

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE CLOSTRIDIOS PATÓGENOS
PRESENTES EN MUESTRAS DE SUELOS DE PREDIOS GANADEROS AFECTADOS
POR LA OLA INVERNAL EN EL MUNICIPIO DE MOSQUERA – DEPARTAMENTO DE
CUNDINAMARCA**



JUAN SEBASTIAN FONSECA TORRES

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar al título de

Microbiólogo Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C. 2011**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE CLOSTRIDIOS PATÓGENOS
 PRESENTES EN MUESTRAS DE SUELOS DE PREDIOS GANADEROS AFECTADOS
 POR LA OLA INVERNAL EN EL MUNICIPIO DE MOSQUERA – DEPARTAMENTO DE
 CUNDINAMARCA**



JUAN SEBASTIAN FONSECA TORRES

APROBADO

Dr. Diego Ortiz MSc. PhD (C).
Director

Dr. Rodrigo Martínez MSc. PhD.
Codirector

Ivonne Gutiérrez
Jurado

Ingrid Schuler PhD.
Decana Académica

Janeth Arias MSc, M.Ed.
Directora de Carrera

*A Dios por la gran oportunidad
que me entrego al permitirme
desarrollar este gran proyecto*

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Diego Ortiz, Medico Veterinario Ph.D (C). Investigador del Laboratorio de Bacterias Anaerobias de CORPOICA, por todo su apoyo, colaboración, confianza, enseñanza en el desarrollo de este y otros trabajos y por su contribución en mi formación profesional; además por darme la oportunidad de hacer parte de su excelente grupo de investigación durante este periodo.

Al Doctor Rodrigo Martínez, Zootecnista PhD. Investigador del Laboratorio de Genética Animal de CORPOICA, por toda su colaboración, enseñanza, contribución en mi formación profesional.

A los investigadores del Laboratorio de Bacterias Anaerobias por todo el apoyo, amabilidad y aportes a este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
2.1. Justificación	14
2.2. Planteamiento del problema	15
3. MARCO TEÓRICO	15
3.1. <i>Clostridium</i> spp... ..	15
3.2. Clasificación de clostridios según la acción de las toxinas	16
3.2.1. Clostridios Enterotoxicos.....	16
3.2.2. Clostridios Histotoxicos	16
3.2.3. Clostridios Neurotóxicos.....	17
3.2.4. Clostridios Nosocomiales u otros	17
3.3. Cambio Climático	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo General.. ..	19
4.2. Objetivos Específicos.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. Descripción del Área de Estudio	20
5.2. Tipo de Estudio y Tamaño de Muestra.....	21
5.3. Encuesta Epidemiológica.....	21
5.4. Toma de Muestras	21
5.5. Procesamiento de Muestras.....	21
5.6. Aislamiento y Purificación de Cepas	22
5.7. Caracterización Bioquímica.....	22
5.8. Concentración de clostridios	23
5.9. Análisis Estadístico	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1. Área de Estudio	23
6.2. Análisis microbiológico de muestras y caracterización de cepas	24

6.2.1. Aislamientos microbiológicos	24
6.2.2. Identificación de cepas.....	26
6.2.3. Concentración de clostridios	28
6.3. Análisis estadístico.....	28
6.3.1. Factores de riesgo.....	29
6.4. Georeferenciación.....	29
7. CONCLUSIONES.....	30
8. RECOMENDACIONES.....	31
9. LITERATURA CITADA.....	32
10. ANEXOS.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales patologías producidas por clostridios en ganado bovino.	18
Tabla 2. Promedios de altura (msnm), tamaño de los predios (Ha), áreas Destinadas a ganadería de producción y áreas Inundadas (Hectáreas).....	24
Tabla 3. Cepas de <i>Clostridium</i> spp. obtenidas de predios afectados por la ola invernal. .	27
Tabla 4. Relación de riesgo o protección de las variables cualitativas con la presencia de casos positivos y negativos de patogenicidad.....	28
Tabla 5. Relación de las variables cuantitativas con la presencia de casos positivos y negativos de patogenicidad.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de Clostridios patógenos según la acción de sus toxinas.	17
Figura 2. a) Promedio mundial de la temperatura en superficie. b) Promedio mundial del nivel del mar. c) Promedio de la cubierta de nieve del hemisferio norte.	19
Figura 3. Bovino macho de la raza normando pastoreando en zonas altas de finca inundada. Municipio de Mosquera Cundinamarca 2011.....	20
Figura 4. A) Frecuencia de cultivos realizados en la zona analizada. B) Frecuencias de altitud de los predios muestreados.....	24
Figura 5. a) Crecimiento de microorganismos en caldo TTC evidenciando por turbidez en el medio y producción de H ₂ S. b) Crecimiento de bacterias hemolíticas en Agar Sangre al 5%. c) Vista al microscopio de bacilos largos con esporas subterminales.	25
Figura 6. Especies de <i>Clostridium</i> spp. aisladas e identificadas con sus correspondientes porcentajes de aparición.....	27
Figura 7. Cepas de <i>Clostridium</i> spp. aisladas en el municipio de Mosquera, departamento de Cundinamarca, con sus correspondientes georeferenciaciones.....	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de las muestras de suelo analizadas, correspondientes a las características de los aislamientos en agar sangre, y coloración de Gram y verde de malaquita.	35
Anexo 2. Frecuencia y proporción de las especies patógenas y no patógenas caracterizadas bioquímicamente mediante el Kit comercial API-20A®.	36
Anexo 3. Cepas de <i>Clostridium</i> spp., aisladas en los predios afectados por la ola invernal.	37
Anexo 4. Unidades Formadoras de Colonia por gramo de muestra de suelo analizado de predios afectados por la ola invernal.....	38
Anexo 5. Análisis de correlación estadística entre casos positivos y negativos con la altura (msnm).....	39
Anexo 6. Variables cuantitativas y cualitativas utilizadas para el análisis epidemiológico con <i>Epiinfo</i> ®.	40
Anexo 7. Cepas de <i>Clostridium</i> spp., aisladas en cada una de las muestras analizadas, con sus correspondientes coordenadas decimales y geográficas.	41
Anexo 8. Mapa de Mosquera con georeferenciación de los puntos muestreados y la identificación del microorganismo aislado para esa zona.....	42
Anexo 9. Encuesta epidemiológica utilizada en el estudio.	43

RESUMEN

La “Ola Invernal” vivida a finales del año 2010 en Colombia provocó el desbordamiento del Río Bogotá, Río Magdalena y Río Cauca inundando cerca de un millón (1.000.000) hectáreas. En el municipio de Mosquera, departamento de Cundinamarca fueron afectadas zonas destinadas la ganadería. Los suelos inundados se convirtieron en un medio óptimo para el crecimiento de bacterias anaerobias esporuladas pertenecientes al género *Clostridium* spp., las cuales actualmente son de interés para el desarrollo de investigaciones debido al impacto sanitario que causan estos microorganismos en la salud animal al producir diferentes tipos de clostridiosis. Siendo así un riesgo económico y social para la industria del departamento y como tal del país. El presente estudio realizado por el Laboratorio de Bacterias Anaerobias de CORPOICA, permitió aislar e identificar bioquímicamente las bacterias anaerobias esporuladas patógenas presentes en suelos de predios afectados por la “Ola Invernal” en Mosquera - Cundinamarca, encontrando que las especies *C. botulinum* y *C. septicum*, fueron las más frecuentes (44% y 28% respectivamente), y que *C. beijerinckii*, *C. bifermentans* y *C. perfringens* se hallaban con menor frecuencia en la zona (20%, 4% y 4% respectivamente). El marco de muestreo del estudio fueron los predios inundados, la unidad de muestreo determinada fue cada predio. El tamaño de la muestra fue de 20 predios, los cuales se encuestaron y georeferenciaron. Se realizó la encuesta epidemiológica compuesta por 45 preguntas claves, las cuales permitieron identificar la altura como factor de riesgo para el crecimiento de estos microorganismos patógenos en el área afectada ($p= 0,0137$; IC=95%), de forma que puedan generarse algunas recomendaciones para mitigar el impacto que puede llegar a causar la clostridiosis en la producción ganadera de la zona.

