clase III incluyen suelos aluviales recientes, planos, profundos, de textura arenosa a franco arcillosa, de reacción moderadamente ácida a neutra y de fertilidad natural moderada. Los problemas de manejo de ésta clase están relacionados básicamente con las inundaciones periódicas ligeras en época de creciente, y además se observa cierta dificultad del movimiento del agua a través del suelo (Seidl, 1991; Pulido *et al.*, 2005; Corpoica, 2007). Otro problema que atenta contra la integridad física de estos suelos es la erosión lateral que ocasiona considerables dislocamientos de volúmenes de tierra por efecto de las crecientes o desbordamientos de los ríos en la época lluviosa (Seidl, 1991; Pulido *et al.*, 2005; Corpoica, 2007).

La utilización de estas tierras está orientada al cultivo de especies agronómicas de corto período vegetativo cuyo ciclo de desarrollo no coincida con las crecientes periódicas o estacionales, tales como maíz, legumbres y hortalizas (Seidl, 1991; Pulido *et al.*, 2005; Corpoica, 2007).

La adsorción de los microorganismos a partículas de suelo está relacionada con las propiedades físicas del suelo. Los fragmentos de roca y minerales presentes en el suelo varían en tamaño: Arena gruesa entre 200 – 2000 micrómetros de diámetro; Arena fina entre 20 – 200 micrómetros de diámetro; Limo entre 2 – 20 micrómetros de diámetro; Arcilla menor de 2 micrómetros de diámetro. Los principales componentes que afectan la adsorción microbiana son la materia orgánica y las partículas de arcilla (diámetro < 2 micrómetros). Los suelos se dividen según su textura en arenoso arcillosos (35% o más de arcilla y 45% o más de arena), limo arcillosos (40% de arcilla y 40% o más de limo), margosos o francos (contienen igual proporción de arena, limo y acilla), ideales para agricultura. En general la textura del suelo influye en las comunidades de

microorganismos porque de ella depende la aireación y la disponibilidad de agua (Escobar, 2009). La mayoría de suelos incluidos en este estudio corresponde a suelos francos.

Aunque los microorganismos son ubicuos, en pocas situaciones existen poblaciones iguales. Nunca se dan condiciones ambientales idénticas: Las que favorecen la reproducción de un microorganismo, o permiten la sobrevivencia de otro, pueden ser desfavorables para la existencia continuada de un tercero (Escobar, 2009).

Nuevamente se destaca la necesidad de buscar métodos eficientes y controlados de eliminación de cadáveres. Se insiste en utilizar el método de “tapado controlado” el cual se discutió anteriormente como alternativa para nuestros sistemas de producción, mientras se evalúan otro tipo de alternativas más eficientes (Nosedá, 2001).

## 4. Conclusiones

En las fincas seleccionadas con casos de mortalidad bovina se aislaron especies patógenas de clostridios.

El reconocimiento de las especies de clostridios que actúan en las fincas donde se presentan brotes de mortalidad facilita la toma de decisiones encaminadas a la oferta específica de paquetes preventivos e intervenciones clínicas para el sector ganadero de las zonas afectadas.

Al comparar los resultados de los aislamientos de clostridios realizados por métodos genéticos y fenotípicos se encontró una relación del 54%, siendo esta última metodología menos sensible. Sin embargo los métodos fenotípicos son complementarios de los métodos genotípicos y un buen uso de ellos redundaría en la optimización de los resultados.

El análisis de la secuencia del ARNr 16S se constituyó en una herramienta muy útil para la identificación de las especies patógenas de clostridios presentes en las muestras de suelo de las fincas afectadas por mortalidad bovina y para determinar la variabilidad entre ellas. La adopción de dichas técnicas por parte de los laboratorios y las instituciones de los servicios, implican actualización de los equipos y entrenamiento del recurso humano. Con lo anterior se ofrecería una alternativa muy importante para asesores y productores.

Se establecieron indicadores de prevalencias globales y de punto para clostridiosis en las regiones afectadas. Dichas cifras se deben manejar con cautela ya que representan las zonas que se incluyeron en este estudio y no son el reflejo de otras. Dichos indicadores, constituyen una línea base para la verificación y posterior comparación en otros estudios epidemiológicos que se desarrollen.

Los resultados encontrados en este estudio confirman que la prevalencia en animales se puede correlacionar con los valores de variables climáticas como temperatura y precipitación. El municipio con mayores valores de temperatura y precipitación fue el municipio de Puerto López, en el que se encontró la mayor prevalencia de animales afectados. Situación similar se encontró para los otros municipios donde los valores de variables climáticas podrían demostrar correlación con los valores de prevalencia.

El análisis de la información sugiere que los grupos etarios con riesgo de adquirir clostridiosis resultaron ser las poblaciones de novillas y de vacas horras, lo que corrobora lo encontrado en otros estudios donde se indica que este grupo de animales es el de mayor riesgo.

Se puede sugerir también que la eliminación inadecuada de cadáveres es un factor que se puede convertir en riesgo. Sobre este factor se debería investigar y profundizar más para establecer protocolos adecuados que permitan minimizar la presentación de brotes epidémicos de mortalidad súbita.

De la misma forma el análisis de la información sugiere que el pH del suelo se relaciona en el municipio de Nemocón con la positividad de las fincas, situación que podría ser de utilidad en esta zona para sugerir medidas correctivas que permitan disminuir los brotes de mortalidad.

La mayoría de fincas positivas a mortalidad se clasificaron en suelos clase III, indicando que son suelos aluviales recientes, profundos, de textura arenosa a franco arcillosa, de reacción moderadamente ácida a neutra con problemas de manejo relacionados con las inundaciones y con la dificultad del movimiento del agua a través del suelo, situación que sugiere ampliamente los planteamientos expresados a lo largo de éste trabajo.

## 5. Recomendaciones

Los protocolos de las metodologías de aislamiento y caracterización fenotípica y genética estandarizadas en este trabajo pueden ser transferidos a los centros de diagnóstico para que se difunda su uso a los productores.

Realizar estudios moleculares de otros genes (productores de toxinas) en este género con el propósito de entender más su fisiología y aplicar dichos conocimientos en su prevención y control.

Las bacterias aisladas se pueden utilizar en la innovación de futuros métodos de diagnóstico que permitan establecer adecuadamente la causa de la muerte de los bovinos y en el establecimiento de programas preventivos basados en la preparación experimental de inmunógenos (bacterinas y toxoides).

Es necesario estudiar en otras zonas la relación de los brotes de mortalidad con el tipo de suelos y con las variables climáticas para conocer la historia natural de las bacterias y los factores determinantes que desencadenan su presentación. Los estudios epidemiológicos se deben desarrollar en diferentes épocas y deben convertirse en prioridad para las autoridades sanitarias.

Es necesario evaluar la sensibilidad y la especificidad de los métodos tradicionales de aislamiento y la caracterización de bacterias anaerobias, ya que se encontraron diferencias marcadas entre los métodos bioquímicos y los métodos moleculares. Sin embargo se establece la necesidad de ambos métodos y la racionalidad de su uso.

Las pruebas de toxicidad en ratones y en cultivos celulares demostraron que las bacterias producen toxinas altamente letales, por lo que se hace necesario desarrollar

estrategias de investigación con el fin de verificar cual es el verdadero impacto que están ocasionando en los sistemas de producción.

Con base en el establecimiento de los agentes etiológicos y el conocimiento de su distribución, se deben desarrollar paquetes de transferencia a los productores que determinen: los calendarios de vacunación, tipos de inmunógenos a utilizar, medidas de manejo relacionadas con aspectos nutricionales, disposición de cadáveres y en general buenas prácticas ganaderas que redunden en disminuir sus pérdidas económicas



## 6. Bibliografía

Alba A., P. (2011) *Clostridium difficile*. Prevalencia e importancia ecológica en animales domésticos y fauna salvaje. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. 308 p. ISBN 978-84-694-3358-4

Asociación Nacional de Productos Veterinarios Aproveet (2011). Vademécum Veterinario. <http://www.aprovet.com/index.html>

Bagadi HO. (1978). The relationship between the annual rainfall and the outbreaks of blackquater in northern Nigeria. *Tropical Animal Health Products*;10:124±6.

Balding, P., E. R. Gold, D. A. Boroff, and T. A. Roberts (1973). Observations on receptor specific proteins. II. Haemagglutination and haemagglutinationinhibition reactions of *Clostridium botulinum* types A, C, D and E haemagglutinins. *Immunology* 25:773–782.

Barash, J. R., & Arnon, S. S. (2004). Dual toxin-producing strain of *Clostridium botulinum* type Bf isolated from a California patient with infant botulism. *J. Clin. Microbiol.* 42:1713–1715.

Benavides O., E. V. (1995). Epidemiología de agentes bacterianos causantes de enfermedad en los animales domésticos. Evolución conjunta de la relación huésped parásito. *Revista ACOVEZ*. 20(4), 25-32.

Benavides O., E.; Londoño B., M.; Ortiz O., D.; Cruz R., L.; Britto A., C.M.; Romero N., A. & Salazar, S. C. (1996). *Clostridium botulinum* y su relación con el Síndrome Parapléjico Bovino en la Orinoquia 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, pp. 18.

Benavides, E.; Duque, D.; Estupiñan, 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). p.17.

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 O., E.; Ortiz O., D.; Duque, D.; Estupiñan, C.; Altuzarra B., R.; & Benavides A., J. (1998). Research efforts to Identify the causative agent of an Outbreak of Bovine Paraplegic Mortality in the Eastern Plains of Colombia. In: "Abstracts of the European Clostridia Conference", 1<sup>st</sup> International Conference on Identification and Immunobiology of Clostridia, Diagnosis and Prevention of Clostridiosis. Teistungen/Germany. 4 -7 October, 1998. (<http://www.gwdg.de/~fgessle/ecc/scipro.htm>).

Benavides, E.; Ortiz, D. & Benavides, J. (2000). Association of Botulism and Tetanus as Causative Agents of an Outbreak of Bovine Paraplegic Mortality in the Eastern Plains of Colombia. Annals of the New York Academy of Sciences 916, 646-649.

Benavides O., E. (2003). Causas de muerte súbita en bovinos en pastoreo en las sabanas de América Tropical. Sitio Argentino de producción Animal. Enfermedades Infecciosas de los bovinos en general. [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/)

Benavides O., E. (2004). Causas de muerte súbita en bovinos en pastoreo en las sabanas de América Tropical. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 17 (2): 182 – 192.

Biberstein, E. & Chung Zee, Y. (1994). Tratado de Microbiología Veterinaria. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza, España. 1994. pg 337.

Bizzini, B. (1986). *Clostridium tetani*. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Chapter 8. (Gyles, C. L. & Thoen, C. O., eds.). Iowa State University Press, Ames. pp.69-74.

Blood, D.C.; Radostits, O.M. & Henderson, J.A. (1986). Medicina Veterinaria. Traducción de la Sexta Edición Inglesa con contribuciones de J.H. Arundel y C.C. Gay. Nueva Editorial Interamericana, México. 1441p.

Borrmann, E.; Schulze, F.; Cussler, K.; Hänel, I. & Diller, R. (1999). Detection of *Clostridium novyi* type B,  $\alpha$  toxin by cell culture system. FEMS Immunology and Medical Microbiology. (24): 275-280.

Borrmann, E.; Schulze, F.; Cussler, K.; Hänel, I. & Diller, R. (2006). Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination –induced antibodies in rabbit sera against *Clostridium perfringens* epsilon toxin and *Clostridium novyi* alpha toxin. Veterinary Microbiology 114: 41-50.

Bou, G.; Fernández O., A.; García, C.; Sáez, J. & Valdezate, S. (2011) Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecciosas. Microbiología Clínica. 29: 601-8 Vol 29 No.08.

British Veterinary Association, BVA (1976). Handbook of Animal Diseases in the Tropics. Third Edition (Edited by Prof. Sir Alexander Robertson). Burgess & Son Ltd., Oxfordshire. 304p.

Caraballo G., L. C. (1973). Identificación y clasificación de cepas de *Clostridium*. Tesis Presentada al Programa de Estudios para Graduados Universidad Nacional de Colombia – Instituto Colombiano Agropecuario. Requisito para optar el grado de Magíster Scientiae. Bogotá, 46 p.

Caraballo, L. C.; Manrique, G. & Ochoa, R. (1980). Identificación y Clasificación de cepas de *Clostridium*. Revista ICA. Pg. 469-476.

Carter, G.R. & Chengapa, M.M. (1991) Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Fourth Edition. Lea & Febiger, London. 304 p.

Carter, G. P.; Purdy, D.; Williams, P. & Minton, N. P. (2005). Quorum sensing in *Clostridium difficile*: analysis of a luxS-type signalling system. Journal of Medical Microbiology . (54): 119–127.

Casteel, M. J.; Sobsey, M. D. & Muller, J. P. (2006). Fecal contamination of agricultural soils before and after hurricane-associated flooding in North Carolina. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering, 41(2): 173 – 184.

Cerda L., J.; Valdivia C., G.; Valenzuela B., M. T. & Venegas L., J. (2008). Cambio climático y enfermedades infecciosas. Un nuevo escenario epidemiológico. Revista Chilena de Infectología. 25(6): 447 – 452.

Chaves, F.; León, G. & Hernández, F. (2006). Detección inmunoenzimática de la toxina de la bacteria *Clostridium tetani*: una alternativa a las pruebas biológicas con ratones. Revista de Biología Tropical. ISSN 0034-7744. Vol. 54 (2): 253-256.

CIAT, (1978). Informe Anual. Editor: Alejandro Jiménez C. Impreso por la Unidad de Comunicaciones del CIAT. Cali (Colombia). 138 p.

Collins, M. D.; Lawson, P. A.; Willems, A.; Córdoba, J. J.; Fernandez-Garayzabal, J.; Garcia, P.; Cai, J.; Hippe, H. & Farrow, J. A. E. (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 44, No. 4. p. 812-826

Collins, M. D., and East A. K. (1998). Phylogeny and taxonomy of the foodborne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. J Appl. Microbiol. 84:5-17.

Coraspe H. & Tejera S. (1996). Procedimiento para la toma de muestras de suelos. FONAIISP Divulga, 54. Disponible en línea <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/Revistatecnicas/FonajapDivulga/fd54/suelos.htm> (Consulta: Julio 2007).

CORPOICA, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (2007). Base de Datos de Suelos. Programa Nacional de Agroecosistemas. Subdirección de Sistemas de Producción [www.corpoica.org.co](http://www.corpoica.org.co)

CT-417 Bariloche. (2002). Aislamiento y caracterización de cepas de *Clostridium botulinum* Tipos C y D en el Brasil. Revista de Medicina Veterinaria. Vol 83(2): 55-58.

Dean, A.; Dean, J.; Burton, A. & Dicker, R. (1992). Epi Info, versión 5. Epidemiología con microordenadores. Division of Surveillance and Epidemiology. Epidemiology Program Office. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia 30333. U.S.A. Traducido por: Fernández M., J.C. Departamento de Evaluación de la Salud, Sevilla (España). 243 p.

De Blas I.; Ortega C.; Franjea K.; Noordhuizen J. & Trusfield M. (1998). WinEpiscope 2.0. Departamento de Patología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Zaragoza (España); Department of Animal Sciences of Wageningen Agricultural University (The Netherlands). <http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope>.

De Kievit, T. R. & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. Infection and Immunity, 68: 4839-4849

Delmee M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V (2005). Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol* 54:187–191.

De Souza, A.M. & Langenegger, J. (1987). Esporos de *Clostridium botulinum* em torno de cadáveres decompostos de bovinos em pastagens no sul de Goiás. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(1):17-22.

Dobbs, L. & Madigan, M. (2002). Use of FTA gene guard filter paper for the storage and transportation of tumor cells for molecular testing. *Arch Pathol Lab Med.* 126(1): 56-63.

Dowel, V. & 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. 94 p.

Dürre, Peter (2005). Handbook on Clostridia. CRC Press Taylor & Francis Group, LLC. ISBN 0-8493-1618-9. 828 pp.

East, A. K.; Stacey, J. M. & Collins, M. D. (1994). Cloning and sequencing of a hemagglutinin component of the botulinum neurotoxin complex encoded by the *Clostridium botulinum* types A and B. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:306–312.

East, A. K.; Bhandari, M.; Stacey, J. M.; Campbell, K. D. & Collins M. D. (1996). Organization and phylogenetic interrelationships of genes encoding components of the botulinum toxin complex in proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B, and F: evidence of chimeric sequences in the gene encoding the nontoxic nonhemagglutinin component. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:1105–1112.

Eklund, M. W.; Poysky, F. T.; Reed, S. M. & Smith, C. A. (1971). Bacteriophage and the toxigenic of *Clostridium botulinum* type C. *Science*, Vol 172. 3982: 480-482.

Escobar R., M. C. (2009). Microbiología del suelo. Universidad de Antioquia. 94 p. <http://www.vanguardia.udea.edu.co/cursos/salud%20y%20ambiente/clases%20TEORIA/MICROBIOLOG%C3%ADa%20del%20suelo.ppt>.

Ferraris, G. N. (2005). Muestreo y Análisis de Suelo: Punto de partida hacia un diagnóstico de fertilidad. *Desarrollo Rural INTA*. <http://www.elsitioagricila.com/>

Ferreira Ragazani, Adriana Valim. (2007). Ocorrência de Clostrídios patogênicos em solo de pastagem da micro-região de Jaboticabal, SP. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Campus de Jaboticabal. Tesis de Doctorado. Microbiología Agropecuaria. 87 p.

Finegold, S. M. (1989). Diagnóstico Microbiológico Bailey Scott. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pg. 484-485.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, (1995). Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria. M-27 ISBN 92-5-303258-8. <http://www.fao.org/docrep/t0690s/t0690s00.htm#Contents>. Roma, Italia.

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. & 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 & Mazuera, M. E. Medellín Colombia. 443 p.

Fondo Nacional Del Ganado (Federación Colombiana de Ganaderos) (2006). Base de Datos Predios. Ciclo de Vacunación Fiebre Aftosa. (Suministrado por Ismael Zúñiga). [www.fedegan.org.co](http://www.fedegan.org.co).

Gamboa, M. D.; Rodríguez, E. & Fernández, B. (1993). *Clostridium botulinum* en suelos de Costa Rica. Revista de Biología Tropical 41 (3): 359-363.

Gamboa, M.; Rodriguez E. & Vargas P. (2005). Diversity of mesophilic in Costa Rican soils. Ecology/Environmental microbiology. Anaerobe (11): 322-326.

García G., E. (1998). Problemas Agrarios de la Orinoquía. Centro de Estudios Para el Desarrollo regional (CEDER). Primera Edición. Editorial Siglo XX. Villavicencio (Meta). 69 p.

Garrity, G. M.; Lilburn, T. G.; Cole, J. R.; Harrison, S. H., Euzéby, J. & Tindall, B. J. (2007). Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7. March 6, 2007. Part 7 – The Bacteria: Phylum “Firmicutes”: lass “Clostridia”. Copyright Michigan State University. 316 pp.

Gimenez, D. F., & Gimenez, J. A. (1993). Serological subtypes of botulinal neurotoxins, p. 421–431. In B. R. DasGupta (ed.), Botulinum and tetanus neurotoxins. Plenum Press, New York, NY.