Palabras clave: *Ola invernal, clostridiosis, estudio epidemiológico, toxinas.*

ABSTRACT

The "winter wave" lived at the end of 2010 in Colombia led to the flooding of the Rio Bogota, Rio Magdalena and Rio Cauca flooding about one million (1,000,000) hectares. In the municipality of Mosquera, Cundinamarca were affected areas used for livestock. Flooded soils became an optimum environmental for the growth of anaerobic spore-forming bacteria of the genus *Clostridium spp.*, which are currently of interest for the development of research because of the health impact caused by these microorganisms in animal health because it produces different types of clostridiosis. As such it has been becoming an economic and social risk for industry of the department and as such the country. This study was made by the Laboratory of Anaerobic Bacteria in CORPOICA and allowed biochemically isolate and identify pathogenic spore-forming anaerobic bacteria present in soils affected by the "winter wave" in Mosquera - Cundinamarca, finding that the species *C. botulinum* and *C.septicum* were the most frequent (44% and 28% respectively), and *C. beijerinckii*, *C. bifermentans* and *C. perfringens* were less frequent in the area (20%, 4% and 4% respectively). The sampling frame of the study were flooded farms, the sampling unit was determined each property. The sample size was 20 farms, which were surveyed and georeferenced. Epidemiological survey was made by 45 key questions, which helped to identify the high as a risk factor for the growth of these pathogens in the affected area ($p = 0.0137$, CI = 95%), so that helped to generate some recommendations to mitigate the impact that it can even cause clostridiosis in livestock production in the area.

Key words: *Winter wave, clostridiosis, epidemiological study, toxins.*

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* spp., se caracterizan por su forma bacilar y su capacidad de ser microorganismos espora-formadores al presentarse condiciones adversas en el medio. Por otro lado, los Clostridios son bacterias anaerobias estrictas las cuales responden positivamente a la tinción de Gram en etapas tempranas del crecimiento. La característica de anaerobiosis estricta para un microorganismo hace referencia según Hatheway (1990), a la capacidad de “sintetizar sustancias y crecer sin utilizar oxígeno molecular, presentando inhibición de crecimiento en atmósferas con aire (1).

Las bacterias anaerobias pertenecientes a este género son de gran importancia debido a las infecciones o intoxicaciones que pueden ocasionar tanto en los animales como en el ser humano (2), ya que se conocen que al menos 13 especies de *Clostridium* spp., son altamente patógenas, 30 medianamente patógenas y al menos otras 60 no son patógenas (3).

Para la industria ganadera, los clostridios se han convertido en un problema constante, al ser un grupo de bacterias ubicuas que según Ortiz (2008) “se relacionan clínica y epidemiológicamente con el suelo que es su hábitat natural”, lo cual llega a afectar los diferentes sistemas de producción, causando algún tipo de “clostridiosis” y como tal aumentos significativos en la tasa de morbilidad y mortalidad de los bovinos (4).

Los ecosistemas varían en gran parte según los cambios menores o mayores en el clima, lo cual genera un cambio que favorece la emergencia y reemergencia de numerosas enfermedades. Esta situación se está viviendo actualmente en Colombia y el mundo, donde el cambio climático ha conllevado a modificaciones en diferentes variables, entre las que cabe resaltar “el aumento de frecuencia e intensidad de eventos climáticos extremos” como temporadas de verano, de invierno, olas de calor, entre otras (5).

Estas características climáticas son de gran importancia, ya que se generan condiciones óptimas para el aumento en el crecimiento de las bacterias anaerobias en los suelos, los cuales sufren inundaciones en temporadas de lluvia extrema, de forma tal que las concentraciones de oxígeno disponible en el suelo se reducen, presentándose así un sistema anaerobio propicio para el aumento y activación de microorganismos de este tipo (6).

En Colombia, se presentaron inundaciones en el año 2010 debido a una larga temporada de lluvias intensas, denominada “Ola Invernal”, la cual afectó drásticamente al municipio de Mosquera, Cundinamarca. Inundando con aguas de lluvia y del Río Bogotá predios

destinados para pastoreo de bovinos, los cuales pueden contener una alta carga de microorganismos anaerobios, pudiendo causar al ganado de la zona diferentes tipos de clostridiosis (Enfermedades causadas por bacterias del genero *Clostridium* spp.) tales como carbón sintomático, enterotoxemias, muerte súbita, tétano, entre otras enfermedades (7).

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 JUSTIFICACIÓN

En Colombia la Ganadería es la actividad económica de mayor presencia en las zonas rurales aportando al PIB nacional el 3,6%, siendo una contribución representativa para el país, ubicándose por encima de sectores como electricidad, gas y agua, correos y comunicaciones, hotelería y restaurantes y el café. Sobre este gran aporte a la economía Colombiana, Cundinamarca es el octavo departamento más importante en producción ganadera, aportando un 5,6% del hato nacional según estudios realizados (8).

Es evidente que el cambio climático generado por la emisión de Gases de Efecto Invernadero (GEI) en el planeta es una realidad, al igual que el retraso en los preparativos para enfrentar los impactos generados. En Colombia los nevados pierden 1 metro de espesor al año y los mares suben en promedio 3.1 milímetros al año desde los últimos 10 años, valor que corresponde a más del doble de los aumentos registrados desde 1960. Según el IDEAM, hay evidencias de que el cambio climático y sus impactos serán mayores a más altura. Cabe resaltar que las lluvias se intensificarán lo que implica riesgos en las poblaciones vulnerables a desastres naturales por inundaciones o deslizamientos de tierra (9).

Debido a la ola invernal sufrida en Colombia a finales del año 2010, se inundaron varias zonas del país, incluyendo tierras ganaderas del municipio de Mosquera, departamento de Cundinamarca, afectadas por el desbordamiento del Río Bogotá. Este evento generó condiciones que causaron pérdidas en los sistemas de producción bovina (principalmente leche especializada). La presencia de factores de riesgo que contribuyen a la aparición de enfermedades causantes de brotes epidémicos de mortalidad en bovinos - muerte súbita o repentina- son una preocupación de la autoridades sanitarias (8).

La muerte súbita o repentina se caracteriza por su corto tiempo de duración, debido a que los rumiantes bovinos aparecen muertos o mueren después de un lapso corto de enfermedad, sin presentar ningún signo ni síntoma aparente. Las bacterias anaerobias

esporuladas (género *Clostridium* spp.) constituyen uno de los agentes bacterianos relacionados con este tipo de patologías, que pueden afectar también al ser humano (10). Estas bacterias se caracterizan por ser habitantes saprofitos de suelos, intestino de los animales y depósitos de aguas, razón por la cual pueden ser ingeridas por los bovinos y obtener condiciones de anaerobiosis favorables para que sus esporas latentes pasen a forma vegetativa, se multipliquen y provoquen una mayor incidencia de casos de muerte súbita (11).

Este anteproyecto se genera por la necesidad sentida de los ganaderos quienes requieren mitigar los efectos de las inundaciones. CORPOICA con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural genera un plan de acción para contrarrestar los efectos del invierno en estas zonas. El Laboratorio de Bacterias Anaerobias participa en este plan. Este anteproyecto constituye una parte de ese plan y pretende analizar muestras de suelos afectados por la ola invernal con el fin de determinar la presencia de Clostridios patógenos, aislándolos e identificándolos bioquímicamente. Los resultados permitirán construir mapas epidemiológicos de riesgo para la toma de decisiones encaminadas a prevenir y controlar los brotes epidémicos de mortalidad en las ganaderías (12). El proyecto entregará resultados que permitirán el desarrollo de un programa médico preventivo contra estas enfermedades, de forma que la industria ganadera pueda lograr un control sobre los terrenos afectados.