González Ch., H. E.; Rodriguez M., G. & Orrego U. Alberto (1980). Enterotoxemia de los Equinos. Documento de trabajo código 10.6.-021-80. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Subgerencia Investigación. División Ciencias Veterinarias. 32 p.

Govind R.; VEDIYAPPAN G.; Rolfe R. D.; Dupuy B. & Joe F. (2009) Bacteriophage – Mediated Toxin Gene Regulation in *Clostridium difficile*. Journal of Virology. . Vol 83. 23: 12037-12045.

Gregory A.R.; Ellis T.M.; Jubb, T.F.; Nickels, R.J. & Cousins, D.V. (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, 55-61.

Gregory A. & Main D. (1996). Serological diagnosis of Botulism in dairy cattle. Austrian Veterinary Journal 73(2): 77-78.

Gyles, C. L. (1986). Histotoxic Clostridia. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Chapter 8. (Gyles, C. L. & Thoen, C.O., eds.). Iowa State University Press, Ames . pp. 75-79.

Hall, I. C. (1929). The occurrence of *Bacillus sordellii* in icterohemoglobinuria of cattle in Nevada. J. Infect. Dis. 45: 156-162.

Hansel, C. M.; Fendorf S.; Jardine P.M. & Francis C. A. (2008). Changes in bacterial archeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. Department of Geological and Environmental Sciences, Stanford University, Stanford, California.

Hariharan, H. & Mitchell, W. R. (1977). Type C botulism: agent, host spectrum and environment. Veterinary Bulletin 47(2): 95-103.

Hatheway, C. L. (1988). Botulism. In: Laboratory diagnosis of infectious diseases, Volume 1, Chapter 12. (Balows, A.; Hausler Jr., W. J.; Ohashi, M. & Turano, A. eds.). Springer – Verlag, New York . Pp. 11-133.

Hatheway, C.L. (1990). Toxigenic Clostridia. Clinical Microbiology Reviews 3(1): 66-98.

Hauschild, A. H. W. (1989). *Clostridium botulinum*, p. 112-189. In M. P. Doyle (ed.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York.

Hernández, F.; Chaves, F.; Umaña, M. (2001). Aislamiento de *Clostridium tetani* en la ciudad de Puntarenas, Costa Rica y el fenómeno de Swarming. Revista Biomedic. Vol. 12. p. 80 – 84.

Hijmans R. J.; Guarino, L.; Bussink, C.; Mathur, P.; Cruz, M.; Barrantes, I. & Rojas E. (2004). DIVA-GIS. Versión 5.2. Sistema de Información Geográfica para el Análisis de Datos de Distribución de Especies. Porciones de este programa son de propiedad de LizardTech, Inc., y son copyright © 1995-1998, LizardTech, Inc.; y/o de University of

California, Patente U.S. No. 5,710,835. Todos los derechos reservados. <http://www.diva-gis.org>.

Hijmans, R. J.; Cameron, S. E.; Parra, J. L.; Jones, P. G. & Arvis A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. **25**: 1965–1978.

Hill B.; Skerry J C; Smith T J; Arnon S S & Douek D C (2010) Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. *BMC Microbiology*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/267>

Isenberg, H. D. (1998). *Essential procedures for clinical microbiology*. American Society for Microbiology. 1325 Massachusetts Avenue, N. W. Washington D.C. ISBN 1-55581-125-6. 520 pp.

Janvilisri, T.; Scaria, J.; Gleed R.; Fubini, S. Bonkosky, M. ; Gröhn, Y. & Chang Y. (2010). Development of a microarray for identification of pathogenic *Clostridium spp.* *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66 (2010) 140–147.

Jones, T. & Hunt, R. (1990). *Patología Veterinaria*. Editorial Hemisferio Sur S.A. Primera Edición en español de la 5a. edición en inglés. Traducido por LIGHTOWLER, C. Buenos Aires (Argentina). 1761 p.

Jóźwiak J.; Komar A.; Jankowska E. & Martirosian G. (2005). Determination of the cytotoxic effect of *Clostridium histolyticum* culture supernatant on HeLa cells in the presence of protease inhibitors. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. (45): 137-142.

Just, I.; Selzer, J.; Hofmann, F. ; Green, G. A. & Aktories, K. (1996). Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* Lethal Toxin-catalyzed Glucosylation. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, No. 17, 10149–10153 pp.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**:111-120.

Kohler, B. & Beer, J. (1983). *Infecciones e intoxicaciones por Clostridios. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos*. Tomo II. (Traducido del Alemán por ESCOBAR, J.) Editorial Acribia. Zaragoza (España).342 p.



Kojima, A.; Uchida, I.; Sekizaki, T.; Sasaki, Y.; Ogiku, Y.; Kijama, M. & Tamura, Y. (2000). Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Microbiology*. 76: 359-372.

Kuhnert, P.; Capaul, S. E.; Nicolet, J. & Frey, J. (1996). Phylogenetic Positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16s rRNA Gene Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 46, No. 4. 1174-1 176 p.

Langenegger, J.; Dobereiner, J. & Tokarnia, C. H. (1983). Botulismo epizóotico em bovinos no Brasil. *Agropecuária Ciba-Geigy*, 20: 22-26.

Lindstrom M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H (2001) Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl Environ Microbiol* 67:5694–5699.

Lobato, F. & Assis, R. A. (2005). Clostridioses dos Animais. II Simpósio Mineiro de Buiatria. II Minas Gerais Buiatrics Symposium. 06 a 08 de outubro de 2005 October 6th to 8th, 2005. Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil. This manuscript is reproduced in the IVIS website with the permission of Associação de Buiatria de Minas. Gerais (ABMG). 12 p.

Londoño F., J. L. (1996). Metodología de la Investigación Epidemiológica. Editorial Universidad de Antioquia. Yuluka Salud Pública. Primera reimpressão. Medellín (Colombia). 271 p.

MacLennan, J. D. (1962). The histotoxic clostridial infections of man. *Bacteriol. Rev.* 26:177-276.

Mainil, J.; Duchesnes, C.; Pelkonen, S.; Dubreuil, L. & Menozzi, M. G. (2003). Clostridia in health and diseases. Concerted Action QLK2-CT2001-01267. "Pathology and Ecology of the Genus *Clostridium* in Humans, Animals, and Foodstuffs: Identification, Epidemiology and Prophylaxis". <http://www.genusclostridium.net>

Malagon, D.; Cortes, M.; Pichott, J.; Useche, L.; Guevara, J.; Cortes, M.; Callejas, H.; Castellanos, J.; Carvajal, F.; De Becerra, S.; Pulido, C.; Marulanda, J.; Ortega, D.; Burgos, L; Rodríguez, H.; Roveda, G.; Olmos, H.; Montenegro, H.; Palacino, A.; Sinning, G.; Bernal, A.; Cortes, A.; De Carvajal, C.; Salzburg, A.; Salazar, G.; Posada, M. & Barón, C. (1988). Suelos y Bosques de Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Ministerio de Hacienda y Crédito Público. Subdirección Agrícola. Bogotá, D.E. (Colombia). 134 p.

- Munang'andu, H.; Muyoyeta, P.; Mweene, A.; Kida, H. (1996). Infecciones Clostridiales Bovinas en Zambia. *The Japanese Journal of Veterinary Research* 44(3), 175-178.
- Mandigan M.; Martinko, J. & Parker J. (2000). Brock. Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall. Madrid – España.
- Martin, S. W.; Meek, A. H. & Willebreg, P. (1997). Epidemiología Veterinaria. Principios y Métodos. Traducido por Tarazona Vila José M<sup>a</sup>. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España). 384 p.
- Martínez B., R. & Martínez R., N. (1997). Diseño de Experimentos. Análisis de Datos Estándar y no Estándar. Fondo Nacional Universitario. Editorial Guadalupe Ltda. Bogotá (Colombia), 479 p.
- Martínez, M.; Laulhe, I. (2011). Un problema a prevenir: La ruta del clostridio. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 19 (231), 10-18.
- Molina, L. (1995). La edad de la langosta. *Revista Credencial* 63: 10-13.
- Mudenda, B.; Isogai, E.; Lungu, J.; Mubita, CH.; Nambota, A.; Kirisawa, R.; Kimura, K.; Isogai H. (2000). Detection and characterization of *Clostridium* species in soil of Zambia. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*. Vol 23. p 277-284.
- Mullenax, C. (1982). Cattle disease Unique to the Altillanura of the Eastern Plains (Llanos) of Colombia. *Bovine Practice* 3(2): 16-25.
- Mullenax, C. (1983). Informe técnico. Nota sobre la causa y el tratamiento de la secadera. *Carta Ganadera* 20(10): 7-10.
- Nakayama, J.; Akkermans A. & De Vos W. M. (2003). High-throughput PCR Screenng of Genes for Three-component Regulatory System Putatively in Quórum Sensing from low-G + C Gram – positive Bacteria. *Journal Bioscience. Biotechnology Biochemical* 67 (3): 480-489.
- New, M.; Lister, D.; Hulme, M. & Makin, I. (2002). A high-resolution data set of surface climate over global land areas. *Climate Research*. 21:1-25.
- Nosedá, R. P. (2001). Carbuncho bovino y su relación con la enfermedad humana. Disertación del Dr. Ramón P. Nosedá – Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. [http://www.laboratorioazul.com.ar/laboratorioazul/html/carbuncho/disertacion\\_carbuncho\\_ovino\\_relacion\\_enfermedad\\_humana.html](http://www.laboratorioazul.com.ar/laboratorioazul/html/carbuncho/disertacion_carbuncho_ovino_relacion_enfermedad_humana.html)

Obregon Torres, D. (2002). Batallas contra la lepra: Estado, Medicina y Ciencia en Colombia. Banco de la República– Fondo Editorial Universidad EAFIT, Medellín, 2002. Pp. 422.

Orjuela M., J. E.; Díaz M., O. L. González G., P. M.; Ortiz C., J.; Monroy G., W. E. & Patiño A. A. (2009). Informe Técnico. Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica Colombia, Sanidad Animal, 2008. Instituto Colombiano Agropecuario. Subgerencia de Protección y Regulación Pecuaria. Grupo de Epidemiología Veterinaria. Editorial Produmedios. ISSN: 1794-547X. 122 p.

Ortiz O., D. (2000, a). 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. (2000, b). 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.; Villamil J., L. C. & Benavides O., E. V. (2001, a). 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), 64.

Ortiz O., D.; Villamil J., L. C. & Benavides O., E. V. (2001, b). 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), 63-64.

Ortiz O., D. & Benavides O., E. V. (2002, a). 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. & Benavides O., E. V. (2002, b). Hallazgos histopatológicos en bovinos naturalmente afectados por el síndrome neuroparalítico en la Orinoquía colombiana. Revista colombiana de ciencias pecuarias. 15(1):107-114.

Ortiz, D & Benavides, E. (2004). Epidemiología, Diagnóstico y Control del Botulismo Bovino en Colombia. Artículos Científicos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. www.corpoica.org.co. 13 pp.

Ortiz O., D.; Toro O., R. D.; Ossa, J. H.; Montoya F., F. J.; Carden, M. A.; Ladino A., L.; Henao. L. & 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. Vol 1 (4): 11-21. ISSN 1657-6772.

Ortiz O. D. & Villamil J., L. C. (2008). Bacterias anaerobias de los suelos responsables de la muerte súbita bovina en sabanas tropicales: investigaciones realizadas en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria (2008) 9(1), 102-112. ISSN 0122-8706. <http://www.cabi.org>

Ortiz D.; Betancourt J. A.; Martínez R. A.; Torres M. (2011). Cambio climático y fluctuaciones de Clostridios patógenos asociados al suelo. Relación con enfermedades animales causantes de mortalidad súbita en bovinos de leche (*Bos taurus*) [http://www.agronet.gov.co/www/recursos\\_2011/documentos\\_cambio/doc2.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/recursos_2011/documentos_cambio/doc2.pdf). 136 p.

Otte, J. (1991). El diseño de investigaciones epidemiológicas. Proyecto Colombo Alemán, Introducción de un sistema de asistencia técnica integral pecuaria, GTZ, ICA, UNISALLE. Centro Internacional de Capacitación en Desarrollo Pecuario. CICADEP. Santafé de Bogotá, Colombia. 40 p.

Parra, J.; Barrera, J.; Diaz, E.; Valencia, M. & Acevedo, L. (1993). Diagnóstico, tratamiento y control de mortalidad bovina en el Municipio de la Primavera. Banco de Proyectos de Inversión. Departamento del Vichada. Departamento Administrativo de Planeación. 8 p.

Parra, J.; Olarte, F.; Barrera, J.; & Acevedo, L. (1996). Diagnóstico y alternativas de control al problema de la mortalidad bovina en un área del Departamento del Vichada. Informe final. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. (Ed.) Villavicencio (Meta).

Parra, J.; Olarte, F.; Barrera, J. & Acevedo, L. (1997). Mortalidad bovina en la Altillanura del Vichada. Informe técnico No. 01. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Regional 8. Edición César Augusto Jaramillo Salazar, Programa regional Métodos de Transferencia de Tecnología Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Regional 8. Documento financiado por Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA, regional Meta y Orinoquía. Villavicencio (Meta). 57 p.

Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 8789-8793

Peterson LR, Kelly PJ, Nordbrock HA (1996) Role of culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15:330–336.

Perry, B.; McDermott, J. & Randolph, T. (2001). Can epidemiology economics make a meaningful contribution to national animal-disease control?. *Preventive Veterinary Medicine*. 48: 231-260.

Popoff, M., & Marvaud J.-C. (1999). Structural and genomic features of clostridial neurotoxins, p. 202–228. *In* J. E. Alouf and J. H. Freer (ed.), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Academic Press, London, United Kingdom.

Potes, L. F. (2005). Megadiversidad. AUPEC. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. <http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota63.htm>. [aupec@mafalda.univalle.edu.co](mailto:aupec@mafalda.univalle.edu.co)

Pulido H., J. I. (2005). Caracterización de los sistemas de producción de leche del trópico de altura de los departamentos de Boyacá y Cundinamarca. Informe Técnico Final. Corpoica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 112 p.

Pumarola, A.; Rodriguez T., A.; Garcia R., J.A. & Piedrola A., G. (1984). *Microbiología y Parasitología Médica*. Salvat Editores. Barcelona (España). 885 p.

Quimn, P. J.; Markey, B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2004). *Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias*. Editorial Acribia, S. A. Pp. 30.

Quinnand, P.J. & Markey, B.K. (2003). *Concise Review of Veterinary Microbiology*. Editorial Blackwell Publishing. Oxford, UK. 120 p. ISBN 1-4051-08983.

Rogers, C.; Burgoyne, L. (2000). Reverse transcription of an RNA genome from databasing paper (FTA<sup>®</sup>). *Biotechnol Appl Biochem*. 31 (Pt 3): 219-224.

Santos-Buelga, J. A.; Collins, M. D. & East, A. K. (1998). Characterization of the genes encoding the botulinum neurotoxin complex in a strain of *Clostridium botulinum* producing type B and F neurotoxins. *Curr. Microbiol*. 37:312–318.

Sasaki, Y; Yamamoto, K; Kojima, A; Tetsuka, Y; Norimatsu, M. & Tamura, Y. (2000). Rapid and direct detection of *Clostridium chauvoei* by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. *Journal Veterinary Medicine Science*. 62 (12): 1275-1281.

Sasaki Y.; Takikawa N.; Kojima A.; Norimatsu M.; Susuki S. & Tamura Y. (2001). Phylogenetic positions of *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* based on 16S

rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (51): 901-904.

Sasaki Y.; Yamamoto K.; Tamura Y. & Takahashi T. (2001). Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordelli* isolated from cattle affected with malignant edema. *Veterinary Microbiology* (83): 61-69.

Seidl, A. (1991). Guía para la evaluación de suelos y valoración de sitios. Traducción de la guía original "Land Evaluation and site assessment", elaborada por el Servicio de Conservación de Recursos Naturales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Traducido por Engler P., A. & Munoz, L. N. Colorado State University. Ft T. Collins, Co, 80523-1172. 261 pp.

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.

Seifert, H.S.H.; Bader, K.; Cyplik, J.; González S., J.; Roth, F.; Salinas Meléndez, J. A. & Sukop, U. (1996). Environment, Incidence, Aetiology, Epizootiology and Immunoprophylaxis of Soil-borne Diseases in North-east Mexico. *Journal of Veterinary Medicine*, 43, 593-606.

Serrano D., G. E. (1996). Montools, Herramientas Avanzadas par Usuarios de Monty, Guía del usuario. COMPUAGRO, CORPOICA (Ed. Carlos A. González) 105 p.

Silva A., L.C. (1995). Excursión a la Regresión Logística en Ciencias de la Salud. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. 232 p.

Smith L. D., Holdeman L. V. (1968). The pathogenic anaerobic bacteria. Charles Thomas, Publisher, Springfield, Illinois. USA. 423 pp.

Smith GR, Morison CJ. (1975). *Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London. *Journal of Hygiene* 75:371±9.

Smith, L. (1977). Botulismo, el microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Editorial Acribia, Zaragoza (España). 213 p.

Smith GR, Milligan RA, Morison CJ. (1978). *Clostridium botulinum* in aquatic environments in Great Britain and Ireland. *Journal of Hygiene* 80:431±6.

Smith, L.M. & Burgoyne L. A. (2004) Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA<sup>®</sup> databasing paper. BMC Ecology. <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/4/4>

Songer G., J. & Post W., K. (2005). Veterinary Microbiology. Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Editorial Saunders. Pp 448

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).

Thrusfield, M. (2005). Veterinary Epidemiology. Third Edition. Editorial Blackwell Publishing Ltd., Oxford. Great Britain. 610 p.

Thomas, R.J. (1991). Detección de *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. Australian Veterinary Journal 68(3): 111-113.

Titball, R.; Mainil, J.; Duchesnes, C. & Popoff, M. (2003). 2. protein toxins of the genus *Clostridium* and vaccination. Genus Clostridium Concert Action QLK2-CT2001-01267. 51 p. <http://www.genusclostridium.net>.

Toro O., R. D.; Ortiz O., D.; Ossa A., J. H.; Montoya F., F.; Henao V., L. & Guerrero C., D. A. (2007). Detección de *Clostridium cahuveoi* en músculo fijado en formol utilizando la técnica Elisa indirecto y un anticuerpo monoclonal. Revista de Investigación, Universidad de La Salle. 7(2): 163-169. ISSN 16576772.

Unidad Regional de Planificación Agropecuaria - URPA (2000). Secretaría de Agricultura Cundinamarca. 149 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 del Ganado, FEDEGAN. Santafé de Bogotá, junio 14. 132 p.

Urtler, V. ;Wilson, V. & Mayal, B- C. (1991). Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16s rDNA. *Journal of General Microbiology*, 137, 2673-2679.

Vadillo, S.; Píriz, S. & Mateos, E. (2002). Manual de Microbiología Veterinaria. Editorial Ms Graw Hill – Interamericana. Madrid, España. 580 p.

Vaneechoutte M.; Cartwright C. O.; Williamns E. C.; Jäger B.; Tichy H.V.; De Baere T. De Rouck A. & Verschaegen G.(1996). Evaluation of 16S rRNA Gene restriction analysis for identification of cultured organism of clinically important *Clostridium* species. *Anaerobe* (2): 249-256.

Yamakawa, K. & Nakamura, S. (1992). Prevalence of *Clostridium botulinum* type E and coexistence of *C. botulinum* nonproteolytic type B in the river soil of Japan. *Microbiology and Immunology* 36:583±91.

Zhao L.; Montivelli T. J. & Schaffner D. W. (2006). Evidence for quorum sensing in *Clostridium botulinum* 56A. *Applied Microbiology*. Vol 42 (1): 54-58.



# Anexo 1: Publicación Revista Corpoica–Ciencia y Tecnología Agropecuaria 2008

Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria (2008) 9(1), 102-112

SALUD  
ANIMAL

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

Diego Ortiz<sup>1</sup> y Luis Carlos Villamí<sup>2</sup>

### 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.

Recibido 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 Casa, Coarica, Avenida El Dorado N° 42-42, Bogotá D.C., Colombia. e-mail: doriz@corpoca.org.co
2. Profesor Asociado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. e-mail: lvillami@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 –VICOL–, 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) *Mediamente 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, toxigenicidad y propiedades serológicas (Titball *et al.*, 2003).

Sin embargo, en los últimos tiempos esta clasificación se basa en homologías 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 inoocuos, 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 ruminantes 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 CORUCA 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 carbones 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. histolyticum* 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 rinotraqueítis 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 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 García<sup>3</sup> 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 'deprivación 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, si 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 periodos, sobretodo 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 alotrofagia (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-

ques, 1993; Dutra et al., 1993; Liebsa 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 neuroparalítica (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 neuroparalítica 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 Neuroparalítico 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 huesos 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 Neuroparalítico 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 Tóxicas	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 probabilística, esto es, 'muestreo por conveniencia'.

Los productores entrevistados utilizaban medidas sanitarias preventivas como la inmunización contra enfermedades virales (fiebre aftosa, rabia, estomatitis vesicular, rinotraqueitis 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
Límor	sí	sí	sí	no	no	no	no

Fuente: Agravet, 2002.

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

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 naylori* o *Clostridium perfringens*. 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 ciertos 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 (CaCl<sub>2</sub>) 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

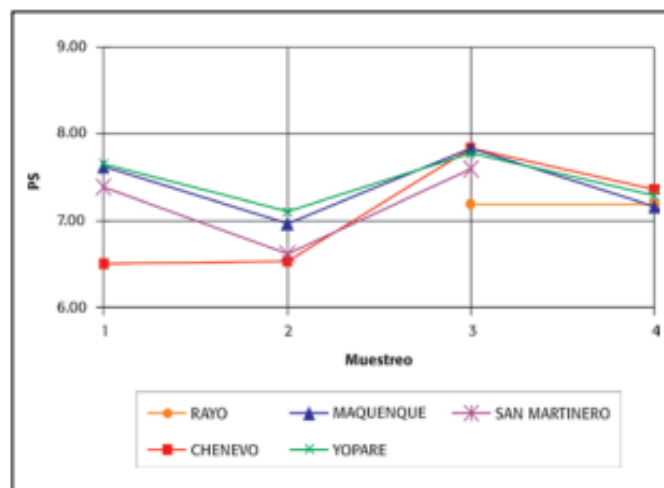


Figura 3. Valores séricos de proteínas (PS) en cinco hatos seleccionados de la Altillanura plana colombiana (2000).

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 diluciden 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) (Florez *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 immunosorbent assay*) y diagnóstico molecular (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) constituye una prioridad en el corto y mediano plazos (Haines y Clark, 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 avisoran 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, Corroica. 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, Covizcos (Colegio de Veterinarios y Zootecnistas de Córdoba). Sección 2, 18 p.
- Benavides, E.; Ortiz, D. y Benavides, J. 2001. 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 Coetas, 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.

## Bacterias anaerobias del suelo responsables de la muerte súbita bovina en sabanas tropicales: investigaciones realizadas en Colombia 111

- 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.
- Brño, 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 prevínalo y controlé. 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 Langenogger, J. 1987. Esporos de *Clostridium botulinum* Em torno de cadáveres decompostos de bovinos em pastagens no sul de Goiás. Pesquisa Veterinária Brasileira 7(1): 17-22.
- Dowd, 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 Dobreiner, J. 1993. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. Pesquisa Veterinária 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.; Ciccanelli, 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.; Torro, 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.
- Gambou, 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 immunosays 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, WJ.; Ohashi, M. y Tarano, 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.
- Lebdosoedkojo, S. 1977. Mineral supplementation of grazing beef cattle in eastern plains of Colombia. Tesis Ph.D. University of Florida (EUA). 207 p.
- Lebdosoedkojo, S.; Ammerman, C.B.; Raun, N. S.; Gómez, J. y Littell, 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 FONAAI, Caracas (Venezuela). pp 47-100.
- Lisbúa, 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 Veterinária Brasileira 16(2/3): 67-74.
- Lobo A., C.A. 1994. Taller de Planificación por Objetivos Metodología Zoop. Programa Nacional de Epidemiología veterinaria. Subdirección de Sistemas de producción. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Cosvoca. 50 p.
- Londoño E, R.; Villamil J, L.C. y Romero F, 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<sup>a</sup>. Ed. Acribia, Zaragoza (España). 384 p.
- Obrégón, 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<sup>a</sup> 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 Orinoquia colombiana. Revista de Medicina Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria Universidad de La Salle 2(3): 7-20.

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

- 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, PRONATEA. 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.
- Quirmand, 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.; Codiell B., Natalia y Romero P., J.R. 2004. *Salud Pública Veterinaria en Colombia. Pasado, Presente y Futuro*. Organización Panamericana de la Salud. Editorial Moos 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 Göttingen, Proyecto presentado a la Comunidad Económica Europea. 26 p.
- Singh, B.R.; Li, B. y Road, 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/>; consulte: 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.

## Anexo 2: Secuencias publicadas en Gen Bank (National Center for Biotechnology Information) 2010.

My NCBI entrarSalir

# Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

### cepa de Clostridium botulinum de 5558 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328062.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328062 1315 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION Clostridium botulinum strain 5558 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328062

VERSION HQ328062.1 GI:310975769

KEYWORDS .

SOURCE Clostridium botulinum

ORGANISM Clostridium botulinum

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1315)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in Clostridium spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1315)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1315  
 /organism="Clostridium botulinum"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="5558"  
 /db\_xref="taxon:1491"

rRNA <1..>1315

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 agggggggac gggtgagtga cctgtgggta acctgcctca aagtggggga tagccttccg
61 aaaggaagat taataccgca taatatggga gaatcgcagc attttggtat caaagattta
121 ttgctttgag atggaccggc ggcgtattag ctagttggta aggtaacggc ttaccaaggc
181 aacgatgcgt agccgacctg agaggggtgat cggccacatt ggaactgaga cacgggtccag
241 actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcgcaatgg gggaaaccct gacgcagcaa
301 cgccgcgtgg gtgatgaagg tcttcggatt gtaaagccct gttttctggg acgataatga
361 cggtagcaga ggaggaagcc acgggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt
421 ggcgagcgtt gtccggattt actgggcgta aaggggtgcgt aggcggatgt ttaagtggga
481 tgtgaaatcc ccgggcttaa cctgggggct gcattccaaa ctggatatct agagtgcagg
541 agaggaaaagc ggaattccta gtgtagcggg gaaatgcgta gagattagga agaacaccag
601 tggcgaaggc ggctttctgg actgtaactg acgctgaggc acgaaagcgt gggtagcaaa
661 caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgg atactaggtg taggggggat
721 caactcccc tgtgccgcag ttaacacaat aagtatccc cctggggagt acggtcgcaa
781 gattaact caaaggaatt gacgggggccc cgcacaagca gcggagcatg tggtttaatt
841 cgaagcaacg cgaagaacct tacctggact tgacatccct tgcatacct agagataggt
901 gaagcccttc ggggcaagga gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgcgtgaga
961 tgtaggtta agtctgcaa cgagcgcaac cttgttatt agttgctacc attaagttga
1021 gcactctaat gagactgcct gggtaaccag gaggaagggt gggatgacgt caaatcatca
1081 tgccccttat gtccagggct acacacgtgc tacaatggta ggtacaataa gacgcaagac
1141 cgtgaggtgg agcaaaagag ataaaacct tctcagttcg gattgtaggc tgcaactcgc
1201 ctacatgaag ctggagttgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgcgggtga atacgttccc
1261 gggccttgta cacaccgccc gtcacacat gagagctggt aacaccgaa gtccg
```

//

My NCBI entrarSalir

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

### Configuración de pantalla:

- [GenBank](#)

### cepa de *Clostridium botulinum* de 5560 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328063.1

[FASTA gráficos](#)

Go to:

LOCUS HQ328063 1315 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION *Clostridium botulinum* strain 5560 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328063

VERSION HQ328063.1 GI:310975770

KEYWORDS .

SOURCE *Clostridium botulinum*

ORGANISM *Clostridium botulinum*

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; *Clostridium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1315)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in *Clostridium* spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1315)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

```
source          1..1315
                 /organism="Clostridium botulinum"
                 /mol_type="genomic DNA"
                 /strain="5560"
                 /db_xref="taxon:1491"
rRNA            <1..>1315
                 /product="16S ribosomal RNA"
```

## ORIGIN

```
1 agcggcggac gggtgagtaa cacgtgggta acctgcctca aagtggggga tagccttccg
61 aaaggaagat taataccgca taatatgaga gaatcgcatg attttcttat caaagattta
121 ttgctttgag atggaccgcg ggcgcattag ctagttggtg aggtaacggc ttaccaaggc
181 aacgatgctg agccgacctg agaggggatg cggccacatt ggaactgaga cacgggtccag
241 actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcgcaatgg gggaaaccct gacgcagcaa
301 cgccgcgtgg gtgatgaagg tcttcggatt gtaaagccct gttttctagg acgataatga
361 cggtagctaga ggaggaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt
421 ggcgagcgtt gtccggattt actgggcgta aaggggtgct aggcggatgt ttaagtggga
481 tgtgaaatcc ccgggcttaa cctgggggct gcattccaaa ctggatatct agagtgcagg
541 agaggaaagc ggaattccta gtgtagcggg gaaatgctga gagattagga agaaccaccg
601 tggcgaaggc ggctttctgg actgtaactg acgctgaggc acgaaagcgt gggtagcaaa
661 caggattaga taccctggta gtccacggcg taaacgatgg atactaggtg taggggggat
721 caactcccc tgtgcccagc ttaacacaat aagtatcccc cctgggggag acggtgcgaa
781 gattaaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagca gcggagcatg tggtttaatt
841 cgaagcaacg cgaagaacct tacctggact tgacatccct tgcatagcct agagataggt
901 gaagcccttc ggggcaagga gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
961 tgttaggtta agtccctgca cgagcgcaac cttgttatt agttgctacc attaagttga
1021 gcactcctaat gagactgcct gggtaaccag gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca
1081 tgccccttat gtccagggct acacacgtgc tacaatggta ggtacaataa gacgcaagac
1141 cgtgaggtgg agcaaaactt ataaaacctt tctcagttcg gattgtaggc tgcaactcgc
1201 ctacatgaag ctggagttgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgagggtg atacgttccc
1261 gggccttgta cacaccgccc gtcacacat gagagctggt aacacccgaa gtccg
```

//

My NCBI entrarSalir

# Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

## cepa de Clostridium botulinum de 5562 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328064.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328064 1317 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION Clostridium botulinum strain 5562 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328064

VERSION HQ328064.1 GI:310975771

KEYWORDS .

SOURCE Clostridium botulinum

ORGANISM Clostridium botulinum

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1317)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in Clostridium spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1317)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1317

/organism="Clostridium botulinum"

/mol\_type="genomic DNA"



```
                /strain="5562"  
                /db_xref="taxon:1491"  
rRNA           <1..>1317  
                /product="16S ribosomal RNA"
```

## ORIGIN

```
1 agcggcggac gggtgagtaa cacgtgggca acctgccttg aagtggggga tagccctccg  
61 aaaggaggat taataccgca taacatcagt acatcgcatg atgaattgat taaaggagta  
121 atccgcttca agatgggccc gcggcgcatt agctagttag tgaggtaacg gctcaccaag  
181 gcgacgatgc gtagccgacc tgagaggggtg atcggccaca ttgggactga gacacggccc  
241 agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggggaaacc ctgatgcagc  
301 aacgccgcgt gagtgatgaa ggccttcggg ttgtaaagct ctgtcttcag ggacgataat  
361 gacggtacct gaggaggaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag  
421 gtggcaagcg ttgtccggat ttactgggcg taaaggaggt gtaggcggat acttaagtca  
481 gatgtgaaat acccgggctc aacttgggtg ctgcatttga aactgggtat ctagagtgca  
541 ggagaggaaa gtggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcg tagagattag gaagaacacc  
601 agtggcgaag gcgactttct ggactgtaac tgacgctgag gctcgaaagc gtggggagca  
661 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gggactagg tgtgggaggt  
721 atcgactcct tccgtgccgc cgtaaacaca ataagtacc cgctgggga gtacggtcgc  
781 aagattaata ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cagcggagca tgtggttaa  
841 ttcgaagcaa cgccaagaac cttacctaga cttgacatct cctgaattac ccttaatcgg  
901 ggaagccctt cggggcagga agacaggtgg tgcatggttgc tgcgcagctc gtgtcgtgag  
961 atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa ccctattgt tagttgctac cattaagttg  
1021 agcactctag cgagactgcc cgggtgaacc gggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat  
1081 catgcccctt atgtctaggg ctacacacgt gctacaatgg cgagtacaac gagacgcaat  
1141 accgcgaggt ggagcaaaac ttaaaaaact cgtcccagtt cggattgtag gctgaaactc  
1201 gcctacatga agccggagtt gctagtaatc gcgaatcaga atgtcgcggg gaatacgttc  
1261 ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgagagttg gcaatacccg aagtccc
```

//

My NCBI entrarSalir

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

### cepa de *Clostridium botulinum* de 5563 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328065.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328065 1315 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION *Clostridium botulinum* strain 5563 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328065

VERSION HQ328065.1 GI:310975772

KEYWORDS .

SOURCE *Clostridium botulinum*

ORGANISM *Clostridium botulinum*  
Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; *Clostridium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1315)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in *Clostridium* spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1315)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1315  
/organism="Clostridium botulinum"  
/mol\_type="genomic DNA"

```
                /strain="5563"  
                /db_xref="taxon:1491"  
rRNA           <1..>1315  
                /product="16S ribosomal RNA"
```

## ORIGIN

```
1  agcggcggac  gggtgagtga  cacgtgggta  acctgcctca  aagtggggga  tagccttccg  
61  aaaggaagat  taataccgca  taatatgaga  gaatcgcatg  attttcttat  caaagattta  
121  ttgctttgag  atggaccgca  ggcgcattag  ctagttggta  aggtaacggc  ttaccaaggc  
181  aacgatgcgt  agccgacctg  agaggggatg  cggccacatt  ggaactgaga  aacgggtccag  
241  actcctacgg  gaggcagcag  tggggaatat  tgcgcaatgg  gggaaaccct  gacgcagcaa  
301  cgccgcgtgg  gtgatgaagg  tcttcggatt  gtaaagccct  gttttctggg  acgataatga  
361  cggtagcaga  ggaggaagcc  acggctaact  acgtgccagc  agccgcggta  atacgtaggt  
421  ggcgagcgtt  gtccggattt  actgggcgta  aaggggtcgt  aggcggatgt  ttaagtggga  
481  tgtgaaatcc  ccgggcttaa  cctgggggct  gcattccaaa  ctggatatct  agagtgcagg  
541  agaggaaaagc  ggaattccta  gtgtagcggg  gaaatgcgta  gagattagga  agaaccaccag  
601  tggcgaaaggc  ggctttctgg  actgtaactg  acgctgaggc  acgaaagcgt  gggtagcaaa  
661  caggattaga  taccctggta  gtccacgccg  taaacgatgg  atactaggtg  taggggggat  
721  caactcccc  tgtgccgcag  ttaacacaat  aagtatcccg  cctggggagt  acggtcgcaa  
781  gattaaaaact  caaaggaatt  gacgggggcc  cgcacaagca  gcggagcatg  tggtttaatt  
841  cgaagcaacg  cgaagaacct  tacctggact  tgacatccct  tgcatagcct  agagataggt  
901  gaagcccttc  ggggcaagga  gacaggtggg  gcatggttgt  cgtcagctcg  tgtcgtgaga  
961  tgtaggtta  agtctgcaa  cgagcgcaac  ccttgttatt  agttgctacc  attaagttga  
1021  gcaactctaat  gagactgcct  gggtaaccag  gaggaagggt  gggatgacgt  caaatcatca  
1081  tgcccccttat  gtccagggct  acacacgtgc  tacaatggta  ggtacaataa  gacgcaagac  
1141  cgtgaggtgg  agcaaaactt  ataaaaccta  tctcagttcg  gattgtaggc  tgcaactcgc  
1201  ctacatgaag  ctggagttgc  tagtaatcgc  gaatcagaat  gtcgcgggtg  atacgttccc  
1261  gggccttgta  cacaccgccc  gtcacaccat  gagagctggg  aacaccgaa  gtccg
```

//

My NCBI entrarSalir

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

### cepa de *Clostridium botulinum* de 5564 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328066.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328066 1315 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION *Clostridium botulinum* strain 5564 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328066

VERSION HQ328066.1 GI:310975773

KEYWORDS .

SOURCE *Clostridium botulinum*

ORGANISM *Clostridium botulinum*

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; *Clostridium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1315)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in *Clostridium* spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1315)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1315

/organism="Clostridium botulinum"

/mol\_type="genomic DNA"

```
                /strain="5564"  
                /db_xref="taxon:1491"  
rRNA           <1..>1315  
                /product="16S ribosomal RNA"
```

## ORIGIN