2.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la ola invernal en Colombia, en el municipio de Mosquera, departamento de Cundinamarca, la reducción de la oxigenación de suelos por efecto de la inundación ha provocado que bacterias del género *Clostridium* spp., latentes en el suelo en forma de esporas se multipliquen y generen toxinas las cuales ocasionan brotes epidémicos de mortalidad súbita y diferentes tipos de clostridiosis al ser consumidas por los animales. Para desarrollar programas de medicina preventiva se hace necesario identificar las bacterias patógenas de este género presentes en suelos inundados.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 *Clostridium* spp.

El género de *Clostridium* spp., está compuesto por aproximadamente 100 especies. Estos microorganismos varían con respecto a la tolerancia al oxígeno, ya que unas especies crecen en ambientes estrictamente anaerobios, mientras que otras son aerotolerantes (13). Este grupo de bacterias se caracteriza por estar compuesto por bacilos rectos o

curvos, que responden positivamente a la tinción de Gram, aunque algunos son Gram-variables. Todos los microorganismos pertenecientes a este género, exceptuando *Clostridium perfringens* presentan motilidad, al poseer un flagelo peritrico (14).

La gran mayoría de las especies son fermentadoras, catalasa y oxidasa negativas, son bacterias formadoras de esporas, las cuales pueden variar de posición y tamaño, características que en algunos casos sirven para la identificación (15). Estas esporas presentan gran resistencia, lo que permite que sobrevivan a condiciones adversas por largos periodos de tiempo en suelo, agua, plantas, tracto gastrointestinal de animales y de humanos, entre otros (16).

3.2 Clasificación de clostridios según la acción de las toxinas

Los Clostridios o bacterias pertenecientes al género *Clostridium* spp., son patógenos asociados al suelo ocupando un lugar importante en los sistemas de producción ganaderos; tales bacterias pueden causar morbilidad y mortalidad de animales, por las infecciones o por las toxinas que producen, las cuales afectan los animales en forma 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 (13).

Debido a que los Clostridios causan una variedad de patologías tanto al humano como a los animales, los diferentes estudios han permitido completar una clasificación de las especies de este género en cuatro grandes grupos, los cuales tres de ellos dependen de la actividad de la toxina y los sitios que estas afectan, y el último de ellos comprende las especies patógenas de menor importancia o poco estudiadas (Figura 1).

3.2.1 Clostridios enterotoxicos causantes de enfermedades que se relacionan principalmente en el sistema digestivo, generalmente asociadas con *Clostridium perfringens*, aunque *Clostridium septicum* algunas veces causa infección gástrica en ovejas y potros.

3.2.2 Clostridios histotóxicos que causan una serie de síndromes en animales domésticos, incluyendo gangrena gaseosa (carbones), pierna negra y edema maligno ya que generalmente las bacterias, que pueden ser habitantes normales de los tejidos (*Clostridium chauvoei*, *C. septicum*, *Clostridium novyi* y *Clostridium sordelli*), se multiplican al ocurrir algún trauma y producen toxinas en el tejido

traumatizado, las cuales crean una lesión local y son absorbidas al torrente sanguíneo causando toxemia.

3.2.3 Clostridios Neurotóxicos, los cuales afectan las funciones motoras al ingerirse las toxinas preformadas inhibiendo la función del neurotransmisor Acetilcolina, como ocurre en casos de botulismo, o ser el resultado del crecimiento de las bacterias en alguna parte del organismo, como es el caso del tétano.

3.2.4 Clostridios nosocomiales u otros con un potencial patógeno mas reducido, entre los que podemos encontrar a *Clostridium difficile*, relacionado con brotes de gastroenteritis (10).

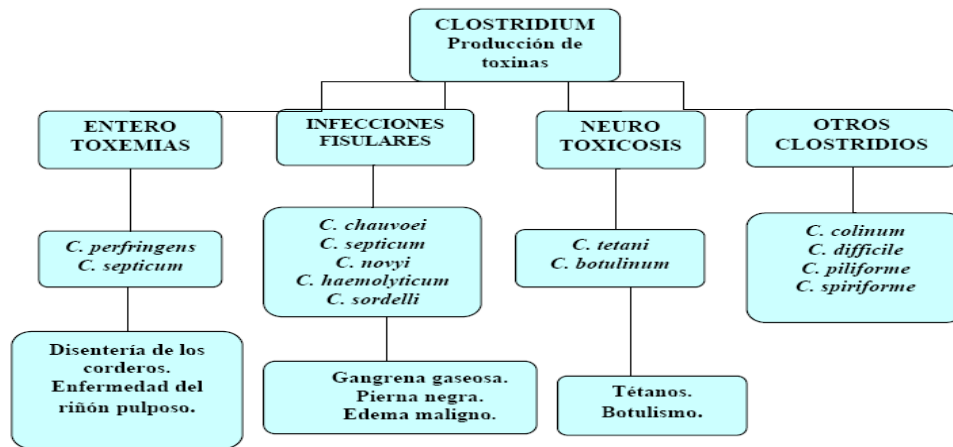


Figura 1. Clasificación de clostridios patógenos según la acción de sus toxinas.

La muerte súbita de bovinos se conoce como la condición patológica de los animales, en la cual el animal aparece muerto o muere luego de un periodo muy corto de enfermedad sin presentar mayores alteraciones visibles en su comportamiento o estado general (17). En algunos casos este fenómeno está relacionado con la presencia de plantas tóxicas, sin embargo diversos agentes etiológicos pueden ser la causa de este problema. De los agentes etiológicos encontrados, los Clostridios están relacionados con un número importante de enfermedades que pueden provocar la muerte repentina de los animales, influyendo en gran parte en los sistemas de producción ganaderos ya que pueden causar alta morbilidad y mortalidad en los animales ya sea por infecciones o toxiinfecciones que producen (18). Las patologías más importantes en la especie bovina se pueden resumir en botulismo, tétano, carbón sintomático (Pierna negra), enterotoxemias (Tabla 1).

Tabla 1. Principales patologías producidas por clostridios en ganado bovino.

ENFERMEDAD	MICROORGANISMO RELACIONADO	DESCRIPCION
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>	Se produce por ingesta de la toxina liberada por el microorganismo, la cual produce una intoxicación a bovinos en gestación o lactantes (17).
Tétano	<i>Clostridium tetani</i>	Toxina producida por el microorganismo ataca el sistema nervioso del animal, causando rigidez de las extremidades y aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria (17).
Carbón Sintomático	<i>Clostridium chauvoei</i> <i>Clostridium fesiari</i>	Enfermedad infecto contagiosa. Produce un absceso muscular, lo cual causa una cojera intensa antes de la muerte del animal acompañada de fiebre y anorexia (18).
Enterotoxemia	<i>Clostridium perfringens</i>	Enfermedad entérica y septicemia que causa depresión, problemas nerviosos, postración y muerte (18).

3.3 Cambio Climático

Las actividades que el ser humano está desarrollando en la actualidad tales como la utilización de combustibles fósiles, el cambio del uso de la tierra y la agricultura, han ido aumentando la concentración atmosférica de gases de efecto invernadero (CO₂, metano, oxido nitroso) provocando el recalentamiento de la atmósfera y de la superficie terrestre (19). Hecho tal ha sido evidente en los últimos años, los cuales han sido los más calientes desde 1850 según los registros de temperatura global, llevando a un acelerado proceso de derretimiento de los polos y aumento nivel promedio de los océanos (Figura 2) (19).