```
1  agcggcggac  gggtgagtaa  cacgtgggta  acctgcctca  aagtggggga  tagccttccg  
61  aaaggaagat  taataccgca  taatatgaga  gaatcgcatg  attttcttat  caaagattta  
121  ttgctttgag  atggaccgca  ggcgcattag  ctagttggta  aggtaacggc  ttaccaaggc  
181  aacgatgcgt  agccgacctg  agaggggatg  cggccacatt  ggaactgaga  cacgggtccag  
241  actcctacgg  gaggcagcag  tggggaatat  tgcgcaatgg  gggaaaccct  gacgcagcaa  
301  cgccgcgtgg  gtgatgaagg  tcttcggatt  gtaaagccct  gttttctagg  acgataatga  
361  cggtagtaga  ggaggaagcc  acggctaact  acgtgccagc  agccgcggta  atacgtaggt  
421  ggcgagcgtt  gtccggattt  actgggcgta  aaggggtcgt  aggcggatgt  ttaagtggga  
481  tgtgaaatcc  ccgggcttaa  cctgggggct  gcattccaaa  ctggatatct  agagtgcagg  
541  agaggaaaagc  ggaattccta  gtgtagcggg  gaaatgcgta  gagattagga  agaaccaccag  
601  tggcgaaaggc  ggctttctgg  actgtaactg  acgctgaggc  acgaaagcgt  gggtagcaaa  
661  caggattaga  taccctggta  gtccacgccg  taaacgatgg  atactaggtg  taggggggat  
721  caactcccc  tgtgccgcag  ttaacacaat  aagtatccc  cctggggagt  acggtcgcaa  
781  gattaaaaact  caaaggaatt  gacgggggcc  cgcacaagca  gcggagcatg  tggtttaatt  
841  cgaagcaacg  cgaagaacct  tacctggact  tgacatccct  tgcatagcct  agagataggt  
901  gaagcccttc  ggggcaagga  gacaggtggg  gcatggttgt  cgtcagctcg  tgtcgtgaga  
961  tgtaggtgta  agtctgcaa  cgagcgcaac  ccttgttatt  agttgctacc  attaagttga  
1021  gcaactctaat  gagactgcct  gggtaaccag  gaggaagggt  gggatgacgt  caaatcatca  
1081  tgcccccttat  gtccagggct  acacacgtgc  tacaatggta  ggtacaataa  gacgcaagac  
1141  cgtgaggtgg  agcaataact  ataaaaccta  tctcagttcg  gattgtaggc  tgcaactcgc  
1201  ctacatgaag  ctggagttgc  tagtaatcgc  gaatcagaat  gtcgcgggtg  atacgttccc  
1261  gggccttgta  cacaccgccc  gtcacaccat  gagagctggg  aacaccgaa  gtccg
```

//

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

### **Clostridium botulinum chalab cepa 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial**

GenBank: HQ328067.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328067 1318 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION Clostridium botulinum strain chalab 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328067

VERSION HQ328067.1 GI:310975774

KEYWORDS .

SOURCE Clostridium botulinum

ORGANISM Clostridium botulinum

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1318)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in Clostridium spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1318)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1318  
 /organism="Clostridium botulinum"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="chalab"  
 /db\_xref="taxon:1491"

rRNA <1..>1318  
/product="16S ribosomal RNA"

## ORIGIN

```
1 agcggcggac gggtgagtaa gatctgggca acctgccttg tagaggggaa tagccttccg
61 aaaggaagat taataccgca taatattgca gcttcgcatg gagcagtaat taaaggagca
121 atccgctaca agatgggccc gcgggcgatt agctagttag tgaggtaacg gctcaccaag
181 gcgacgatgc gtagccgacc tgagaggggtg atcgccaca ttgggactga gacacggccc
241 agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat ggggaaacc ctgatgcagc
301 aacgccgcgt gagtgatgaa ggttttcgga tcgtaaagct ctgtcttcag ggacgataat
361 gacggtagct gaggaggaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag
421 gtggcgagcg ttgtccggat ttactgggcg taaagggagc gtaggcggac ttgtaagtga
481 gatgtgaaat acccgggctc aacttgggtg ctgcatttca aactggaagt ctagagtgca
541 ggagaggaga gtggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcy tagagattag gaagaacacc
601 agtggcgaag gcgactctct ggactgtaac tgacgctgag gctcgaagc gtggggagca
661 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat ggatactagg tgtgggaggt
721 atcaactcct tccgtgcccgc cgtaaacaca ttaagtatcc cgcctgggga gtacggtcgc
781 aagattaana ctcaaaggaa ttgacgctag cccgcacaag cagcggagca tgtggtttaa
841 ttcgaagcaa cgcgaagaac cttacctaga cttgacatct cctgcattac tcttaatcga
901 ggaagtctct tcggagacag gatgacaggt ggtgcatggt tgcgctcagc tcgtgctgty
961 agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt gttagttgct accathtagt
1021 tgagcactct agcgagactg cccgggttaa ccgggaggaa ggtgggggtg acgtcaaatc
1081 atcatgcccc ttatgtctag ggctacacac gtgctacaat ggcaagtaca acgagatgca
1141 ataccgagag gtggagctaa actataaac ttgtctcagt tcggattgta ggctgaaact
1201 cgcctacatg aagctggagt tgctagtaat cgcgaatcag catgtcgcgg tgaatacgtt
1261 cccgagcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt ggcaataccc aaagttag
```

//

My NCBI entrarSalir

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

 Buscar: 

 BúsquedaBorrar

### Clostridium botulinum seplab cepa 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328068.1

FASTA gráficos

LOCUS HQ328068 1318 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION Clostridium botulinum strain seplab 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328068

VERSION HQ328068.1 GI:310975775

KEYWORDS .

SOURCE Clostridium botulinum

ORGANISM Clostridium botulinum

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1318)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in Clostridium spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1318)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1318

/organism="Clostridium botulinum"

/mol\_type="genomic DNA"



```
                /strain="seplab"  
                /db_xref="taxon:1491"  
rRNA           <1..>1318  
                /product="16S ribosomal RNA"
```

## ORIGIN

```
1 agcggcggac gggtgagtaa cacgtgggca acctgccttg tagaggggaa tagcctcccg  
61 aaagggagat taataccgca taacattgca gcttcgcatg gagcagcaat taaaggagta  
121 atccgctaca agatgggccc gcggcgcatt agctagttag tgaggtaacg gctcaccaag  
181 gcgacgatgc gtagccgacc tgagaggggtg atcggccaca ttgggactga gacacggccc  
241 agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggggaaacc ctgatgcagc  
301 aacgccgcgt gagtgatgaa ggttttcgga tcgtaaagct ctgtcttcag ggacgataat  
361 gacggtacct gaggaggaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag  
421 gtggcgagcg ttgtccggat ttactgggcg taaagggagc gtaggcggac ttttaagtga  
481 gatgtgaaat acccgggctc aacctggggg ctgcatttca aactggaagt ctagagtgca  
541 ggagaggaga gtggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcy tagagattag gaagaacacc  
601 agtggcgaag gcgactctct ggactgtaac tgacgctgag gctcgaaagc gtggggagca  
661 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat ggatactagg tgtgggaggt  
721 atcaactcct tccgtgccgc cgttaacaca ttaagtatcc cgctgggga gtacggtcgc  
781 aagattaaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cagcggagca tgtggtttaa  
841 ttcgaagcaa cgccaagaac cttacctaga cttgacatct cctgcattac tcttaatcga  
901 ggaagtccct tcggggacag gatgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg  
961 agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt gttagttagt accatttagt  
1021 tgagcactct agcgagactg cccgggttaa ccgggaggaa ggtggggatg acgtcaaadc  
1081 atcatgcccc ttatgtctag ggctacacac gtgctacaat ggcaagtaca acgagatgca  
1141 ataccgcgag gtggagctaa actataaac ttgtctcagt tcggattgta ggctgaaact  
1201 cgcctacatg aagctggagt tgctagtaat cgcgaatcag catgtcgcgg tgaatacgtt  
1261 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt ggcaataccc aaagttag
```

//

My NCBI entrarSalir

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

### cepa de *Clostridium difficile* 5556 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328069.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328069 1317 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION *Clostridium difficile* strain 5556 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328069

VERSION HQ328069.1 GI:310975776

KEYWORDS .

SOURCE *Clostridium difficile*

ORGANISM *Clostridium difficile*

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; *Clostridium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1317)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in *Clostridium* spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1317)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1317

/organism="Clostridium difficile"

/mol\_type="genomic DNA"

```
                /strain="5556"  
                /db_xref="taxon:1496"  
rRNA           <1..>1317  
                /product="16S ribosomal RNA"
```

## ORIGIN

```
1 agcggcggac gggtgagtaa cgcgtgggta acctgccctg tacacacgga taacataaccg  
61 aaaggtatac taatacggga taacatatga aagtcgcatg gcttttgtat caaagctccg  
121 gcggtacagg atggaccctg gtctgattag ctagttggta aggtaatggc ttaccaaggc  
181 aacgatcagt agccgacctg agaggggatg cggccacact ggaactgaga cacgggtccag  
241 actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gcgaaagcct gatgcagcaa  
301 cgccgcgtga gcgatgaagg ccttcggggtc gtaaagctct gtcctcaagg aagataatga  
361 cggtagctga ggaggaagcc cgggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg  
421 ggctagcgtt atccggaatt actgggcgta aaggggtgct aggtggtttt ttaagtcaga  
481 agtgaaaggc tacggctcaa ccgtagtaag cttttgaaac tagagaactt gagtgcagga  
541 gaggagagta gaattcctag tgtagcggtg aatgcgtag atattaggag gaataaccagt  
601 agcgaaggcg gctctctgga ctgtaactga cactgaggca cgaaagcgtg gggagcaaac  
661 aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tactaggtgt cgggggttac  
721 cccctcggg gccgcagcta acgcattaag tactccgcct gggaaagtacg ctcgcaagag  
781 tgaaactcaa aggaattgac ggggaccctg acaagtagcg gagcatgtgg ttaattcga  
841 agcaacgcga agaaccttac ctaagcttga catcccactg acctctccct aatcggagat  
901 ttcccttcgg ggacagtggg gacaggtggg gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga  
961 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac cettgccttt agttgccagc attaagttgg  
1021 gcaactctaga gggactgccg aggataactc ggaggaaggt ggggatgacg tctaatacgc  
1081 atgcccctta tgcttagggc tacacacgtg ctacaatggg tggtagagag ggttgccaag  
1141 ccgcgagggt gagctaatac cttaaagcca ttctcagttc ggattgtagg ctgaaactcg  
1201 cctacatgaa gctggagtta ctagtaatcg cagatcagaa tgctgcgggtg aatgcggtcc  
1261 cgggtcttgt acacactcgc ccgtcacacc atggaagttg ggggcgcccg aagccgg
```

//

My NCBI entrarSalir

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

### cepa de *Clostridium difficile* 5557 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328070.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328070 1317 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION *Clostridium difficile* strain 5557 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328070

VERSION HQ328070.1 GI:310975777

KEYWORDS .

SOURCE *Clostridium difficile*

ORGANISM *Clostridium difficile*

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; *Clostridium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1317)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in *Clostridium* spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1317)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1317

/organism="Clostridium difficile"

```

                                /mol_type="genomic DNA"
                                /strain="5557"
                                /db_xref="taxon:1496"
rRNA <1..>1317
                                /product="16S ribosomal RNA"
```

## ORIGIN

```

   1 agcggcggac gggtagtaaa cgcgtgggta acctgccctg tacacacgga taacataaccg
  61 aaaggtatac taatacggga taacatatga aagtcgcatg gcttttgtat caaagctccg
 121 gcggtacagg atggaccgcg gtctgattag ctagttggta aggtaatggc ttaccaaggc
 181 aacgatcagt agccgacctg agagggtgat cggccacact ggaactgaga cacgggtccag
 241 actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gcgaaagcct gatgcagcaa
 301 cgccgcgtga gcgatgaagg ccttcgggtc gtaaagctct gtcctcaagg aagataatga
 361 cggtagctga ggaggaagcc cgggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg
 421 ggctagcggt atccggaatt actgggcgta aagggtgcgt aggtggtttt ttaagtcaga
 481 agtgaaaggc tacggctcaa ccgtagtaag cttttgaaac tagagaactt gagtgcagga
 541 gaggagagta gaattcctag tgtagcggtg aatgcgtag atattaggag gaataccagt
 601 agcgaaggcg gctctctgga ctgtaactga cactgaggca cgaaagcgtg gggagcaaac
 661 aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tactaggtgt cgggggttac
 721 ccccctcggg gccgcagcta acgcattaag tactccgcct gggaaagtacg ctcgcaagag
 781 tgaaactcaa aggaattgac ggggaccgcg acaagtagcg gagcatgtgg ttaattcga
 841 agcaacgcga agaaccttac ctaagcttga catcccactg acctctccct aatcggagat
 901 ttcccttcgg ggacagtggg gacaggtggg gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
 961 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac cttgccttt agttgccagc attaagttgg
1021 gactctaga  gggactgccg aggataactc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc
1081 atgcccctta tgcttagggc tacacacgtg ctacaatggg tggtagagag ggttgccaag
1141 ccgcgaggtg gagctaatac cttaaagcca ttctcagttc ggattgtagg ctgaaactcg
1201 cctacatgaa gctggagtta ctagtaatcg cagatcagaa tgctgcggtg aatgcgttcc
1261 cgggtcttgt acacactcgc ccgtcacacc atggaagtgt ggggcgcccc aagccgg
```

//

My NCBI entrarSalir

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

### cepa de *Clostridium difficile* 5561 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328071.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328071 1317 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION *Clostridium difficile* strain 5561 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION HQ328071

VERSION HQ328071.1 GI:310975778

KEYWORDS .

SOURCE *Clostridium difficile*

ORGANISM *Clostridium difficile*

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; *Clostridium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1317)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in *Clostridium* spp. from soil samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1317)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C., Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1317

/organism="Clostridium difficile"

/mol\_type="genomic DNA"

```
                /strain="5561"  
                /db_xref="taxon:1496"  
rRNA           <1..>1317  
                /product="16S ribosomal RNA"
```

## ORIGIN

```
1  agcggcggac  gggtgagtaa  cgcgtgggta  acctgccctg  tacacacgga  taacataaccg  
61  aaaggtatac  taatacggga  taacatatga  aagtcgcatg  gcttttgtat  caaagctccg  
121  gcggtacagg  atggacccgc  gtctgattag  ctagttggta  aggtaatggc  ttaccaaggc  
181  aacgatcagt  agccgacctg  agaggggatg  cggccacact  ggaactgaga  cacgggtccag  
241  actcctacgg  gaggcagcag  tggggaatat  tgcacaatgg  gcgaaagcct  gatgcagcaa  
301  cgccgcgtga  gcgatgaagg  ccttcgggtc  gtaaagctct  gtcctcaagg  aagataatga  
361  cggtagctga  ggaggaagcc  cgggctaact  acgtgcccagc  agccgcggta  atacgtaggg  
421  ggctagcgtt  atccggaatt  actgggcgta  aagggtgctg  aggtggtttt  ttaagtcaga  
481  agtgaaaggc  tacggctcaa  ccgtagtaag  cttttgaaac  tagagaactt  gagtgcagga  
541  gaggagagta  gaattcctag  tgtagcggtg  aatgcgtag  atattaggag  gaataccagt  
601  agcgaaggcg  gctctctgga  ctgtaactga  cactgaggca  cgaaagcgtg  gggagcaaac  
661  aggattagat  accctggtag  tccacgccgt  aaacgatgag  tactaggtgt  cgggggttac  
721  cccctcgggt  gccgcagcta  acgcattaag  tactccgcct  gggaaagtacg  ctcgcaagag  
781  tgaaactcaa  aggaattgac  ggggaccgcg  acaagtagcg  gagcatgtgg  ttaattcga  
841  agcaacgcga  agaaccttac  ctaagcttga  catcccactg  acctctccct  aatcggagat  
901  ttcccttcgg  ggacagtggg  gacaggtggg  gcatggttgt  cgtcagctcg  tgtcgtgaga  
961  tgttgggtta  agtcccgcaa  cgagcgcaac  cettgccttt  agttgccagc  attaagttgg  
1021  gactctaga  gggactgccg  aggataactc  ggaggaaggt  ggggatgacg  tcaaatcatc  
1081  atgcccctta  tgcttagggc  tacacacgtg  ctacaatggg  tggtagagag  ggttgccaag  
1141  ccgcgagggtg  gagctaatec  cttaaagcca  ttctcagttc  ggattgtagg  ctgaaactcg  
1201  cctacatgaa  gctggagtta  ctagtaatcg  cagatcagaa  tgctgcggtg  aatgcggtcc  
1261  cgggtcttgt  acacactagc  ccgtcacacc  atggaagttg  ggggcgcccg  aagccgg
```

//

My NCBI entrarSalir

## Nucleótidos

Alfabeto de la Vida

Buscar:

BúsquedaBorrar

### Clostridium difficile cepa Cdiflab 16S ARN ribosomal, la secuencia parcial

GenBank: HQ328072.1

FASTA gráficos

Go to:

LOCUS HQ328072 1316 bp DNA linear BCT 08-NOV-2010

DEFINITION Clostridium difficile strain Cdiflab 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence.

ACCESSION HQ328072

VERSION HQ328072.1 GI:310975779

KEYWORDS .

SOURCE Clostridium difficile

ORGANISM Clostridium difficile

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae;  
Clostridium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1316)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Isolation and typing of 16S rRNA in Clostridium spp. from soil  
samples obtained in areas with sudden mortality history

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1316)

AUTHORS Ortiz,D., Villamil,L. and Martinez,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-SEP-2010) Animal Health, Corporacion Colombiana de  
Investigacion Agropecuaria, Km 14 via Mosquera, Bogota D.C.,  
Cundinamarca 571, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1316

/organism="Clostridium difficile"

/mol\_type="genomic DNA"



```

                /strain="Cdiflab"
                /db_xref="taxon:1496"
rRNA           <1..>1316
                /product="16S ribosomal RNA"

```

## ORIGIN

```

1  agcggcggac gggtgagtaa cgcgtgggta acctgccctg tacacacgga taacataaccg
61  aaaggtatgc taatacggga taahrtatga gagtcgcatg gcttttrtat caaagctccg
121 gcggtacagg atggaccgcg gtctgattag ctagtggta aggtaacggc ttaccaaggc
181 aacgatcagt agccgacctg agaggggatg cggccacatt ggaactgaga cacgggtocaa
241 actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg gcgaaagcct gatgcagcaa
301 cgccgcgtga gcgatgaagg ccttcgggtc gtaaagctct gtcctcaagg aagataatga
361 cggtacttga ggaggaagcc cgggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg
421 ggctagcgtt atccggaatt actgggcgta aaggggtcgt aggcggtctt tcaagccaga
481 agtgaaaggc tacggctcaa ccgtagtaag cttttggaac tgtaggactt gagtgcagga
541 gaggagagtg gaattcctag tgtagcggtg aatgcgtag atattaggag gaacaccagt
601 agcgaaggcg gctctctgga ctgtaactga cgctgaggca cgaaagcgtg gggagcaaac
661 aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tactaggtgt cgggggttac
721 cccctcgggt gccgcagcta acgcattaag tactccgcct gggaaagtacg ctcgcaagag
781 tgaaactcaa aggaattgac ggggaccgcg acaagtagcg gagcatgtgg ttaattcga
841 agcaacgcga agaaccttac ctaagcttga catcccaytg acctctccct aatcggagat
901 ttcccttcgg ggacagtggg gacaggtggg gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
961 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac cettgccttt agttgccagc attaagttgg
1021 gactctaga gggactgccg aggataactc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc
1081 atgcccctta tgcttagggc tacacacgtg ctacaatggg tggtagagag ggttgccaag
1141 ccgtgagggt gagctaatec cttaaagcca ttctcagttc ggattgtagg ctgaaactcg
1201      acatgaa gctggagtta ctagtaatcg cagatcagaa tgctgcggtg aatgcggtcc
1261 gtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagttgg gggcgcccga agccgg

```

## Anexo 3: Publicación Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 2011

406

### Epidemiología y salud pública

**Aislamiento e identificación bioquímica de clostridios patógenos presentes en muestras de suelos de predios ganaderos afectados por la ola invernal del 2010 en el municipio de Mosquera, Cundinamarca (Colombia)**

*Isolation and biochemical identification of clostridial pathogen present in soil samples from cattle farms affected by the 2010 winter wave on the municipality of Mosquera, Cundinamarca (Colombia)*

Juan Sebastián Fonseca<sup>1</sup>, Diego Ortiz Ortega<sup>2</sup>, Rodrigo E. Martínez<sup>2</sup> Zoot, MSc, PhD; Andrés Podriza<sup>2</sup>, MV.

<sup>1</sup>Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. <sup>2</sup>Testista, estudiante de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, sebas\_885@hotmail.com

La ola invernal vivida a finales del año 2010 en Colombia provocó el debilitamiento del Río Bogotá, Río Magdalena y Río Cauca inundando cerca de un millón de hectáreas. En el municipio de Mosquera departamento de Cundinamarca fueron afectadas varias zonas destinadas a la ganadería especializada, los inventarios del CLOPAD indican que se afectaron 3200 hectáreas. Los suelos inundados se convirtieron en un medio óptimo para el crecimiento de bacterias anaerobias esporuladas pertenecientes al género *Clostridium* spp. las cuales ocupan actualmente la atención de los investigadores debido al impacto que ocasionan en salud pública y por las pérdidas económicas que producen reflejadas principalmente en mortalidad de animales de muy buena condición. El presente estudio realizado en el Laboratorio de Bacterias Anaerobias de CORPOICA, permitió aislar e identificar bioquímicamente (Kit Comercial API-20A, Biomerieux®) las bacterias anaerobias esporuladas patógenas asociadas a muestras de suelo de los predios afectados por la ola invernal en Mosquera - Cundinamarca, encontrando que las especies *C. botulinum* y *C. septicum*, fueron las más frecuentes, y que *C. beijerinckii*, *C. hyofermentans* y *C. perfringens* se hallaban con menor frecuencia en la zona. El marco de muestreo del estudio fueron todos los predios inundados, la unidad de muestreo determinada fue cada predio. El marco de muestreo del estudio fueron los predios inundados, la unidad de muestreo determinada fue cada predio. La prevalencia utilizada para calcular el tamaño de la muestra fue del 4%, con un nivel de confianza del 95%, obteniendo así una muestra de 20 predios seleccionados al azar que fueron analizados. El muestreo de suelos se desarrolló de forma probabilística aleatoria simple. Se realizó la encuesta epidemiológica compuesta por 45 preguntas, las cuales permitieron hipotetizar factores de riesgo o de protección utilizando la razón de prevalencia (RP). Con estos indicadores se generaron recomendaciones para mitigar el impacto que puede llegar a causar la clostridiosis en la producción ganadera de la zona.

**Palabras clave:** clostridiosis, epidemiología, georreferenciación, salud animal.

**Key words:** animal health, clostridiosis, epidemiology, georeferencing.

**Aislamiento y caracterización molecular de bacterias anaerobias asociadas al suelo en zonas ganaderas con problemas de muerte súbita en bovinos**

*Isolation and molecular characterization of anaerobic bacteria associated with soil in pastoral areas with problems of sudden death in cattle*

Diego Ortiz Ortega<sup>1</sup>, MV, MSc; Luis Carlos Villamil J<sup>1</sup>, MV, MSc, PhD; Rodrigo E. Martínez S<sup>2</sup>, Zoot, MSc, PhD.

<sup>1</sup>Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. [dortizo@corpoca.org.co](mailto:dortizo@corpoca.org.co)

Se desarrollaron dos estudios epidemiológicos para caracterizar las bacterias patógenas del género *Clostridium* spp. asociadas al suelo de fincas afectadas por problemas de mortalidad bovina. El primer estudio se desarrolló tomando como marco de muestreo el total de hatos de la zona de influencia (3431 hatos); se calculó el tamaño de la muestra que resultó ser 165 predios, en los municipios de Mariquita, departamento del Tolima (41 predios, 24.8%); Puerto López, departamento del Meta (42 predios, 25.5%); Nemocon (41 predios 24.8%) y Ubaté (41 predios 24.8%), departamento de Cundinamarca. La prevalencia por Clostridiosis para fincas resultó ser 27.3%; para bovinos fue 3.14%. Se demostró que niveles de temperatura y precipitación elevados favorecen la presentación de brotes epidémicos de mortalidad súbita. La eliminación inadecuada de cadáveres resultó ser un factor de riesgo. La mayoría de fincas positivas a mortalidad por Clostridiosis correspondieron a suelos clase III, con problemas de manejo relacionados con inundaciones y con dificultad del movimiento del agua a través del suelo. En el segundo estudio epidemiológico de tipo longitudinal, se incluyeron 10 predios, ubicados en el municipio de Mariquita departamento del Tolima (3 predios), en el municipio de Puerto López, departamento del Meta (3 predios), y en los municipios de Nemocon y Ubaté (4 predios), departamento de Cundinamarca. Se aislaron y caracterizaron bioquímicamente y molecularmente bacterias patógenas del género *Clostridium* spp. asociadas al suelo de fincas afectadas por mortalidad súbita bovina. Para estudiar la variabilidad genética de las bacterias encontradas, se analizó un segmento de 1500 pb localizado en el gen 16S rARN. Se encontró que las cepas aisladas se agruparon en un mismo clúster y se diferenciaron de los grupos de *Clostridium* spp. utilizados por los laboratorios comerciales para la producción de sus vacunas y de los secuenciados por el National Center for Biotechnology Information (GenBank) que se utilizaron como referencia, demostrando que los *Clostridium* spp. patógenos aislados estaban relacionados con variabilidad climática y eran diferentes a los *Clostridium* spp. utilizados para preparar iramunógenos.

**Palabras clave:** clostridiosis, epidemiología, muerte súbita.

**Key words:** clostridiosis, epidemiology, sudden death.

## Anexo 4: Artículo publicado en journal Global Advanced Research Journal of Microbiology 2012



Global Advanced Research Journal of Microbiology Vol. 1(3) pp. 033-040 April, 2012  
Available online <http://www.garj.org/garjm>  
Copyright © 2012 Global Advanced Research Journals

Full Length Research Paper

### Isolation and typing of Clostridium spp. 16S rRNA from soil samples obtained in areas with sudden mortality history in Colombia

Diego Ortiz Ortega, Luis Carlos Villamil Jiménez, Rodrigo Martínez S.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

Accepted 09 April, 2012

A Longitudinal epidemiologic study was developed for the isolation, biochemical characterization and molecular typing the bacterial pathogen Clostridium spp. found in soil from areas affected by bovine sudden mortality. We included 10 herds, located in three localities. The genetic variability of clostridium genus was analyzed by DNA sequence of a 1500 bp fragment from the 16S rRNA gene. Twenty four Clostridium isolates were biochemically classified as Clostridium sordellii (41,7%), Clostridium glycolicum (12,5%), Clostridium hastiforme (12,5%); Clostridium botulinum (8,3%), Clostridium butyricum (8,3%); Clostridium chauvoei (4,3%), Clostridium limosum (4,3%), Clostridium septicum (4,3%) and Clostridium tertium (4,3%). The bacteria that showed pathogenic activity were studied further by 16S rRNA gene sequencing at, which 55,5% was classified as C. botulinum, where the native strain isolated from areas with outbreaks was found in a different group from Clostridium spp. used by commercial laboratories for vaccine production. Additionally, the native strain identified here differs from others reported in GenBank, indicating that the native pathogenic Clostridium spp. is genetically different to other Clostridium spp. used to prepare immunogens affecting vaccine efficiency. Our results indicate that the use of native strains could improve commercial vaccine preparations, increasing bovine immune response.

Key words: Clostridium, 16S rRNA, sudden mortality, genetic variability

#### INTRODUCTION

The Clostridium genus are anaerobes, Gram-positive bacteria, bacilli, fermentative, catalase negative and negative oxidase. The Clostridium is ubiquitous and some species can be associated with defined

geographic areas (Songer & Post, 2005). In the soil Clostridium diversity has been associated with geographic area, pH, climate, soil type and the presence of other microorganisms. The Clostridium has the capacity to adapt to different environmental conditions due to the possibility to sporulate (Gamboa et al., 2005).

\*Corresponding Author E-mail: ramartinez@corpoca.org.co

Clostridium has more than 100 species known, but less than 20 are pathogenic species to the human and domestic animals. The Clostridium spp. pathogenic species have been classified in four groups, the first includes the neurotoxic Clostridium (*C. tetani* and *C. botulinum*); the second group are histotoxic (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. haemolyticum* and *C. novyi*), the third are grouped by their enteropathogenic action (*C. perfringens*) and finally, the fourth group integrated by the others Clostridium (*C. colinum*, *C. difficile*, *C. piliforme* and *C. spiroforme*) (Quimnet et al., 2004).

All the Clostridium groups present on the soil are very important due to their pathogenic effect and can be responsible for huge economical losses in animal production because they can produce sporadic disease episodes, acute and sudden mortality in animals onset by the toxin effects delivered by Clostridium after they have been ingested by the animals or in infectious processes (Gamboa et al., 2005; Ortiz, 2000).

The aim of this work was to isolate, characterize biochemically and to identify the variation within 16S rRNA in native Clostridium obtained from soil samples belonging to ten different localities, with history of sudden mortality.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample soil and bacterial isolation

The sample size, established by the methodology described by Otte, 1991 and De Blas et al., 1998 was defined as sampling objective for the totality of farms located in the area of influence, where the unit sampling was the farm (Otte, 1991; De Blas et al., 1998). Soil samples were taken from ten different farms located in Mariquita, Nemocón, Puerto López and Ubaté villages.

To isolate bacteria soil samples were taken from plot areas where cases of sudden mortality have been reported, the protocol for sampling soil was done according to Ferraris, (2005). We selected plots where dead animals by Clostridium or plots where dead animals were buried (30 samples by plot). With 1 kg of soil taken from a depth of 0-20 cm was represented the bacterial availability from soil, meaning 0000005 % of average weight of 1 ha (Ferraris, 2005).

### Bacterial culture

The soil sample of 1g was diluted in 5 ml of saline solution, from this suspension 1,5 ml were taken, and each one was heated at 60° C for 10 minutes, then

were cultivated on Thioglycolate with cooked meat medium (100 ml by tube) pre-reduced by heating 10 min in boiling water and incubated in anaerobic chambers with AnaeroGen™ (Oxoid Laboratories) for 7 days at 37° C. Subsequently were cultured on Blood agar plates (3.0%), and were incubated for 24 hours at 35° C., once the film of swarming was observed a second culture was carried out in blood agar plates (4.0%), evaluating colony morphology (shape surface and edge) and the hemolytic evidence and their type (alpha, beta).

The colonies were cultured on agar with egg yolk to evaluate the lecithinase activity (+) (alpha-toxine, phospholipase C) and lipase (+). Later, the bacteria were cultured on liquid Brain Heart Infusion agar (BHI) and was incubated for 24 hours at 35° C. The biochemical characterization of the isolates was done using the API®20A methodology for identification of anaerobic bacteria (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). Later the cultures were cryopreserved using 0.5 ml of glycerol and frozen at -70° C.

### 16S rRNA sequencing

The genomic DNA was extracted from cells in the mid-logarithmic growth phase and was purified by the use of FTA® cards and FTA® buffer (Whatman International Ltd, United Kingdom) following the methodology described by Dobbs & Madigan, (2002); Rogers & Burgoyne, (2000); Smith & Burgoyne, (2004). The PCR amplification and DNA sequencing of the 16S rRNA genes was performed according to Vaneechoutte et al., (1996). Briefly, The bacterial DNA extracts and control were used to amplify a 1500 bp fragment with 0.5 μM primers [5'-TGG CTC AGA TTG AAC GCT GGC GGC (forward) and 5' TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCA CA (reverse)].

The PCR mixture (25 μl) contained bacterial DNA, PCR buffer (10mM Tris/HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 μM of each dNTP and 1.0 U Taq polymerase (Promega). The mixtures were amplified for 35 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, and a final extension at 72 °C for 5 min, in a PCR equipment PTC 100 ThermalCycler (MJ Research). Five microliters of each amplified product was electrophoresed in a 1.0 % (w/v) agarose gel with a molecular size marker (Hyperladder II, Biorline®) in parallel. Electrophoresis in Tris/borate/EDTA buffer was performed at 100 V for 90 minutes. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 μg ml<sup>-1</sup>) for 15 min, rinsed and photographed under UV light illumination.

The PCR products were gel-purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN). Both strands of the PCR products were sequenced twice with an ABI

**Table 1.** Description of isolated *Clostridium* spp., from soil samples obtained in ten farms located in five different municipalities in Colombia.

Municipality	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Clostridium glycolicum</i>	<i>Clostridium hastiforme</i>	<i>Clostridium limosum</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Clostridium tertium</i>	Total
Mariquita	1	1	0	1	1	0	1	2	0	7
Nemocon	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
Puerto Lopez	0	0	0	2	1	0	0	5	1	9
Ubaté	1	1	0	0	1	0	0	3	0	6
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>24</b>

310 automated sequencer according to the manufacturer's instructions (Perkin-Elmer), using the PCR primers described above. The sequences of the PCR products were compared with known 16S rRNA gene sequences in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) by multiple sequence alignment using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994). Later the sequences were analyzed using MEGA software ver. 4 (S. Kumar@asu.edu, Kimura, 1980; Tamura, Dudley, Nei, & Kumar, 2007), we employed two genetic distance measures, firstly the Kimura's two parameter model was used (Kimura, 1980), which corrects for multiple hits, taking into account transitional and transversional substitution rates, while assuming that the four nucleotide frequencies are the same and that rates of substitution do not vary among sites (see related Gamma distance). Later Tamura's 3-parameter model was used, which corrects for multiple hits, taking into account differences in transitional and A+T rates and G+C-content bias (Tamura, 1992). It assumes an equality of substitution rates among sites. The stability of relationships was assessed by using a minimum of 1,000 bootstrap trees generated for each data set.

## RESULTS

A total of 24 *Clostridium* spp. were isolated from the soil samples cultures during the 2-year study period. According to the biochemical characterization the 24 isolates were identified as *Clostridium sordellii* (41.7%), *Clostridium glycolicum* (12.5%), *Clostridium hastiforme* (12.5%), *Clostridium botulinum* (8.3%), *Clostridium butyricum* (8.3%), and with the same proportion were identified *Clostridium chauvoei* (4.3%), *Clostridium limosum* (4.3%), *Clostridium septicum* (4.3%) and *Clostridium tertium* (4.3%) (Table 1).

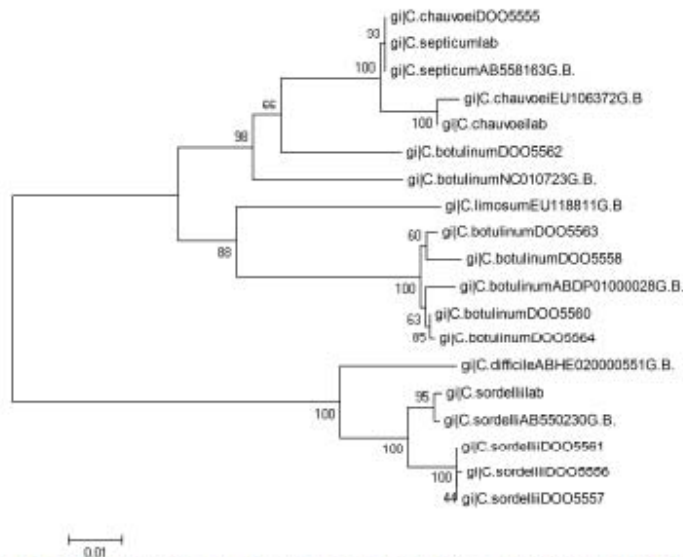
In the Puerto López locality (Meta department) was found the higher number of isolates (37.5%), followed by the Mariquita locality (Tolima department) (29.2%) and similar isolate numbers in the Ubaté locality (Cundinamarca department) (25%), finally the lower number of isolates was found in the Nemocon locality (Cundinamarca department) (8.3%). The isolates were

correlated with precipitation and temperature levels ( $p < 0.05$ ). By 2007, the higher precipitation was shown in the Puerto López locality with 2521.95 mm and temperature annual average of 26.6 °C. In Mariquita locality was showed an annual precipitation score of 2481.31 mm, with a temperature annual average of 24.6 °C. More low annual precipitation average (1183.57 mm) was displayed in the Nemocon locality and the annual average temperature was 17.69 °C. Finally in the Ubaté locality was found the lower annual average precipitation with 1041.37 mm and annual temperature of 13.43 °C.

The selected bacteria were used to obtain the sequence of a 1500 bp fragment from 16S rRNA gene (Collins et al., 1994). The 16S rRNA sequences of 34 strains of clostridia were determined by direct sequencing of PCR amplified rRNA gene products. These new sequences were aligned and compared with homologous sequences of 16S rRNA from 21 other clostridial and selected reference strain belonging to low G+C content gram-positive genera available from GenBank and were estimated the genetic differences between bacteria. The results were indicated in figure 1.

In the phylogenetic analysis were estimated the genetic similarity values, by means of Kimura measure (Kimura, 1980); and we found the lower distance values between *C. sordellii* (D005556) and *C. sordellii* (D005557) (0.0007) bacteria; *C. sordellii* (D005557) and *C. botulinum* (D005561) (0.0007) bacteria; *C. sordellii* (D005557) and *C. sordellii*, commercial strain (0.0140). On average, those bacterial strains displayed a sequence identity of 98.3% and were grouped in the first cluster, which were showed in the 98% of repeats after a 1000 resampling procedure by bootstrapping method. This first bacterial cluster also displayed a high similarity with *C. difficile* obtained from GenBank bacterial sequence, which has integrate another clearly defined cluster and was showed in the 100% of repeats.