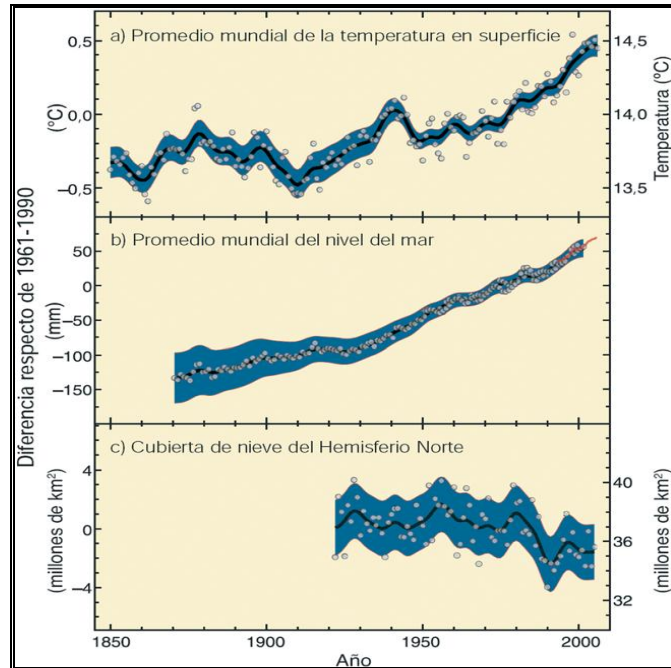


Figura 2. a) Promedio mundial de la temperatura en superficie. b) Promedio mundial del nivel del mar. c) Promedio de la cubierta de nieve del hemisferio norte. Fuente: Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. Cambio climático 2007: Informe de Síntesis. Disponible en <http://www.ipcc.ch>

Las sequías provocadas por la ola de calor, inundaciones por fuertes temporadas de lluvias serán mas frecuentes e intensas con el cambio climático, propiciando condiciones favorables para que ciertas enfermedades infecciosas emerjan en un nuevo lugar, o reemerjan en un sitio que ya habían sido erradicadas, aumentando el riesgo de tener brotes epidémicos difíciles de controlar si no se tienen planes de prevención (5).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la presencia de especies patógenas del género *Clostridium* spp. en suelos de fincas inundadas por la ola invernal en el Municipio de Mosquera departamento de Cundinamarca relacionadas con brotes epidémicos de mortalidad súbita en bovinos, de forma que sea posible recomendar estrategias de prevención y control de estos microorganismos.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Aislar e identificar bioquímicamente las especies de *Clostridium* spp. patógenas presentes en cada muestra de suelo.

4.2.2 Realizar un estudio epidemiológico transversal que permita hipotetizar factores de riesgo asociados a la muerte súbita de bovinos en suelos inundados de forma que se pueda minimizar su impacto.

4.2.3 Obtener información útil para la formación de un plan integral que permita al sector productivo responder a los fenómenos causados por la ola invernal.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Descripción del Área de Estudio

El centro del país, como se predijo hace un año, es una de las zonas más afectadas por la crudeza de la segunda temporada invernal del fenómeno de La Niña. En Cundinamarca 53 municipios están inundados, dejando como saldo más de 900 familias damnificadas. Mosquera, Soacha, Cota, Tocaima, Apulo, Girardot, Puerto Salgar, Cogua y Nemocón han sido los municipios más afectados en los últimos meses.

La situación recrudeció en Mosquera, donde las lluvias fueron de gran intensidad. En este municipio las crecientes de los ríos Bogotá, Subachoque y Bojacá han dejado pérdidas por más de 80 mil millones de pesos y más de 3.000 hectáreas de tierra productivas bajo el lodo. Situación por la cual es de gran prioridad para las entidades de investigación desarrollar proyectos que permitan auxiliar las zonas afectadas para recuperar la zona.



Figura 3. Bovino macho de la raza normando pastoreando en zonas altas de finca inundada. Municipio de Mosquera Cundinamarca 2011

El proyecto se desarrolló en el municipio de Mosquera, departamento de Cundinamarca, el cual se encuentra a una altura de 2516 msnm, con una clima entre 12 y 14°C, una extensión total de 107 km² y una precipitación promedio de 640 mm anual.

5.2 Tipo de Estudio y Tamaño de Muestra

Se realizó un estudio epidemiológico transversal que permitió determinar la prevalencia e hipotétizar factores de riesgo asociados a las muertes de bovinos ocasionadas por clostridios. El marco de muestreo se determinó a partir de los predios afectados, la unidad de muestreo fue el predio. La prevalencia utilizada para calcular el tamaño de la muestra fue del 4% reportada para mortalidad súbita (Clostridiosis) en el departamento de Arauca, Ortiz (2000), con un error aceptado del 5%; y un nivel de confianza del 95%, obteniendo así una muestra de 20 predios que fueron analizados (20).

El muestreo de suelos se desarrolló de forma probabilística aleatoria simple.

5.3 Encuesta Epidemiológica

Se realizó una encuesta epidemiológica con la identificación, georeferenciación del predio y una serie de preguntas incluida una pregunta clave. Adicionalmente se indagó sobre aspectos de mortalidad, descripción del sistema ganadero, manejo de praderas y observaciones generales. Con la información obtenida, se estructuró una base de datos, la cual se analizó utilizando el programa *Epiinfo 6.1*®.

5.4 Toma de muestras

Las muestras de suelo se obtuvieron de 20 fincas ganaderas seleccionadas al azar, que fueron afectadas por inundaciones. Se tomaron 20 submuestras cada 15 metros por terreno, recorriéndolo en forma de zig-zag, las cuales se mezclaron y homogenizaron. Finalmente se tomó una muestra de esta mezcla de aproximadamente 1 kg. Se empacó y rotulo con el nombre del predio y su correspondiente georeferenciación, posteriormente se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente.

5.5 Procesamiento de muestras

Se tomaron 15 g de las muestras de suelo y se colocaron en cajas de petri. Se deshidrataron a 37° C hasta que estuvieran completamente secas y pudieran ser homogenizadas y maceradas en un mortero. Se procedió a tamizar una a una en un tamiz de 5mm, del tamizado se tomó 1 gramo y se colocó en una solución de etanol al

50% por 30 minutos a 37°C. Después de este tiempo se suspendió el gramo de suelo en 9 mL de Solución Salina al 0,7%, se calentó en baño maría a 80°C por 10 minutos e inmediatamente se realizó un choque térmico sumergiendo la suspensión en agua con hielo por 5 minutos. Terminado este procedimiento se agitó en vortéx la muestra y en cabina de flujo laminar se tomaron 0,1 mL para sembrarlos por duplicado en caldo tioglicolato con trozos de carne (TTC). Las siembras se incubaron en cámaras de anaerobiosis con catalizador Anaerogen® por 48 horas a 37°C, donde posteriormente se tomó 1 mL del tubo con más turbidez y se inoculó por duplicado en caldo infusión cerebro corazón (BHI) el cual se incubó nuevamente por 48 horas a 37°C en condiciones anoxigénicas.

5.6 Aislamiento y Purificación de Cepas

Se tomó 0,1 mL de cada muestra en BHI y se realizó una siembra masiva en superficie en agar sangre al 5% por duplicado, se incubaron por 72 horas a 37°C en anaerobiosis. Cumplido el tiempo se evaluó la hemólisis producida en el medio y se realizaron coloraciones de Gram y verde de malaquita, para identificar el crecimiento de bacilos Gram positivos esporulados que se caracterizaron por ser colonias beta hemolíticas en el medio. Se seleccionaron la siembras con mejores características (bacilos esporulados Gram positivos homogéneos y colonias beta hemolíticas) y se repicaron nuevamente por duplicado en Agar Sangre al 5% mediante la técnica de aislamiento por estría, se incubaron las cajas en cámaras de anaerobiosis con Anaerogen® como catalizador por 72 horas a 37°C.

Finalizado el tiempo de incubación se realizó nuevamente una evaluación de las colonias Beta hemolíticas y de bacilos Gram positivos esporulados, además se revisó la pureza de la colonia; al observarse características similares en la coloración.

En caso de no observar características similares y homogéneas que permitiera determinar que la colonia está pura, se realizó nuevamente una siembra mediante la técnica de aislamiento por estría en Agar Sangre al 5%, para lograr la purificación de la cepa.