In the second group, lower distance was found between *C. botulinum* (D005560) and *C. botulinum* (D005564) (0.000), where the identity between strains were 99.7%, indicating high similarity. Additionally the distance between these bacteria with *C.*



**Figure 1** Dendrogram showing the phylogenetic relationships between strains from *Clostridium* spp. genus, based on 16S rRNA. The tree was constructed with Kimura 2th - Parameter genetic distance. (Mega 4@), and using the neighbor-joining method and bootstrap values calculated from 1,000 trees. Bar = 1% sequence divergence.

botulinum bacterial sequence obtained from GenBank (ABDP0100008) was 0,003, with a sequence identity of 99,9% and 99,6% respectively; in the dendrogram this group was displayed in the 90% of the repeats. Moreover the *C. botulinum* bacteria (DOO 5558) showed another cluster with a low genetic distance of (0,010) with *C. botulinum* bacteria (DOO5563), and were grouped within of this cluster and were observed in the 100% of repeats.

The third cluster was displayed between *C. septicum* commercial strain and *C. chauvoei* (DOO5555) (0,000), where was found lower distance measure indicating near similarity; and also were shown a low distance with sequence of *C. septicum* obtained from GenBank (Accession number AB558163) (0,037). Within this cluster also was found another group integrated by *C. chauvoei* commercial strain (0,007), which showed high similarity with a *C. chauvoei* sequence obtained from Gen Bank (accession number EU106372). Those bacteria displayed a sequence identity of 94,8 % with *C.*

*septicum* and 95,4 % with *C. chauvoei* respectively, integrate a clearly defined group in the 100% of the repeats.

Finally the sequences obtained from *C. botulinum* commercial strain and sequence of *C. botulinum* obtained from Gen Bank (Accession Number NC010723) displayed a lower genetic distances with this last group showed a genetic distance of 0,07 and 98% of sequence similarity between two *C. botulinum* strains and were grouped in this cluster in the 98% of repeats. Similar results were displayed, when was estimated the genetic similarity values by means of the Tamura method (Tamura, 2007),

## DISCUSSION

The biochemical identification to *Clostridium* allowed us a more precise classification of the bacterial genus isolated however it has showed a low discrimination power, is expensive and time consuming due to great

quantity of labor and material needed. In our work the biochemical characterization was combined with the molecular characterization, but was found that the bacteria classified as *C. sordellii*, *C. tertium*, *C. limosum* and *C. glycolicum* were found as *C. botulinum*. In the biochemical characterization, the bacterial strains were  $\beta$  hemolytic and some reports has found that this criteria as lipase or lecithinase could be an indication of pathogenicity (Hateway 1988, 1990 and Smith 1968). However it is necessary to review the biochemical traits than included subjective evaluations being inaccurate their evaluation, therefore requires the use of tools with greater sensitivity and specificity.

Since several years has been demonstrated the use of 16s rDNA to do the more quick diagnostic of the infections due to different *Clostridium* species. In spite of than the sequence of some regions of 16s rDNA gene have displayed homology in several bacterial strains, other regions have showed a considerable difference (Urtler et al., 1991), becoming a good alternative to identify the clinically important *Clostridium* strains.

#### ***Clostridium sordellii***

In our study, the principal isolated bacteria was the *Clostridium sordellii* (41,7%), similar results were found in Costa Rica (Gamboa et al., 2005) where the *C. sordellii* (42 %) and *C. perfringens* (38 %) were the more frequently bacterial strains isolated in soils.

Were analyzed the 16s rDNA gene sequences from bacterias *C. sordellii* and *C. botulinum*, isolated from soil samples obtained at three different locations (*C. sordellii*, DOO5556, municipality of Ubaté, Cundinamarca; *C. sordellii*, DOO5557, municipality of Puerto López, Meta; Commercial Laboratory, Armero, Tolima and *C. sordellii* DOO5561, municipality of Ubaté, Cundinamarca) and displayed a sequence identity of 98,3%, indicating the prevalence of those bacterial strains across the regions. *C. sordellii* is a highly pathogenic strain to animals because can produce two principal virulence factors, the hemorrhagic toxins and the lethal toxins (LT), that are related with diarrhea and enterotoxaemia in domestic animals and caseous gangrene. Moreover, the exposition to hemorrhagic toxin can induce a hemorrhagic activity, while than the exposition to LT can cause severe edema (Just et al., 1996). The *C. botulinum* are compromised in food poisoning in bovine by means of exposition to neurotoxins C and D and their pathogenicity are characterized by outbreaks of mortality with clinical manifestations in nervous paralysis with motor paralysis of hind member (Ortiz & Villamil, 2008).

The *C. sordellii* bacterium was isolated from wounds infections in humans, later, the bacteria was involved as cause of death in cattle in Nevada, USA. Recently, fatal infection by *C. sordellii* has been observed in association with obstetric surgeries (Ramírez & Abel-Santos, 2010).

The *C. sordellii* strain isolated by a commercial laboratory in the Armerovillage, was obtained from an outbreak of mortality in the nineties and was included in a biological vaccine used to prevent disease. This bacterial strain was studied by DNA sequence, and was found a high similarity with the sequence of the *Clostridium sordellii* bacterium isolated in those geographical areas, indicating that the tropical strains have the same origin, those results are noteworthy by the contribution to determination of the ecology of this bacteria, which might be the main responsible of the bovine mortality in areas included in our study.

#### ***Clostridium botulinum*, *Clostridium limosum* and *Clostridium glycolicum***

The *C. botulinum* can be found in soil samples and aquatic sediments (Hauschild, 1989). By means of the neurotoxin C and D this bacteria can be compromised with the poisoning by foods in bovines, and can be concomitant with mortality out breaks with clinical symptoms of the nervous and motor paralysis of hind legs (Hateway, 1988; Tibballet al., 2003; Ortiz & Villamil, 2008). Their neurotoxins are thermolabile and can be denatured easily.

The results of this study indicated that *C. botulinum* (DOO5560) and *C. botulinum* (DOO5564) (0,00077) have a high sequence identity, which allow us to deduce that have a similar phylogenetic origin, similar situation were found with *C. botulinum* (DOO5558) and *C. botulinum* (DOO5563) (0,000854). Despite demonstrate in our results the toxic effect found in our cultures it is necessary identify the toxicity reproduced by those bacteria and analyze the sequence for their coding genes as BoNT (Urtler et al., 1991). In the Mariquita municipality (Tolima department) and the Ubaté municipality (Cundinamarca department) the *Clostridium botulinum* was also isolated, confirming the presence and importance of this organism as the causative agent of food poisoning in cattle, associated with cases of sudden death (neurotoxins C and D), which had been demonstrated in the epidemic outbreak of mortality in the west savannas in Colombia (Hateway, 1988, 1990; Ortiz, 2000).

In Brazil was conducted a study of isolation and characterization of *C. botulinum* strains, isolated from soil and clinical samples. It was demonstrated that these areas were poor in phosphorus and that farmers replaced the native pasture grasses by exotic crops

and they improved the genetic and reproductive management, but not were corrected the soil deficiencies (Bariloche, 2002). The Botulism epidemic occurs extensively in animals raised on pasture low in phosphorus without adequate mineral supplementation, due to the bovine habits of gnawing animal bones (alotriofagia), with higher incidence in the rainy season (Ortiz, 2000). The prevalence of the disease often affects gestants cows and / or lactation cows, rarely attacking calves and other animals even more rarely adults.

From the soil samples were isolated the 39% of strains of *C. botulinum*; the isolation of *C. botulinum* samples type C and D had provided information to characterization of *C. botulinum* responsible for bovine botulism in Brazil. The use of strains isolated in the country for the production of tetanus toxoid became a factor that improved rates of protection against field challenges (Bariloche, 2002).

In Colombia as a result of the outbreak of mortality in the 1990's, was conducted a cross sectional epidemiological study to examine the problem of bovine mortality in the Colombian Orinoquia. It was deduced that the low content of calcium and phosphorus in tropical soils led to a condition called alotriofagia, which predispose to the animal to die of food poisoning by consuming the toxins produced by *Clostridium botulinum* (Ortiz, 2000).

It has been found (Eklund et al., 1971; Govind et al., 2009) that some non toxic bacterial strain of *Clostridium botulinum* and *Clostridium difficile* is transformed into toxic because of bacteriophages that influence the gene regulation that induce to toxins production, which could happen in the bacteria found, so is necessary develop research studies in this area.

#### ***Clostridium chauvoei***

We also have isolated *Clostridium chauvoei* bacteria, in Nemocón municipality, (Cundinamarca department). This bacteria cause the disease known as blackleg in bovine specie, characterized by fever, depression, lameness and high mortality rates. This bacterial strain showed a high sequence similarity with *Clostridium septicum*, which also was isolated in the Mariquita municipality (Tolima department), which produce similar clinical symptoms to *C. chauvoei*, indicating that these bacteria are playing an important role as causative agents of mortality found (Kuhnert et al., 1996). *Clostridium chauvoei*, displayed a cross reaction with *Clostridium septicum*, and both have a high immunogenic similarity (Kojima et al., 2000).

In Zambia (África), Mudenda et al., (2000), have realized a retrospective study of cattle diseases in extensive production and they found that in soils which

was isolated *C. septicum* and *C. chauvoei*, there was presence of malignant edema and blackleg in cattle. Were taken soil samples from 5 regions and was observed the presence of *Clostridium* using conventional methodologies; isolated *C. septicum*, *C. novyi* and *C. chauvoei*, which were characterized by direct immunofluorescence (IFA). The isolation of clostridia from soil was of great importance, because it was shown that in places where bacteria isolated were related to documented clinical cases in bovines. Therefore the soil analysis and its correct location was very useful to implement plans for vaccination and prevention, similar situation to that found in this study.

Kuhnert et al. (1996), have obtained the sequences of 16S rDNA genes (genes *rrs*) of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*, and was found a relationship between *Clostridium*. They amplified a 1507 pb fragment located in the *rrs* gen; the sequence similarity analysis showed a phylogenetic relationship between *C. chauvoei* and *C. septicum*, and was found a 99,3% of similarity between bacterial strains for this gene.

Similar results were found in our paper, where the *C. septicum* and *C. chauvoei* both strains from commercial laboratory, have showed a high sequence identity (98,6%), indicating a close phylogenetic relationship, but hinders the accurate identification of one them by conventional methods so that the techniques presented in our paper could be a good alternative.

The conventional methods for diagnostic of *Clostridium* pathogens in clinical or food samples were based on bacterial culture (Peterson et al., 1996), cellular culture to evaluate the cytotoxicity produced by these bacterias (Delmee et al., 2005), or mouse bioassay (Lindstrom et al., 2001). However in these assays are consuming a lot of time, because it takes several days to complete the procedure. As a result, these methods do not provide timely results affecting the performance or life of patients. Several studies have demonstrated the use of multiplex PCR for the *Clostridium* spp detection (Jarvilisri et al., 2010). Sasaki et al., (2000), has shown the use of PCR techniques to detect *Clostridium chauvoei* DNA using primers derived from 16S rDNA and their results were displayed in the identification of 37 *Clostridium* strains and 3 strains of other genus, suggesting than this test can be useful to identification of *Clostridium chauvoei* in culture mediums and animals clinically affected by blackleg. Subsequently determined the partial sequence of 16S rDNA (1465 pb) of *Clostridium novyi* type A, B and C and the *Clostridium haemolyticum* which were clustered with *Clostridium botulinum* type C and D. The sequence of 16S



rDNA of *Clostridium novyi* type B and *Clostridium haemolyticum* were completely identical only were different by 1 bp (similarity level of 99.9%) from *Clostridium novyi* type C. Was found an homology of 98.7% with *Clostridium novyi* type A and shown a greater similarity in the sequence of 16S rDNA from *C. botulinum* C and D. These results suggest that the types of *C. novyi* B and C and *C. haemolyticum* can be an independent specie generated from same phylogenetic origin (Sasaki et al., 2001).

#### Other Clostridium

Other types of *Clostridium* strain as *Clostridium hastiforme*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium tertium*, were isolated in this work, many of whom are believed than have not pathogenic effect on Cattle.

The distribution of the wide variety of *Clostridium* on soil is an indicator of high biodiversity present on the Colombian soils, which can be associate with grazing animals so it is necessary to increase efforts to know the natural history of these bacteria and its pathogenesis. In our work, *C. tertium* produce no hemolysis but it have displayed cytotoxicity in cell cultures, which help to provide evidence about of its toxic effect it could have acquired by plasmids or transposons. The pathogenic islands (PAIs) are bacterial DNA segments that carry one or more virulence genes, which can be acquired in bulk from an external source (Mainil et al., 2003). The pathogenic genome usually represents a mosaic between these new acquired islands and a relatively old DNA. The PAIs are identified as by their difference in the percentage of G+C content relative to the average chromosome and other features that suggest its acquisition through the mobile genetic elements.

Genes to a wide range of virulence determinants are associated with PAIs, including those that code for certain mechanisms that enable to resist the host defenses, colonization factors and acquisition of nutrient and toxins (Femández et al., 2004). Other studies have indicated that *Clostridium perfringens* has a high degree of genetic interchange, a situation that allow the transfer of virulence factors and gives them the ability to produce different toxins as a result of the loss or gain of the specific genes. There are not large differences between different types of *Clostridium* were it not for the transportation of certain virulence genes. The evidence indicate that some virulence factors encoded on plasmids can be transferred horizontally. The horizontal genetic movement is also facilitated by transposons (Deguchi et al., 2009; Morris et al., 2009), these evidence could allow explain why some bacteria can be toxics, situation that was showed with these three bacteria in Colombia.

#### CONCLUSION

The *Clostridium* spp pathogens isolated from soil of farms affected by bovine mortality, showed genetic differences with reference bacteria used by commercial laboratories for the production of bacterins and toxoids. In this work the biochemical characterization allowed us identified bacterias as *C. sordellii*, *C. tertium*, *C. limosum* and *C. glycolicum* and classified them as *C. botulinum* by ADN analysis, but the principally isolated bacteria in soil samples was *C. sordellii*, this bacteria is highly pathogenic in animals, producing a highly mortality in the Colombian herds. These results are consistent with observations in the countryside, where animals die despite being immunized. Local characterization studies are needed to know the natural history of bacteria associated with soils and develop strategies for prevention and control including such bacteria in the immunogen.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Francisco José de Caldas Institute for Development of Science and Technologies (COLCIENCIAS), and the cooperation of Colombian Agricultural Research Corporation CORPOICA, Colombia.

#### REFERENCES

- Collins MD, Lawson PA, Williams A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cal J, Hippe H, Farrow JAE (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 44, No. 4, p. 812-826
- De Blas I, Ortega C, Franjeo K, Noordhuizen J, Trustfield M (1998). *WinEpiScope* 2.0. Departamento de Patología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Zaragoza (España); Departament of Animal Sciences of Wageningen Agricultural University (The Netherlands). <http://www.clive.ac.uk/winEpiScope>
- Dobbs L, Madigan M (2002). Use of FTA gene guard filter paper for the storage and transportation of tumor cells for molecular testing. *Arch Pathol Lab Med*, 126(1): 56-63.
- Eklund MW, Poysky FT, Reed SM, Smith CA (1971). Bacteriophage and the toxigenic of *Clostridium botulinum* type C. *Science*, Vol 172, 3982: 480-482.
- Escobar RMC (2009). *Microbiología del suelo*. Universidad de Antioquia. p. 94. <http://www.vanguardia.udes.edu.co/cursos/salud%20y%20ambiente/temas%20TEORIA/microbiologia%20C3%A1a%20de%20suelo.ppt>
- Ferraris GN (2005). Muestreo y Análisis de Suelo: Punto de partida hacia un diagnóstico de fertilidad. *Desarrollo Rural INTA*. <http://www.elsitioagrícola.com/>
- Gambos M, Rodriguez E, Vargas P (2005). Diversity of mesophilic in Costa Rican soils. *Ecology/Environmental microbiology*. *Anaerobe* (11): 322-326.
- Govind R, Vedyappan G, Rolfe RD, Dupuy B, Joe F (2009). Bacteriophage – Mediated Toxin Gene Regulation in *Clostridium difficile*. *Journal of Virology*. Vol 83, 22: 12037-12045.

- Hernández F, Chaves F, Freier E (2000). Clostridiumlatari, tétanos y su frecuencia en Costa Rica: ciudad de Puntarenas, Costa Rica y el fenómeno de Swarming. *Revista Biomédica*. Vol 12. p. 80 – 84.
- Hernández F, Chaves F, Umaña M (2001). Aislamiento de Clostridiumlatari en la ciudad de Puntarenas, Costa Rica y el fenómeno de Swarming. *Revista Biomédica*. Vol. 12. p. 80 – 84.
- Hernández F, Rodríguez E, Umaña M, Vargas P (1997). Isolation of swarming clostridia from soil samples. *Revista Biología Tropical*. Vol. 45: 1243-1245.
- Hernández F, Rodríguez E, Vargas P, Umaña M (1996). Clostridiumlatari en suelos de la ciudad universitaria Rodrigo Facio. *RivCostCiencMed*; 17: 34-38.
- James CP, Aristizabal GFA, Bernal MM, Suárez ZR, Montoya D (2006). AFLP fingerprinting of Colombian Clostridium spp strains, multivariate data analysis and its taxonomical implications. *Journal of Microbiological Methods*. (67): 64-69.
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*16:111-120.
- Kojima A, Uchida I, Sekizaki T, Sasaki Y, Ogiku Y, Kijama M, Tamura Y (2000). Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of Clostridium chauvoei. *Veterinary Microbiology*.76: 359-372.
- Mainil J, Duchesnes C, Paikonen S, Dubrouil L, Menozzi MG (2003). Clostridia in health and diseases. Concerted Action QLK2-CT2001-01267. "Pathology and Ecology of the Genus Clostridium in Humans, Animals, and Foodstuffs: Identification, Epidemiology and Prophylaxis". <http://www.genusclostridium.net>