5.7 Caracterización Bioquímica

Se realizó la identificación bioquímica mediante el uso de Kits comerciales de tipificación microbiológica (*API 20A*®), realizando una suspensión concentrada en medio líquido correspondiente al patrón de McFarland 3® (9×10^8 mo/mL).

5.8 Concentración de clostridios en las muestras

En solución salina estéril se disolvieron 10 gramos de muestra de suelo, posteriormente se realizaron 4 diluciones seriadas en base diez, agregando 1 mL de la dilución anterior en 9 mL de solución salina estéril. De cada dilución se sembraron 0,1 mL en superficie en agar reinforced *Clostridium* media® por duplicado. Se homogenizó y posteriormente se incubó por 48 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis agregando el catalizador comercial Anaerogen® a las cámaras de anaerobiosis. A las 48 horas se realizó el conteo de las cajas que tuvieron crecimiento y pudieran ser contadas. Se informó la concentración obtenida en cada una de las muestras de los suelos analizados en UFC/g de muestra analizada (Unidades formadoras de colonia por gramo).

5.9 Análisis Estadístico

La información se analizó utilizando estadística descriptiva para las variables cualitativas y cuantitativas. Con los resultados obtenidos se realizaron las tablas y gráficos. Posteriormente se continuaron los análisis utilizando estadística analítica; para las variables cualitativas se utilizaron pruebas de Chi cuadrado y RP (Razón de Prevalencia). Para las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Barlett (homogeneidad de las varianzas) y con los resultados de esta prueba se determinó el uso de ANOVA (estadística paramétrica) y la prueba de Kruskal-wallis (estadística no paramétrica).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Área de estudio

Según los datos obtenidos por el Sistema de Posicionamiento Global (GPS) en los lugares de muestreo, se encontró que la altura a nivel del mar (msnm) promedio para el estudio fue de 2563,3 msnm. El tamaño promedio de los predios analizados fue de 59,1 hectáreas, de las cuales en promedio 36,3 hectáreas eran destinadas a la ganadería de producción especializada (leche). En algunos predios se destinan áreas para cultivos, encontrando 12,8 hectáreas en promedio para esta función, con mayor frecuencia para construcción de invernaderos o siembras de alverja (Figura 4). En promedio 32 hectáreas por predio fueron afectadas por la ola invernal al sufrir inundaciones (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios de altura (msnm), tamaño de los predios (Ha), áreas Destinadas a ganadería de producción y áreas Inundadas (Hectáreas).

Análisis	Media	Limite Inferior 95%	Limite Superior 95%	E.E
Altura	2563,32 msnm	2540 msnm	2600 msnm	4,2483
Predio (Ha)	59,08 Hectáreas	5,0 Hectáreas	192,0 Hectáreas	15,1890
Área Ganadera (Ha)	36,32 Hectáreas	2,0 Hectáreas	96,0 Hectáreas	7,7193
Área inundada (Ha)	32,0 Hectáreas	0,0 Hectáreas	96,0 Hectáreas	8,3010

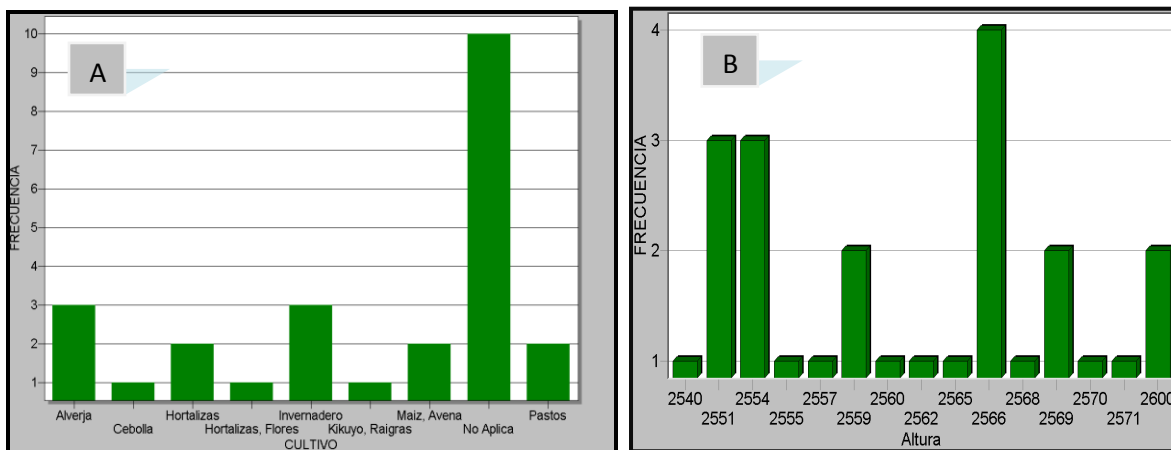


Figura 4. A) Frecuencia de cultivos realizados en la zona analizada. B) Frecuencias de altitud (msnm) de los predios muestreados.

6.2 Análisis microbiológico de muestras y caracterización de cepas.

Un total de 25 muestras de suelos fueron analizadas, correspondientes a 20 predios afectados por la ola invernal en el municipio de Mosquera, departamento de Cundinamarca, estas fueron referenciadas como OI (ola invernal) y numeradas del 1 al 20. Para los predios a los cuales se les realizó análisis a más de una muestra se les adicionó una letra a la identificación (ej. OI-1A).

6.2.1 Aislamientos Microbiológicos

Las siembras realizadas en Agar sangre al 5% a partir caldo TTC (Figura 5a, b) inoculado previamente tuvieron crecimiento positivo de microorganismos después de 72 horas de incubación bajo condiciones anoxigénicas, al ser repicadas nuevamente mediante

aislamiento por agotamiento, se evidenciaron crecimientos de bacilos Gram positivos, formadores de esporas con posiciones que oscilaban entre subterminales y libres en pocos casos (Grafica 5c) (Anexo 1). De gran importancia para la caracterización de las bacterias fue evidenciar macroscópicamente el efecto “swarming” en las colonias, lo que se denomina “cabezas de medusa” característica similar a filamentos, la cual permite al microorganismo tener la capacidad de desplazarse y colonizar un tejido o el medio donde se encuentre (Anexo 1) (21); este fenómeno se ha relacionado con la liberación hemolisinas o enzimas proteolíticas entendidas como factores de virulencia de microorganismos patógenos estudiados como *Proteus*, pero para *Clostridium spp.* se conoce que no es característica de todas las especies, aunque son pocos los estudios realizados al respecto. En 18 de las 25 siembras realizadas el crecimiento de colonias β -hemolíticas (Figura 5b) y las 7 restantes colonias α -hemolíticas (Anexo 1), características que según Smith *et al.*; (1968), ha sido fuertemente relacionada con microorganismos patógenos los cuales lisan completa o parcialmente los eritrocitos al liberar exotoxinas lo cual es visible debido a la transparencia o color verde en el medio (22,23).

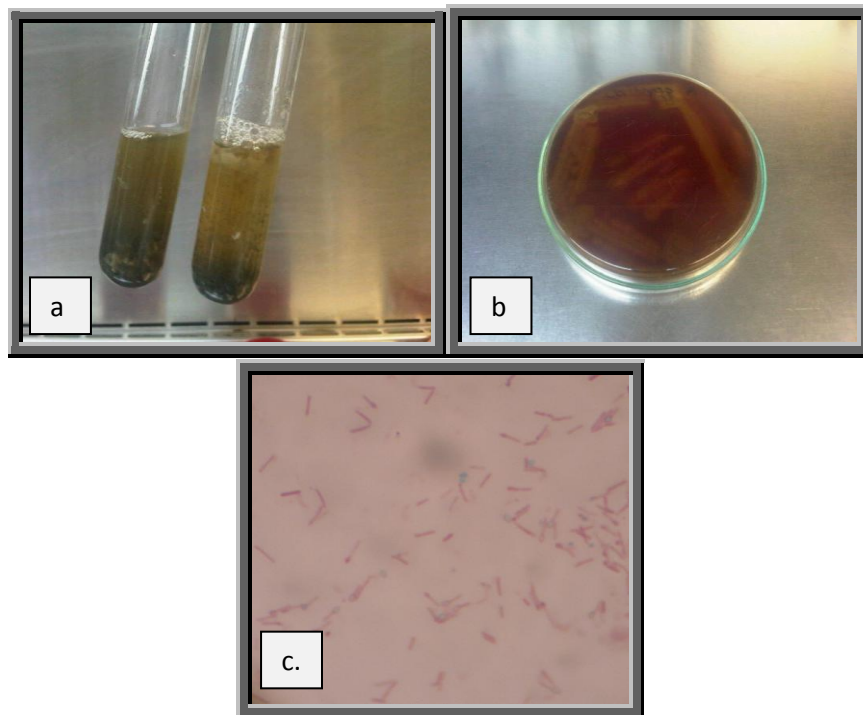


Figura 5. a) Crecimiento de microorganismos en caldo TTC evidenciando por turbidez en el medio y producción de H₂S. b) Crecimiento de bacterias hemolíticas en Agar Sangre al 5%. c) Vista al microscopio de bacilos largos con esporas subterminales.

6.2.2 Identificación de Cepas

De las 25 muestras analizadas en el laboratorio, se aislaron e identificaron 5 especies del género *Clostridium* spp como se muestra en la Tabla 3 y el Grafico 4 (Anexo 2). En seis muestras (24%), se identificaron especies no patógenas, en el Carretonal B(OI-5B) se aisló la única cepa de *C. bifermentans* (4%), mientras que en los Acales C (OI-4C), el Carretonal A (OI-5A), el Carretonal C (OI-5C), Santa Ana (OI-15) y el Campin (OI-16) se aislaron cepas (20%) caracterizadas como *C. beijerinckii* (Figura 6). Es importante resaltar que en la finca el Carretonal no se identificó ninguna especie patógena de *Clostridium* spp., sin embargo estas especies identificadas como no patógenas son de interés, ya que según Garry *et al.* (2006) los clostridios son unas de las pocas bacterias que tienen la capacidad de tener variabilidades genéticas que les permite a microorganismos no patógenos de una misma especie producir diversas toxinas que sirven como método de competencia o supervivencia en hábitats a los que comúnmente no pertenecen, esto debido a que los genes que codifican para estos factores posiblemente son transportados de una bacteria a otra introduciéndose en el plásmido del microorganismo (24, 25).

En 19 muestras se identificaron clostridios patógenos, teniendo una mayor prevalencia de aparición de *C. botulinum* aislado de 11 muestras (44%), seguido de *C. septicum* en 7 análisis (28%) y finalmente *C. perfringens* aislado únicamente en una muestra tomada en la finca Santa Lucy (OI-14; 4%) (Anexo 3). Es importante realizar análisis de genética molecular de las cepas aisladas de *C. septicum*, ya que ha sido reportada gran similitud morfológica y metabólica con *C. chauvoei* lo que impide realizar una diferenciación mediante pruebas bioquímicas, metodología que sigue el Kit comercial API 20A® utilizado en el análisis. Según Kuhnert *et al.*, (1996) estos dos microorganismos presentan similitudes filogenéticas de un 99,3%, por lo cual pueden ser confundidos muy fácilmente (26). *C. septicum* es el causante de la enfermedad llamada edema maligno o de gangrena gaseosa, mientras que *C. chauvoei* es el agente etiológico de la enfermedad llamada pierna negra que se presenta en el ganado, la cual según Mudenda *et al.* (2000) en verano, después de épocas de lluvias con inundaciones en Zambia, se ven aumentos de los números de casos de muerte del ganado asociado a pierna negra, siendo así un microorganismo potencialmente patógeno que puede acarrear grandes pérdidas económicas en el sector ganadero de producción (27).

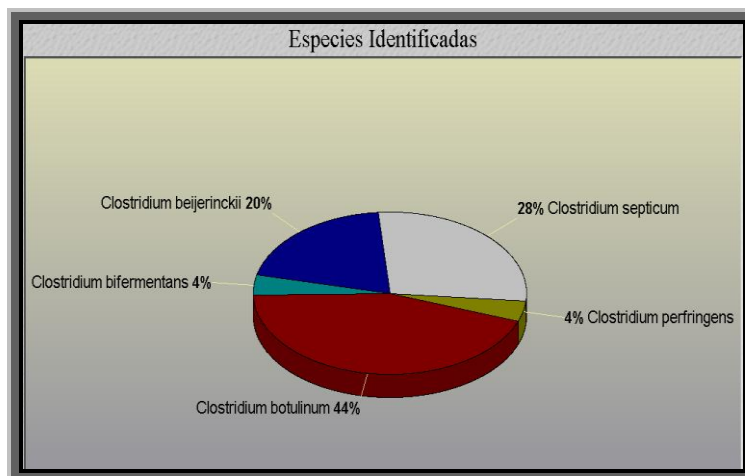


Figura 6. Especies de *Clostridium* spp. aisladas e identificadas con sus correspondientes porcentajes de aparición.

En la fase de aislamiento se identificó a *C. botulinum* como el microorganismo con mayor prevalencia (44%); se han reportado resultados de prevalencias en suelos no vírgenes (han presentado algún cambio hecho por el hombre) en Estados Unidos (24.3%), Argentina (23.5%) y en Japón (16.5%), resultados inferiores a los encontrados en este trabajo (28). El aislamiento de este microorganismo indica que dicha bacteria puede causar en la zona brotes epidémicos en el ganado y el humano que se destacan por ocasionar una intoxicación en los bovinos con las toxinas botulínicas, las cuales están compuestas por un complejo de proteínas con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. Las toxinas atacan al SNC al unirse con gran especificidad al complejo de proteínas SNARE el cual es el complejo de proteínas de recepción para el neurotransmisor acetilcolina, impidiendo así la fusión de las vesículas celulares y como tal la unión con la superficie de la membrana celular. Esto resulta en la parálisis motora del animal en caso de ocurrir en los músculos, o el bloqueo de las secreciones glandulares cuando ocurre en las glándulas exocrinas (29).

Tabla 3. Cepas de *Clostridium* spp. obtenidas de predios afectados por la ola invernal.

Microorganismo	Patogenicidad	Muestra Analizada
<i>C. botulinum</i>	Si	OI-1, OI-2A, OI-2B, OI-3, OI-4A, OI-8, OI-9, OI-10, OI-11, OI-18, OI-20
<i>C. septicum</i>	Si	OI-4B, OI-6, OI-7, OI-12, OI-13, OI-17, OI-19
<i>C. perfringens</i>	Si	OI-14
<i>C. beijerinckii</i>	No	OI-4C, OI-5A, OI-5C, OI-15, OI-16
<i>C. bifermentans</i>	No	OI-5B

6.2.3. Concentración de Clostridios

Se realizó un conteo total de clostridios en cada uno de los predios de forma que fuera posible observar el comportamiento de las concentraciones de estas bacterias anaerobias y además tener información de interés para futuros estudios o controles.

En los predios afectados por la ola invernal se obtuvieron conteos promedio de colonias de $3,0 \times 10^4$ UFC/g de muestra analizada, concentración consistente con la reportada por Smith la cual variaba de $2,7 \times 10^2$ a $3,3 \times 10^6$ UFC/g (Anexo 4). Sin embargo al comparar fincas positivas y negativas a *Clostridium* spp. patógenos no se evidenciaron diferencias significativas entre ellas, por lo cual podemos inferir que en este estudio las concentraciones de clostridios en los suelos no influyen en la presencia o no de especies patógenas del genero *Clostridium* spp.