- Mardigan M, Martinko J, Parker J (2000). *Brook. Biología de los microorganismos*. Octava edición. Prentice Hall, Madrid - España.
- Ortiz OD (2000). Estudio epidemiológico del problema de mortalidad bovina en la Orinoquia colombiana. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá D.C. 290 p.
- Otta J (1991). El diseño de investigaciones epidemiológicas. Proyecto Colombo Alemán, introducción de un sistema de asistencia técnica integral pecuaria, GTZ, ICA, UNISALLE. Centro Internacional de Capacitación en Desarrollo Pecuario. CICADEP. Santafé de Bogotá, Colombia. 40 p.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC (2004). *Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias*. Editorial Activa, S. A. Pp. 30.
- Ramírez N, Abad-Santos E (2010). Requirements for Germination of Clostridium sporoblasts in Vitro. *Journal of Bacteriology*, Jan. 2010, Vol. 192, No. 2. p. 418–425.
- Rogers D, Burgoyne L (2000). "Reverse transcription of an RNA genome from databasing paper (FTA®). *BioTechnolApplBiochem*. 31 (Pt 9): 219-224.
- Saleh-Lakha S, Miller M, Campbell RG, Schneider K, Elahimanesh P, Hart MM, Travers JT (2005). Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods*. 20pp.
- Songer GJ, Post WK (2005). *Veterinary Microbiology. Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Editorial Saunders. Pp 448.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).
- Tibball R, Mainil J, Duchesnes C, Popoff M (2003). 4. Clostridia in health and diseases. *Genus Clostridium Concert Action QLK2-CT2001-01267*. 9 p. <http://www.genusclostridium.net>.
- Vanechoutte M, Cartwright CD, Williams EC, Jäger B, Tichy HV, De Baets T, De Rouck A, Verschaeven G (1996). Evaluation of 16S rRNA Gene restriction analysis for identification of cultured organism of clinically important Clostridium species. *Anaerobe* (2): 249-256.

## Anexo 5: Artículo sometido a evaluación para publicación en la Revista MVZ de la Universidad de Córdoba. 2012



Órgano de Difusión de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad de Córdoba  
Montería - Colombia

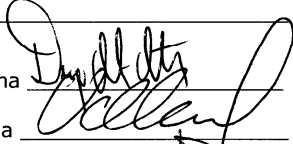



### FORMULARIO DE DECLARACION PARA LOS AUTORES

**Este formulario completado debe acompañar cada manuscrito enviado a la Revista MVZ Córdoba. (Señale con una X la casilla que corresponda).**

Mediante la firma de este documento, aceptamos que: 1) Hemos participado activamente en el Art. de investigación (X), Art. Técnico ( ), Revisión de literatura ( ), Revisión de tema ( ), Comunicación breve ( ) o Caso Clínico ( ), así como en el posterior análisis de los datos e igualmente participamos en la escritura del manuscrito, lo cual nos responsabiliza por el mismo. 2) El citado manuscrito no ha sido publicado previamente ni se está sometiendo actualmente a revisión para su publicación por otra revista 3) Declaramos abajo, si los hubiera, cualquier apoyo financiero o conflicto de interés que involucre el manuscrito en cuestión 4) En caso de publicación del trabajo, los derechos de autor son cedidos a la Revista MVZ Córdoba 5) Toda la información suministrada en este formulario y en cualquier carta que acompañe el envío del manuscrito es verdadera.

#### TÍTULO DEL MANUSCRITO

Epidemiología de clostridios patógenos asociados a los suelos en ganaderías tropicales, causantes de muerte súbita en bovinos

AUTOR (ES)	
Nombre <u>Diego Ortiz Ortega</u>	Firma 
Nombre <u>Luis Carlos Villamil Jiménez</u>	Firma 
Nombre <u>Juan Felipe Martínez Rocha</u>	Firma 
Nombre <u>Rodrigo A. Martínez Sarmiento</u>	Firma 
Nombre _____	Firma _____
Nombre _____	Firma _____

Nombre de autor corresponsal: Diego Ortiz Ortega  
 Dirección Calle 97 # 71 c 20 Ap 209 Ciudad Bogotá  
 País Colombia AA \_\_\_\_\_ Celular (móvil) 3105740776  
 Teléfono (s) 4227300 Ex 14 31 Fax (s) 4227300  
 e- mail (Institucional) dortiz@cospica.org.co  
 e- mail (Personal) dortizort@yahoo.com

(41 predios 24,8%), departamento de Cundinamarca, durante el año 2007.

**Resultados.** La prevalencia para Clostridiosis en fincas fue de 27,3%. La prevalencia para Clostridiosis encontrada en bovinos fue 3,14%. La mortalidad por Clostridiosis se relacionó con las variables bioclimáticas como temperatura y precipitación. Se demostró que a mayores niveles de temperatura y precipitación se favorece la presentación de brotes epidémicos de mortalidad súbita. También se demostró que los grupos etarios con mayor riesgo de adquirir Clostridiosis fueron las poblaciones de novillas y de vacas horras. La eliminación inadecuada de cadáveres fue un factor determinante en la presentación de brotes epidémicos de mortalidad súbita. Se demostró que los suelos de la mayoría de fincas positivas a mortalidad por Clostridiosis correspondían a suelos clase III, los cuales presentaron problemas de manejo relacionados con inundaciones y con dificultad del movimiento del agua a través del mismo.

**Conclusiones.** Los resultados demuestran los principales factores determinantes que explican la mortalidad súbita en bovinos en la zona de estudio.

**Palabras clave:** Clostridium, factores de riesgo, prevalencia, salud animal

(Fuente: DeCS)

### **Abstract**

**Objective.** We conducted a cross-sectional epidemiological study to hypothesized risk factors associated with sudden death in cattle (clostridiosis) and identify indicators of mortality. **Materials and methods.** The study included 165 farms, located in four localities Mariquita, (Tolima) (41 farms, 24.8%), Puerto López, (Meta) (42 farms, 25.5%) Nemocón (41 farms 24.8%) and Ubaté (41 farms 24.8%) (Cundinamarca), in 2007. **Results.** The farm prevalence to clostridiosis was 27.3%. The prevalence found in cattle was 3.14%. Clostridiosis mortality was related to the bioclimatic variables such as temperature and precipitation. It was shown that higher levels of temperature and precipitation favor the presentation of sudden death outbreaks. It also demonstrated that the age groups most at risk of acquiring clostridiosis were populations of heifers and dry cows. An inadequate disposal of bodies became a very important risk factor related to the presentation of outbreaks of sudden death. It was shown that the soils of most positive farms corresponded to soil class III, which presented problems related to flood and difficulty of

*movement of water through it. **Conclusions.** The results show the key determinants that explain the sudden death in cattle in the study area.*

**Keywords:** clostridium, risk factors, prevalence, animal health (Source: DeCS)

## **Introducción**

En las ganaderías bovinas de Colombia se presentan frecuentemente brotes epidémicos de mortalidad súbita, condición que se caracteriza porque los animales de cualquier edad mueren repentinamente sin presentar síntomas ni alteraciones en su comportamiento o en su condición corporal; la brevedad del cuadro clínico no permite la realización de un diagnóstico oportuno o la instauración de planes terapéuticos. Cuando el animal fallece no se observan lesiones evidentes de la enfermedad, lo cual dificulta la diagnosis, que en la mayoría de los casos se debe basar en las evidencias epidemiológicas (1, 2).

El objetivo del presente trabajo fue investigar la epidemiología de las bacterias anaerobias patógenas asociadas a los suelos y esclarecer los factores determinantes relacionados con la presentación de brotes epidémicos de mortalidad súbita en bovinos, a partir de un estudio epidemiológico transversal realizado en el año 2007, que incluyó 165 predios en los municipios de Mariquita (Tolima), Puerto López, (Meta) Nemocón y Ubaté (Cundinamarca).

## **Materiales y métodos**

El tamaño de la muestra se determinó siguiendo la metodología para estimar la prevalencia de una enfermedad en poblaciones grandes (3, 4). El levantamiento epidemiológico del estudio se desarrolló tomando como marco de muestreo el total de hatos de la zona, que eran 3431 (5). En el municipio de Mariquita (Tolima) se muestrearon 845 hatos; en el municipio de Puerto López (Meta) 875 hatos; en los municipios de Nemocón y Ubaté (Cundinamarca), se incluyeron un total de 848 y 863 hatos, respectivamente. Utilizando una fracción de muestreo de 4,81, se calculó el tamaño de la muestra para cada municipio, resultando 41 fincas en el municipio de Mariquita, 42 fincas en el municipio de Puerto López, 41 fincas en el municipio de Nemocón y 41 fincas en el municipio de Ubaté, para un total de 165 fincas. Se estableció

como unidad de muestreo cada uno de los hatos. De acuerdo a estudios realizados previamente (6) se determinó prevalencia del 12% para hatos. La información se obtuvo en las fincas, entrevistando a los propietarios, arrendatarios y mayordomos. Se aplicó el formato de encuesta estructurada (7).

Se definieron las proporciones de fincas afectadas por Clostridiosis (de acuerdo a registros y diagnóstico realizados por el Instituto Colombiano Agropecuario) expuestas a un factor y se compararon con las proporciones de fincas afectadas por Clostridiosis no expuestas al factor (3, 4). Para estimar el riesgo y determinar la significancia de una asociación entre la muerte de bovinos y un factor causal hipotético, se utilizó la Razón de Prevalencias (RP) (4, 7, 8).

Para las variables cuantitativas, en la comparación entre grupos, en primera instancia se determinó si las varianzas eran homogéneas utilizando la prueba de Bartlett. Si esto era cierto, se procedía a realizar el análisis de varianza paramétrico tradicional (prueba f de Fisher); utilizando una prueba de t de Student para comparar promedios adyacentes. En los casos donde no existía homogeneidad entre las varianzas, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica), comparando en este caso no los promedios, sino las medianas de cada grupo. Posteriormente se utilizó la prueba de Mann-Whitney/Wilcoxon (prueba de Kruskal-Wallis para dos grupos), para determinar la diferencia entre medianas adyacentes. (4, 7, 8, 9, 10, 11,). Para relacionar los casos de mortalidad con las variables bioclimáticas se utilizó el software Diva-Gis®. El software posee un archivo de clima (World Clim) por defecto para todo el mundo excepto para los cuerpos de agua mayores (océanos) y para la Antártida. Estos datos son almacenados en un formato especial (archivos CLM) (12, 13).

## Resultados

La prevalencia para fincas afectadas por Clostridiosis fue de 27,3%. Los resultados por municipio se observan en la tabla 1. El número de fincas menores de 40 ha fue de 89 (53,9%), de las cuales 20 (12,1%) resultaron positivas a Clostridiosis, el mayor porcentaje de positividad de fincas menores de 40 ha se presentó en el municipio de Nemocón (4,8 %).

**Tabla 1.** Relación absoluta y porcentual de fincas afectadas por municipio. Total de animales muertos por municipio. Prevalencia en fincas y prevalencia en animales muertos por Clostridiosis (Tasas de mortalidad). 2007.

Indicadores de mortalidad	Municipio			
	Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté
Total fincas	41(24.8%)	41 (24.8%)	42(25.5%)	41 (24.8%)
Fincas afectadas	17 (10.3%)	12 (7.3%)	6 (3.6%)	10 (6.06%)
Prevalencia fincas	41,46	29.27	14,29	24,39
Población bovinos	5644	1959	7269	4091
Animales muertos (Clostridiosis)	172	35	309	79
Promedio	4,19	0,85	7,35	1,92
LC 95%	2,29-6,08	0,25-1,44	2,30-12,39	0,45-3,38
Prevalencia Clostridiosis bovinos	3,05	1,79	4,25	1,93

La prevalencia para fincas menores de 40 ha afectadas por Clostridiosis fue de 22,4%. Los resultados se observan en la tabla 2.

Se encontró un total de 33 fincas de entre 41 a 100 ha de tamaño (20%), de las cuales 10 (6,06%) resultaron positivas; el mayor porcentaje de positividad de fincas de esta área se presentó en los municipios de Mariquita (2,4%) y Nemocón (2,4%). La prevalencia de punto para fincas entre 41 a 100 ha afectadas por Clostridiosis fue de 30,3%. Los resultados se muestran en la tabla 2.

El 26% de las fincas analizadas tuvieron un área mayor de 100 ha, de las cuales el 8,5% resultaron positivas a Clostridiosis, siendo el municipio de Mariquita el que presenta un mayor porcentaje de positividad (4,24%). La prevalencia de punto para fincas mayores de 100 ha afectadas por Clostridiosis fue 32,5%.

**Tabla 2** Hectáreas/predio (promedio) de las fincas entrevistadas en los municipios de Mariquita, Puerto López, Nemocón y Ubaté; distribución porcentual de fincas según su tamaño. Comparación fincas positivas y negativas a Clostridiosis. 2007

Factor		Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté	Total
		Tolima	Cundinamarca	Meta	Cundinamarca	
Número de fincas	Pos	17 (10,3%)	12 (7,27%)	6 (3,6%)	10 (6,06%)	45 (27,3%)
	Neg	24 (14,5%)	29 (12,1%)	36 (21,8%)	31 (18,8%)	120 (72,7%)
Total ha	Pos	1490	291	3803	609	6193
	Neg	4971	783,5	7242	878,8	13875,3
Tamaño/ha (Prom)	Pos	87,67	24,25	633,83	60,9	137,6
	Neg	207,1	27,01	201,16	201,16	115,63
p		0,26	0,73	0,045	0,037	0,34
Rango (ha)		3,5 – 2.000 ab	1 – 80 a	3,0 – 2.715 b	2,0 - 210 a	1,0 – 2.715
Distribución porcentual de fincas según tamaño		Mariquita	Nemocón	Puerto López	Ubaté	p
< 40 ha	Pos	6 (3,6%)	8 (4,8%)	1 (0,6%)	5 (3%)	0,69
	Neg	10 (6,06%)	23 (13,9%)	10 (6,06%)	26 (15,8%)	
41-100 ha	Pos	4 (2,4%)	4 (2,4%)		2 (1,2%)	0,4668
	Neg	5 (3%)	6 (3,6%)	8 (4,8%)	4 (2,4%)	
> 100 ha	Pos	7 (4,24%)		4 (2,4%)	3 (1,8%)	0,86
	Neg	9 (5,5%)		19 (11,5%)	1 (0,6%)	
Pos= Fincas Positivas a Clostridiosis. Neg= Fincas negativas a Clostridiosis. Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos. p= nivel de significancia.						

La prevalencia en animales afectados por Clostridiosis fue de 3,14%. Los resultados por municipios se observan en la tabla 1, en donde se indica el total de animales en las fincas encuestadas y el número de animales muertos por esta causa. La mortalidad según reportan los productores sucede en mayor proporción en épocas de verano, las cuales corresponden a los trimestres de enero, febrero, marzo y junio, julio, agosto.

Por otra parte el municipio más cálido fue Puerto López (26,6 °C) y el más frío fue el municipio de Ubaté (13,4 °C). La mayor precipitación se presentó en el municipio de Puerto López (2521,95 mm) y la menor en Ubaté (1041,37 mm).

El comportamiento de las variables bioclimáticas durante el año 2007 en las zonas relacionadas con este estudio se observan en la tabla 3, en la que se comparan los valores de las fincas afectadas con los valores de las fincas no afectadas.



**Tabla 3.** Variables bioclimáticas de fincas afectadas y no afectadas por casos de Clostridiosis. 2007

	<b>Fincas positivas</b>	<b>Fincas negativas</b>	<b>P</b>
<b>Isotermas</b>	80,13	77,9	0,0147
<b>Temp estacional</b>	45,9	56,6	0,03
<b>Precipitación mes más seco</b>	56	42,43	0,0478
<b>Precipitación trimestre más seco</b>	216,95	172,91	0,05
<b>Precipitación trimestre más caliente</b>	332,5	281,6	0,024

p=nivel de significancia

La comparación de las variables bioclimáticas entre fincas afectadas y fincas no afectadas permitió determinar que existían diferencias significativas en variables tales como isotermas ( $p=0.014$ ), temperatura estacional ( $p=0.03$ ), niveles de precipitación en el mes más seco ( $p=0.047$ ), niveles de precipitación en el trimestre más seco ( $p=0.05$ ) y en niveles de precipitación del trimestre más caliente ( $0.024$ ) encontrando un mayor valor de éstas variables en las fincas positivas en comparación con los valores de las fincas negativas.

Los valores resultantes demostraron la existente relación de positividad a muerte súbita en épocas secas en aquellas fincas que tienen una mayor precipitación en dicha época, factor que al parecer favorece la presencia de la patología en dichas fincas.

#### **Variabiles relacionadas con las características del suelo**

Los valores de pH de los suelos de las fincas incluidas en este estudio se describen en la tabla 4. Dichos valores se compararon entre fincas positivas y negativas con el fin de determinar alguna relación con los casos de Clostridiosis. En el municipio de Nemocón, se encontraron diferencias significativas ( $p=0,02$ ) en el pH del suelo de las fincas positivas (5,56), comparado con el pH del suelo de las fincas negativas (5,2). En los otros municipios no se encontraron diferencias significativas. Cuando se compararon los valores de pH entre municipios se encontraron diferencias significativas entre Mariquita y Nemocón ( $p=0,01$ ), Mariquita y Puerto López ( $p=0,004$ ); Mariquita y Ubaté ( $p=0,03$ ) y entre Nemocón y Puerto López ( $p=0,03$ ).

**Tabla 4.** Variables relacionadas con el tipo de suelo. pH de los suelos de fincas afectadas y no afectadas por casos de Clostridiosis. 2007

Municipio	Fincas	n	Prom pH	LCI 95%	LCS 95%	P
Mariquita	Positivas	17	6,09	3,22	8,96	0,230 <sup>a</sup>
	Negativas	24	5,84	3,53	8,15	
Nemocón	Positivas	12	5,56	2,45	8,67	0,020 <sup>b</sup>
	Negativas	29	5,22	3,34	7,1	
Puerto López	Positivas	6	3,9	0,81	6,99	0,460 <sup>c</sup>
	Negativas	36	3,99	2,7	5,28	
Ubaté	Positivas	10	4,46	1,72	7,2	0,810 <sup>bc</sup>
	Negativas	31	4,42	2,88	5,96	
Total	Negativas	120	4,77	3,93	5,61	0,001

Letras similares indican que no hubo diferencias significativas entre grupos p = nivel de significancia  
LCI/LCS = Límites de confianza inferior y superior

Las fincas con los suelos más ácidos están presentes en el municipio de Puerto López y las que tienen los suelos más neutros en el municipio de Mariquita. Hubo diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) al comparar las fincas positivas y las fincas negativas, encontrando que un valor de pH más cercano a la neutralidad ( $pH = 5,3$ ), favorecía la presentación de Clostridiosis.

La mayoría de fincas positivas a Clostridiosis (7,9%) se clasificaron en suelos de clase III, que son de textura arenosa a franco arcillosa y de reacción moderadamente ácida a neutra. 4,2% de las fincas positivas se clasificaron en suelos clase II y clase VII. De las fincas positivas restantes, un 2,4% y 0,6% se clasificaron en las clases IV y VI. No se encontraron diferencias significativas entre fincas positivas y negativas.

También se relacionaron los valores en porcentaje de arcilla. Este elemento fue comparado entre fincas positivas y negativas, encontrando diferencias significativas ( $p = 0,02$ ) en el municipio de Nemocón, con el valor más bajo en las fincas positivas (33,7%), mientras que en las fincas negativas el valor fue mayor (37,2%).

Los valores porcentuales de arena en los suelos fueron comparados entre fincas positivas y negativas y entre municipios sin encontrar relaciones estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Los valores porcentuales de limo en los suelos también fueron comparados entre fincas positivas y negativas y entre municipios, encontrando diferencias significativas en el municipio de Nemocón ( $p = 0,02$ ) con un valor superior en las fincas positivas (61,1%) comparado con el valor de las fincas negativas (53%).

**Análisis de factores de riesgo**

Los factores determinantes analizados que demostraron asociación significativa estadísticamente fueron:

Rotar potreros con otros cultivos	RPOTCUL
Consumo de piedras por parte de los animales	PIEDRAS
Consumo de plantas tóxicas	PLTOX
Evidencia de trauma en animales afectados	TRAUMAS
Consumo de Helechos	HELECHOS
Signos clínicos en animales enfermos	SCAENF
Quema de los animales muertos	QUEMA
Historia previa de manejo de animales muertos	HISMAN
Entierra los animales muertos	ENTIER
Animales mueren en época transición verano-invierno	INVERA
Especie más afectada (Bovinos)	BOVINOS

Dichos factores se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados de la prueba estadística Razón de prevalencia (RP). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5, en la que se indican dichos valores con sus límites de confianza al 95% y se calculan los valores de riesgo atribuible, fracción etiológica, fracción atribuible de la población y el nivel de significancia encontrado en cada una de las pruebas estadísticas.