6.3. Análisis Estadístico.

Para realizar el análisis estadístico se categorizaron las fincas teniendo en cuenta los aislamientos microbiológicos. Los clostridios patógenos categorizaron como positivas las fincas. Los clostridios no patógenos categorizaron las fincas como negativas. Esta categorización se utilizó como patrón de análisis para construir las tablas de 2 x 2. Al realizar el análisis estadístico de las variables cualitativas con las pruebas de Chi cuadrado y RP (Razón de Prevalencia) no se encontraron factores asociados. Para las variables cuantitativas con la prueba de Barlett (homogeneidad de las varianzas), Anova (distribución normal) y Kruskal-wallis (varianzas no homogéneas), no se detectaron factores de protección para la presencia de fincas positivas o negativas a *Clostridium* spp. Patógenos en este estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Relación de riesgo o protección de las variables cualitativas con la presencia de casos positivos y negativos de patogenicidad

Variable	RR (RP)	Fisher	Limite Inferior (IC 95%)	Limite Superior (IC 95%)
Topografía del predio	0,3000	0,1978	0,0409	2,1999
Raza de Ganado Muerto	0,8000	0,6566	0,1184	5,4045
Traslado de ganado	0,3000	0,1978	0,0409	2,1999
Presencia de humedales	0,9524	0,6935	0,1480	6,1293
Persistencia de la inundación	1,8462	0,3633	0,4098	8,3168
Casos de muerte súbita en los últimos 4 meses	0,2167	0,0969	0,0294	1,5987

Las variables analizadas se presentan en el anexo 6.

6.3.1 Factores de Riesgo

Según los resultados obtenidos la altura (msnm) demostró ser un factor de riesgo, ya que se evidenciaron diferencias significativas entre fincas positivas a *Clostridium* spp. patógenos y fincas negativas, de forma que a menor altura favorece la presencia de casos positivos, mientras que a mayor altura se presentan menos casos positivos, teniendo un promedio de altura para casos positivos de 2569,58 msnm y un promedio de altura para casos negativos de 2623,33 msnm como se observa en la Tabla 5 (Anexo 5). Los casos positivos se definieron como aislamientos de especies patógenas de *Clostridium* spp., mientras que casos negativos son los aislamientos de especies no patógenas. Las condiciones a mayor altura son mas desfavorables para el crecimiento de microorganismos, ya que a mayor altura la temperatura del aire disminuye, haciendo también que las aguas sean mas frías que a mas bajas alturas además en aguas mas bajas puede haber un mayor contenido de materia orgánica debido a que la inclinación de los suelos causa que el agua arrastre los nutrientes y la materia orgánica hasta depurarse en suelo mas bajos aumentando las concentraciones en esas zonas (30).

Tabla 5. Relación de las variables cuantitativas con la presencia de casos positivos y negativos de patogenicidad.

VARIABLES	No Patógenos (media)	Patógenos (media)	Bartlett's	ANOVA	Kruskal- wallis
Altura	2623,33 msnm	2569,58 msnm	0,8926	0,0137	-
Concentración	25983,3 UFC/g	31022,1 UFC/g	0,6008	0,8716	-
Tamaño del predio	74,7 (ha)	54,1 (ha)	0,3204	0,3720	-
Hectáreas destinadas a ganadería	44,7 (ha)	33,6 (ha)	0,6353	0,3451	-
Hectáreas Afectadas por la inundación	44,2 (ha)	28,1 (ha)	0,4586	0,1974	-
Hectáreas con cultivos	30,5 (ha)	7,3 (ha)	0,0000	0,1400	0,0977
Hectáreas aun inundadas	3,0 (ha)	10,9 (ha)	0,0329	-	0,3027

6.4. Georeferenciación

Al ser tomadas las muestras de suelo en cada uno de los predios, simultáneamente fueron tomadas las coordenadas del sitio muestreado (Anexo 7), de esta forma pudieron ser georeferenciadas las cepas de *Clostridium* spp. aisladas en el laboratorio.

La identificación realizada para cada predio fue ingresada a la base de datos del software Diva-Gis®, ubicándolas en el mapa del municipio de Mosquera, del departamento de Mosquera y del país Colombia (Figura 7) (Anexo 8). Esto para aportar información para la georeferenciación de los clostridios en Colombia, y ver las localizaciones geográficas de estos microorganismos en las zonas del país.

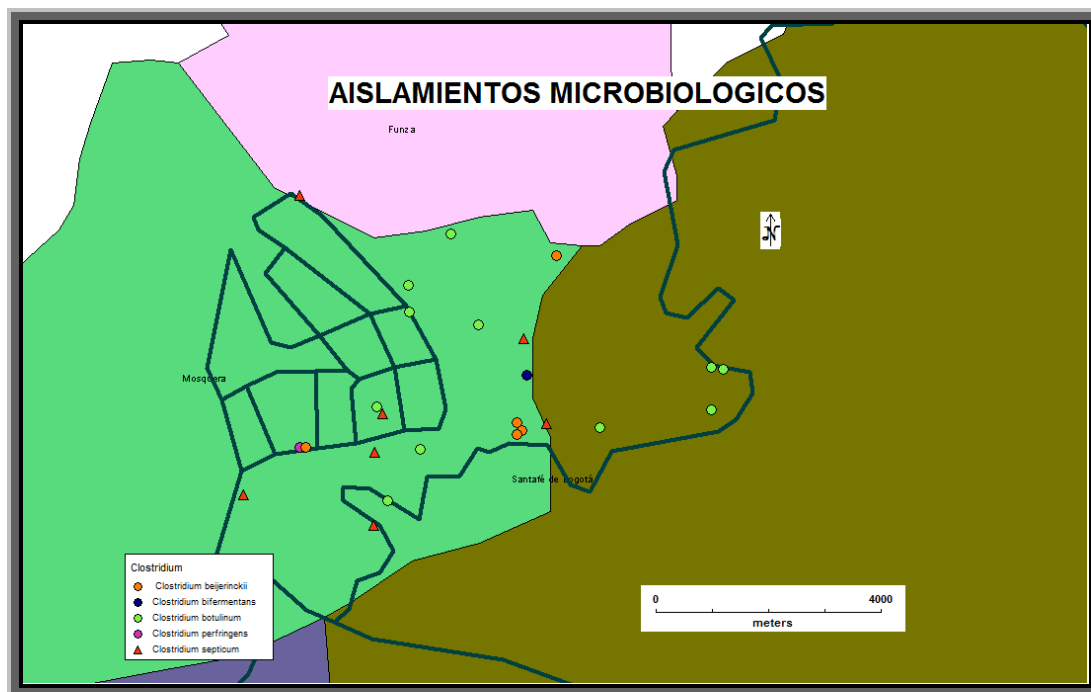


Figura 7. Cepas de *Clostridium* spp. aisladas en el municipio de Mosquera, departamento de Cundinamarca, con sus correspondientes georeferenciaciones.

7. CONCLUSIONES

1. Se aislaron bacterias anaerobias esporuladas pertenecientes al género *Clostridium* spp. presentando alta prevalencia de identificación de especies patógenas en las zonas afectadas por las inundaciones con la ola invernal vivida en el municipio de Mosquera, departamento de Cundinamarca.
2. El análisis epidemiológico permitió identificar la altura como un Factor de Riesgo para la presencia de bacterias clostridiales patógenas y no patógenas. ($p=0,0137$).
3. La falta de oxigenación causada por las inundaciones en el municipio de Mosquera con la ola invernal aumentan el riesgo de que se desate un brote epidémico en la zona que afecte al ganado de producción especializada.