**Tabla 5.** Factores determinantes asociados a mortalidad bovina por clostridios. 2007

<b>Factores de riesgo</b>	<b>RP</b>	<b>LCI 95%</b>	<b>LCS 95%</b>	<b>Riesgo Atribuible</b>	<b>Fracción etiológica</b>	<b>Fracción atribuible de la población</b>	<b>p</b>
RPOTCUL	1,96	1,05	3,67	0,25	0,49	0,07	0,01
PIEDRAS	2,15	1,18	3,94	0,29	0,54	0,07	0,04
PLTOX	2,16	1,25	3,75	0,29	0,54	0,1	0,02
TRAUMAS	2,58	1,53	4,36	0,39	0,61	0,1	0,01
HELECHOS	2,67	1,56	4,56	0,42	0,63	0,08	0,01
SCAENF	2,77	1,76	4,37	0,36	0,64	0,26	0
QUEMA	3,75	2,6	5,39	0,65	0,73	0,13	0
HISMAN	3,88	2,72	5,52	0,67	0,74	0,15	0
ENTIER	5,04	2,5	10,14	0,38	0,8	0,66	0
INVERA	6,71	4,53	9,96	0,85	0,85	0,45	0,02
BOVINOS	28	9,08	86,31	0,74	0,96	0,9	0

RP=Razón de prevalencia; LCS=Límite de confianza superior 95%; LCI=Límite de confianza inferior 95%; p=nivel de significancia; RPOTCUL=rota potreros con otros cultivos; PIEDRAS=consumo de piedras por parte de los animales; PLTOX=consumo de plantas tóxicas; TRAUMAS=evidencia de traumas en animales afectados; HELECHOS=consumo de helechos; SCAENF=signos clínicos en animales enfermos; QUEMA= incineración de animales muertos; HISMAN= historia previa de actividades de manejo de animales muertos; ENTIER= enterramiento de animales muertos; INVERA= animales mueren en época de transición verano-invierno; BOVINOS= especie más afectada bovinos

De acuerdo a los resultados, se considera que el factor rotación de praderas con otros cultivos es el responsable del 7% de fincas afectadas con Clostridiosis expuestas y no expuestas a este factor. El factor consumo de piedras por parte de los bovinos es el responsable de un 7% de fincas afectadas a Clostridiosis en fincas expuestas y no expuestas a este factor. Igualmente se observó que los factores presencia de plantas tóxicas y trauma son cada uno responsables del 10% de fincas afectadas a Clostridiosis en fincas expuestas y no expuestas a estos factores.

La relación entre la presencia de helechos en las fincas y la aparición de signos clínicos compatibles con Clostridiosis en los animales fue determinado como factor de riesgo responsable del 8 y 26% respectivamente, de las fincas afectadas por Clostridiosis expuestas y no expuestas a estos factores. La quema de animales muertos es responsable del 13% de las fincas afectadas por Clostridiosis en fincas expuestas y no expuestas a este factor. Las fincas cuyos propietarios reportaron haber realizado actividades previas de manejo en animales muertos por Clostridiosis son responsables

del 15% de los predios afectados por Clostridiosis expuestos y no expuestos a este factor.

Factores como el enterramiento de animales muertos es responsable del 66% de las fincas afectadas por Clostridiosis en fincas expuestas y no expuestas. Igualmente la mortalidad de animales en la época invierno-verano es responsable del 66% de las fincas afectadas por Clostridiosis en fincas expuestas y no expuestas a este factor. Finalmente se considera que la mortalidad de animales de la especie bovina es responsable del 90% de las fincas afectadas por Clostridiosis en fincas expuestas y no expuestas a este factor.

Establecidas las variables determinantes asociadas se realizó un análisis multivariante en donde se incluyeron todas las variables en el modelo (modelo conocido como modelo máximo inicial, por contener todos los términos de confusión y de interacción). Los factores que resultaron significativos en el modelo fueron BOVINO, QUEMA y SCAENF ( $p < 0,05$ ), por lo que se construyó un segundo modelo con estos tres factores determinantes. En este modelo el factor de riesgo SCAENF fue excluido, por lo que se generó un tercer modelo con los dos factores determinantes asociados que explican la mortalidad por Clostridiosis (Tabla 6).

**Tabla 6.** Modelo de regresión logística con factores asociados

Factores de Riesgo	C R ( $\beta$ )	E E	Z	OR	LI (OR)	LS(OR)	p
BOVINO	4,9877	0.7815	6,3819	146,6	31,68	678,2	0.00000
QUEMA ANIMALES	4,0797	1,5089	2,7038	59,13	3,07	1138,05	0.0069

CR=Coficiente de Regresión; EE=error estándar; Z=nivel de confianza; p=nivel de significancia; OR=razón de probabilidades; LI (OR)=límite de confianza inferior; LS(OR)=límite de confianza superior

Este modelo, el cual no excluye ningún factor, indica que aquellas fincas donde se reportó mortalidad por Clostridiosis en bovinos, tienen 146,6 veces más de riesgo de presentar brotes de mortalidad por Clostridiosis que aquellas fincas que no reportaron mortalidad por Clostridiosis en esta especie ( $p < 0,000001$ ). De igual forma se observa que aquellos ganaderos que queman los animales muertos por Clostridiosis tienen 59 veces más de riesgo de que en sus fincas se presenten brotes de mortalidad por Clostridiosis que aquellos que no los queman ( $p = 0,007$ ).

## Discusión

En el informe técnico del Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica del Instituto Colombiano Agropecuario ICA (14), se indica que la prevalencia de animales afectados por Clostridiosis incluyendo *Clostridium chauvoei* y otros clostridios, oscila entre 1,3% y 1,7%, valores que están por debajo de los niveles máximos encontrados en este trabajo, pero que se aproximan a los encontrados en los municipios de Nemocón y Ubaté. Los valores encontrados en los municipios de Mariquita (3,05%) y Puerto López (4,25%) casi duplican las cifras descritas por el ICA. Esta situación se puede explicar en parte debida a que los reportes del sistema de vigilancia epidemiológica son los que llegan a los centros de diagnóstico y son valores que están por debajo de los que se encuentran a nivel de campo. Se reporta una incidencia de 2% para el año en estudio. En un estudio epidemiológico longitudinal en ganadería de carne se demostró que la tasa anual de mortalidad debido a esta patología es en promedio 12,7%, afectando principalmente hembras (6).

Al comparar la temperatura máxima y la temperatura mínima se encontró que los valores más extremos (picos) se ubicaban en los meses de diciembre y enero, que corresponde a los meses en donde la precipitación fue menor. Al comparar las fincas positivas y negativas se encontraron diferencias significativas en la variable precipitación en los meses de diciembre y enero, indicando que esta variable está asociada a los casos de mortalidad. La precipitación es la más baja, pero los valores resultantes en las fincas positivas son mayores comparados con los valores de las fincas negativas. El exceso de agua en el suelo suele causar encharcamiento y pérdida de oxígeno en los capilares del suelo, lo que hace que disminuyan los microorganismos aerobios y aumenten los anaerobios (15). En Nigeria, Bagadi (16) indica que la lluvia tiene un papel importante en el incremento de los casos de pierna negra. Asimismo, Smith *et al.* (17, 18) muestran que la incidencia de *Clostridium botulinum* es más alta en ambientes acuáticos, mientras que la mayor prevalencia de esta especie bacteriana en Japón se presenta en zonas relacionadas con ambientes húmedos, en las riveras de los ríos (19).

En el presente estudio se encontró que suelos con pH neutro favorecen la presentación de Clostridiosis. Es importante señalar que el suelo no es un medio homogéneo y puede presentar diferentes valores de pH entre micro hábitats (15), y que la acidez o alcalinidad de este influye sobre el crecimiento microbiano. Algunos microorganismos se desarrollan

a pH alto (9-14: alcalófilos), mientras que otros lo hacen mejor a valores de pH bajo (5-2: acidófilos), sin embargo, estos rangos pueden variar debido a la adaptabilidad de muchas cepas. Aquellos microorganismos que crecen en rangos de pH de 6 a 8 se llaman neutrófilos. Se debe tener en cuenta que el pH intracelular debe permanecer próximo a la neutralidad sin importar que el pH externo sea altamente ácido o básico y en muchos casos el microorganismo, como consecuencia de su metabolismo, crea un gradiente extracelular de iones  $\text{OH}^-$  ó  $\text{H}^+$  (20). Así, cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible su crecimiento y normalmente posee un pH óptimo muy bien definido (21).

Trabajos realizados en Costa Rica (22) indicaron que la presencia de *Clostridium* en los suelos era independiente del pH del suelo ( $p > 0,05$ ), situación que contrasta con lo encontrado en este trabajo donde un pH cercano a la neutralidad se relaciona con la presencia de clostridios patógenos en las fincas y por ello con la positividad de las mismas. Estos autores mostraron que la presencia de *Clostridium* dependía de un bajo contenido de materia orgánica ( $p < 0,05$ ), situación equiparable con lo encontrado en este trabajo donde la mayoría de fincas positivas se clasificaron en suelos clase III, que incluye suelos aluviales recientes, planos, profundos, de textura arenosa a franco arcillosa, de reacción moderadamente ácida a neutra y de fertilidad natural moderada (23). Los problemas de manejo de esta clase están relacionados básicamente con las inundaciones periódicas ligeras en época de creciente y además se observa cierta dificultad del movimiento del agua a través del suelo (24, 25).

La mayoría de suelos incluidos en este estudio corresponde a suelos francos. El contenido de arcilla y de limo en estos mostró una asociación significativa con la presentación de Clostridiosis en las fincas evaluadas. Esto se debe a que la adsorción de los microorganismos a partículas de suelo está relacionada con las propiedades físicas del mismo. Los fragmentos de roca y minerales presentes en el suelo varían en tamaño y se pueden clasificar en arena gruesa (entre 200 a 2000 micrómetros de diámetro), arena fina (entre 20 - 200 micrómetros de diámetro), limo (entre 2 a 20 micrómetros de diámetro) y arcilla (menor de 2 micrómetros de diámetro). Los principales componentes que afectan la adsorción microbiana son la materia orgánica y las partículas de arcilla. Los suelos se dividen también según su textura en arenoso arcillosos (35% o más de arcilla y 45% o más de arena), limo arcillosos (40% de arcilla y 40% o más de limo), margosos o francos (contienen igual proporción de arena, limo y acilla), ideales para

agricultura. En general la textura del suelo influye en las comunidades de microorganismos porque de ella depende la aireación y la disponibilidad de agua (15).

### **Conclusiones**

En este trabajo se encontró que la mortalidad causada por Clostridiosis está relacionada con las variables bioclimáticas temperatura y precipitación. Además, los grupos etarios con mayor riesgo de adquirir Clostridiosis resultaron ser las poblaciones de novillas y de vacas horras. También se encontró que la mayoría de las fincas positivas a mortalidad por Clostridiosis presentaron suelos con problemas de manejo relacionados con las inundaciones y con la dificultad del movimiento del agua a través del suelo, pero el principal factor de riesgo se relaciona con el reporte de que en la finca los animales muertos sean de la especie bovina y la quema de los animales muertos como medida de disponer los cadáveres, situación que da pautas a las entidades de vigilancia para desarrollar programas de educación, prevención y control de ésta patología.

### **Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado por la División de Investigación de Bogotá (DIB) y por el programa de Becas para Estudiantes Sobresalientes del Posgrado de la Vice rectoría Académica de la Universidad Nacional de Colombia. Un especial agradecimiento a los productores de las diferentes fincas, quienes facilitaron la información base para la realización de este estudio.

### **Referencias**

1. Benavides E. (2003). Causas de muerte súbita en bovinos en pastoreo en las sabanas de América Tropical. Revisión. Enfermedades Infecciosas de los bovinos en general: Sitio argentino de producción Animal. URL disponible en [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_en\\_general](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general)
2. Benavides E. Causas de muerte súbita en bovinos en pastoreo en las sabanas de América Tropical. Rev Colomb Cienc Pecu, 2004; 17 (2): 182 – 192.
3. Otte J. El diseño de investigaciones epidemiológicas. Proyecto Colombo Alemán, Introducción de un sistema de asistencia técnica integral pecuaria, GTZ, ICA, UNISALLE.



Centro Internacional de Capacitación en Desarrollo Pecuario CICADEP. Santafé de Bogotá, Colombia, 1991.

4. De Blas I, Ortega C, Franjea K, Noordhuizen J, Trusfield M. WinEpiScope 2.0. Departamento de Patología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Zaragoza (España); Department of Animal Sciences of Wageningen Agricultural University (The Netherlands), 1998.

5. FEDEGAN, Federación Colombiana de Ganaderos. Base de Datos Predios. Ciclo de Vacunación Fiebre Aftosa. 2006 (Suministrado por Ismael Zúñiga).

6. Ortiz OD. 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 DC; 2000.

7. Thrusfield M. Veterinary Epidemiology. 3th ed. Great Britain: Blackwell Publishing; 2005.

8. Dean AG, Dean JA, Burton A, Dicker R. Epi Info, versión 5. Epidemiología con microordenadores. Ginebra, Suiza: WHO; 1992.

9. Flórez TJA, González EG, Hernández ZA, Herrera VJS, Londoño FJL, López HC, Mazuera ME, Mejía VW, Ramírez CH, Rojas LE, Torre Y, Vasco UA. Curso Modular de Epidemiología Básica. Universidad de Antioquia. Facultad Nacional de Salud Pública "Héctor Abad Gómez". Organización Panamericana de la Salud. 2da ed. Medellín Colombia: Editores Flórez TJA & Mazuera ME; 1994.

10. Martínez BR, Martínez RN. Diseño de Experimentos. Análisis de Datos Estándar y no Estándar. Fondo Nacional Universitario. Editorial Guadalupe Ltda. Bogotá Colombia; 1997: 479.

11. Martin SW, Meek AH, Willebreg P. Epidemiología Veterinaria. Principios y Métodos. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.; 1997.

12. Hijmans RJ, Guarino L, Bussink C, Mathur P, Cruz M, Barrantes I, Rojas E. DIVA-GIS. Versión 5.2. Sistema de Información Geográfica para el Análisis de Datos de Distribución de Especies, 2004.

13. Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Arvis A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Int J Climatol 2005; 25: 1965–1978.

14. Orjuela JE, Díaz MOL, González GPM, Ortiz CJ, Monroy GW E, Patiño AA. Informe Técnico. Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica Colombia, Sanidad Animal, 2008. Instituto Colombiano Agropecuario. Subgerencia de Protección y Regulación Pecuaria. Grupo de Epidemiología Veterinaria. Editorial Produmedios, 2009. ISSN: 1794-547X.
15. Escobar RMC. Microbiología del suelo. Universidad de Antioquia; 2009. Disponible en <http://vanguardia.udea.edu.co/cursos/salud%20y%20ambiente/CLASES%20TEORIA/>
16. Bagadi HO. The relationship between the annual rainfall and the outbreaks of blackwater in northern Nigeria. *Trop Anim Hlth Prod* 1978; 10:124-6.
17. Smith GR, Morison CJ. *Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London. *J Hyg* 1975; 75:371-9.
18. Smith GR, Milligan RA, Moryson CJ. *Clostridium botulinum* in aquatic environments in Great Britain and Ireland. *J Hyg* 1978; 80:431-6.
19. Yamakawa K, Nakamura S. Prevalence of *Clostridium botulinum* type E and coexistence of *C botulinum* nonproteolytic type B in the river soil of Japan. *Microbiol Immunol* 1992; 36:583-91.
20. Rico M. Microbiología general. Bogotá, Colombia: Fotocopiar impresores; 2004.
21. Mandigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los microorganismos. 8va ed. Madrid, España: Prentice Hall; 2000.
22. Gamboa MD, Rodríguez E, Fernández B. (). *Clostridium botulinum* en suelos de Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1993; 41 (3): 359-363.
23. Pulido HJ. Caracterización de los sistemas de producción de leche del trópico de altura de los departamentos de Boyacá y Cundinamarca. Informe Técnico. CORPOICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005.
24. Seidl A. Guía para la evaluación de suelos y valoración de sitios. Traducción de la guía original "Land Evaluation an site assesment", elaborada por el Servicio de Conservación de Recursos Naturales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Traducido por Engler A & Munoz, LN. Colorado State University. Ft T. Collins, Co, 1991.
25. CORPOICA, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Base de Datos de Suelos. Programa Nacional de Agroecosistemas. Subdirección de Sistemas de Producción; 2007.















## Anexo 7. Encuesta sobre mortalidad en bovinos

### ENCUESTA SOBRE MORTALIDAD EN BOVINOS UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA

*Proyecto: "Aislamiento y caracterización molecular de bacterias anaerobias asociadas al suelo en zonas ganaderas con problemas de mortalidad en bovinos"*

Esta encuesta tiene por objeto estudiar los brotes de Clostridiosis en bovinos los cuales ocasionan pérdidas económicas a los productores. Se pretende entender la problemática para brindar soluciones al productor.

Encuesta No. \_\_\_\_\_ Fecha 

Día	Mes	Año
_____	_____	_____

#### I. Identificación

1. Nombre de la finca \_\_\_\_\_

2. Municipio \_\_\_\_\_

3. Vereda \_\_\_\_\_

4. Tamaño de la finca \_\_\_\_\_

5. Coordenadas N \_\_\_\_\_ W \_\_\_\_\_ msnm \_\_\_\_\_

6. En bovinos se presentan enfermedades agudas que producen muertes repentinas, que afectan generalmente animales en muy buena condición corporal, ¿En ésta finca se han presentado casos de muertes de animales con éstas características?

Si

No

#### II. Datos de Mortalidad

7. En el último año ¿cuántos animales se han muerto? \_\_\_\_\_

¿Cuántos animales se han muerto? \_\_\_\_\_

8. ¿En qué época se mueren y tiene alguna relación con el cambio de clima?

Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic

9. Especifique:

10. ¿En su criterio cuáles son las especies más afectadas?

11. Evidencia de traumas o lesiones penetrantes en los animales afectados

Si

Localización \_\_\_\_\_

No

12. Historia reciente de actividades de manejo en los animales muertos\_\_\_ (Si o No)

CASTRACIÓN

DESCORNE

TOPIZA

OTROS \_\_\_\_\_

---

13. ¿Consumo de objetos o material extraños, pica o malacia?

Si  De que tipo \_\_\_\_\_

No

14. Signos clínicos en animales enfermos

Si

No

15. Descríbalos:

---

16. ¿Cómo dispone de los animales muertos?

Entierra \_\_\_\_\_

Vende \_\_\_\_\_

No hace nada, los zamuros se los comen \_\_\_\_\_

Quema \_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_

### III. Descripción de la finca

17. La Topografía de la finca es:

Plana

Ondulada

18. ¿La finca tiene áreas inundables? Área de inundación (%)

Si

No

### IV. Manejo de Praderas

19. ¿Ara o subsola los potreros? Cada cuanto (mes)

Si  ¿Cada cuánto? \_\_\_\_\_

No

20. ¿Posee riego la finca?

Si

No

21. Los pastos presentes en la finca son

_____	_____ (ha)
_____	_____ (ha)
_____	_____ (ha)

22. El sistema de Pastoreo es:

23. ¿Abona las praderas?

Si

No

24. Producto(s)

empleado(s) \_\_\_\_\_

#### V. Población Animal

25. La \_\_\_\_\_ raza \_\_\_\_\_ predominante  
es \_\_\_\_\_

26. Población de animales en la finca:

Terneros \_\_\_\_\_

Terneras \_\_\_\_\_

Novillas \_\_\_\_\_

Novillos \_\_\_\_\_

Vacas en Producción \_\_\_\_\_

Vacas horras \_\_\_\_\_

Toros \_\_\_\_\_

Total bovinos \_\_\_\_\_

Total ovinos \_\_\_\_\_

Total Equinos \_\_\_\_\_

Total Caninos \_\_\_\_\_

Total Porcinos \_\_\_\_\_

Total Aves \_\_\_\_\_

Otros \_\_\_\_\_

#### VI. Manejo Animal

27. Los animales de reemplazo se levantan y se crían en la finca

Si

No

28. Suministra sales mineralizadas

Si

No

29. Frecuencia

\_\_\_\_\_

30.

Marca \_\_\_\_\_

31. Bultos al mes \_\_\_\_\_

32. Otros Suplementos \_\_\_\_\_

#### VII. Plantas Tóxicas

33. ¿Hay plantas tóxicas?

Si

No

34. ¿Cuáles existen en la finca?

35. ¿Asocia la presencia de plantas tóxicas con el problema de mortalidad?

Si

No

#### VIII. Pesticidas

--

36. ¿En la finca se utilizan pesticidas?

Si

No

37. ¿Asocia el uso de pesticidas con el problema de mortalidad?

Si

No

IX. Manejo Sanitario

38. Vacunas

Aftosa	___
Carbón o Rayo	___
Brucelosis	___
Rabia	___
Botulismo	___
Otras	___

Cuales \_\_\_\_\_

39. Compra de animales \_\_\_\_\_ Procedencia \_\_\_\_\_

40. Venta de animales \_\_\_\_\_  
Causa \_\_\_\_\_

X. Observaciones


Responsable \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_