8. RECOMENDACIONES

1. Organizar y realizar planes de vacunación para el ganado que vaya a ser alimentado en los predios afectados por la ola invernal, de forma que se pueda mitigar el impacto que causan estos microorganismos sobre los bovinos y evitar pérdidas económicas por la muerte del animal o/y la disminución en la producción.
2. Realizar un análisis de genética molecular para lograr tener una identificación más exacta de las cepas aisladas como *Clostridium septicum* de forma que se eviten confusiones de similitud con *Clostridium chauvoei*.
3. Evaluar la concentración de clostridios en época de verano, de forma que se pueda ver el comportamiento de las poblaciones pertenecientes a este género en las zonas afectadas por las inundaciones.

9. LITERATURA CITADA

1. Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews* 1990; 3(1), 66-69.
2. Reyes GM, Villamil LC, Ariza SN, Cediel BN, Romero JR. Salud Pública Veterinaria en Colombia. Pasado, Presente y Futuro. Organización Panamericana de la Salud. Editorial Moosn Creative Publicidad 2004; 114 p. http://new.paho.org/col/index.php?option=com_joomlabook&Itemid=259&task=display&id=264. Consultado el 30 de Mayo de 2011.
3. Titball R, Mainil J, Duchesnes C, Popoff M. Genus *Clostridium*. Pathology and ecology of the genus *Clostridium* in humans, animals, and foodstuffs: identification, epidemiology and prophylaxis. http://ec.europa.eu/research/agriculture/pdf/clostridia_en.pdf. Consultado el 30 de Mayo 2011.
4. Ortiz D, Villamil LCI. Bacterias anaerobias del suelo responsables de la muerte súbita bovina en sabanas tropicales: investigaciones realizadas en Colombia. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 2008; 9(1), 102-112.
5. Haines A, McMichael A, Epstein P. Environment and health: 2. global climate change and health. *Canadian Medical Association Journal* 2000; 163, 729-34.
6. Dilcia U, Herman H, Pineda J, Carrasco A. Viabilidad de *Rhizoctonia solani* AG1-IA bajo condiciones de inundación. I. Micoflora asociada al patógeno en tejido de *Oriza sativa*. *Biagro* 1998; 10(2), 45 p.
7. Francisco CF, Lobato FM, Salvarani RA. Clostridiosis Dos Pequenos Ruminantes. *Revista Portuguesa Ciências Veterinárias De Correspondência* 2007;102 (Nº561-562), 23-25.
8. Fedegan. Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2019 (PEGA 2019). 2006: 23-30. http://portal.fedegan.org.co/Documentos/pega_2019.pdf. Consultado el 12 de Abril de 2011.
9. Costa PC. Adaptación al cambio climático en Colombia. *Revista de ingeniería. Universidad de los Andes*. Bogotá, Colombia. 2007; 26, 75 p.
10. Quinn J, Markey K, Carter E. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Editorial Acribia. 2005. 352 p.

11. Mudenda B, Isogai E, Lungu J, Mubita CH, Nambota A, Kirisawa R, Kimura K, Isogai H. Detection and characterization of clostridium species in soil of Zambia. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*. 2000; 23. 277-279.
12. Avila J, Canul R, Cabrera A. Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Ingeniería revista académica*. 2002; 6(3), 73,74.
13. Ortiz D, Benavides E, Villamil L. Factores de riesgo asociados con la ocurrencia del síndrome neuromuscular bovine en la Orinoquia Colombiana. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional*. 2001. 6 (15), 228-229.
14. Benavides E, Duque D, Estupiñán C, Benavides J, Altuzarra R, Ortiz D. Caracterización de bacterias anaerobias esporuladas presentes en los suelos de la Altillanura plana colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias agropecuarias* 1997; 10, 17 p.
15. LOUIS S. Common Mesophilic Anaerobes, Including Clostridium botulinum and Clostridium tetani, in 21 Soil specimens. *Applied Environmental Microbiology* 1975; 29 (5), 590 p.
16. Robson S. Clostridial Diseases in Cattle. *Primefacts Profitable & sustainable primary studies*. 2007; 440, 1 p. <http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/livestock/health/specific/cattle/clostridial-diseases-cattle>. Consultado el 30 de Mayo de 2011.
17. Benavides E. Causas de Muerte Súbita en Pastoreo en las Sabanas de América Tropical. *Revista Colombiana de Ciencias pecuarias* 2004;17(2), 185 p.
18. Powell J. Blackleg and other clostridial diseases. http://www.uaex.edu/Other_Areas/publications/PDF/FSA-3073.pdf. Consultado el 30 de Mayo de 2011.
19. Watson RT, Zinyowera MC, Dokken DJ, Moss RH. The regional impacts of climate change. An assessment of vulnerability. *Intergovernmental Panel on Climate Change* 1997; 11-14. <http://www.ipcc.ch/pdf/special-reports/spm/region-en.pdf>. Consultado el 29 de Mayo de 2011.
20. Ortiz D. Estudio epidemiológico del problema de mortalidad bovina en la Orinoquia colombiana. Tesis para Magister Scientiae en Salud Animal y Produccion Animal. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Capitulo III. Pag 63. Diciembre 2000.

21. Barrera RA, Hernández F. Análisis ultraestructural del fenómeno de "swarming" en *clostridium oceanicum* y *clostridium beijerinckii*. *Revista costarricense de ciencias médicas* 1999;20, 30 p.
22. Smith LD, Holdema LV. The Patogenic Anaerobic Bacteria. Charles C Thomas Publisher. Springfiel, Illinois. United States. 1968. 188-190.
23. Jim T, Murray RGE. Further studies of swarmer cell differentiation of *Proteus mirabilis* PM23: a requirement for iron and zinc. *Canadian Journal of Microbioyl* 1988;34, 589-590.
24. Garry S, David AR, Jackie KC, Jacques R, Rekha S, Robert TD, Qinghu R, Varga J, Awad MM, Brinkac LM, Daugherty SC, Haft DH, Dodson RJ, Madupu R, Nelson WC, Rosovitz MJ, Skewed. Genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Research* 2006; 16, 1032–1039
25. Jihong L, Kazuaki M, McClane BA. Comparison of Virulence Plasmids among *Clostridium perfringens* Type E Isolates. *Infection and Immunity* 2007; 75(4), 1817,1818.
26. Kuhnert P, Capaul SE, Nicolet J, Frey J. Phylogenetic Positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* Based on 16s rRNA Gene Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; 46(4), 1174,1175.
27. Mudenda B, Isogai E, Lungu J, Mubita CH, Nambota A, Kirisawa R, Kimura K, Isogai H. Detection and characterization of clostridium species in soil of Zambia. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases* 2000; 23, 277-284.
28. Lúquez C, Bianco MI, de Jong LI, Sagua MD, Arenas GN, Ciccarelli AS, Fernández RA. Distribution of Botulinum Toxin-Producing Clostridia in Soils of Argentina. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(7), 4138 p.
29. Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* 2000; 82(5), 428-431
30. Borroto RJ. Supervivencia de *Vibrio cholerae* O1 en agua dulce superficial y cólera endémico: una hipótesis geoecológica. *Revista Panameña de Salud Publica. Public Health* 1998; 4(6), 372 p.

10. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de las muestras de suelo analizadas, correspondientes a las características de los aislamientos en agar sangre, y coloración de Gram y verde de malaquita.

ID	Esporas	Colonias	Hemólisis
OI-1	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-2A	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-2B	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-3	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-4A	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-4B	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	B
OI-4C	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	A
OI-5A	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	A
OI-5B	Subterminales	Grisés con efecto swarming	A
OI-5C	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	A
OI-6	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	B
OI-7	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	B
OI-8	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-9	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-10	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-11	Subterminales	Colonias cremosas incoloras, de borde regular	B
OI-12	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	B
OI-13	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	B
OI-14	Subterminales	Grisés cremosas de borde regular	B
OI-15	Subterminales	Incoloras con efecto swarming	A
OI-16	Subterminales	Blancas con efecto swarming	A
OI-17	Subterminales	Color del medio efecto swarming	B
OI-18	Subterminales	Colonias cremosas incoloras de borde regular	B
OI-19	Subterminales	Color del medio efecto swarming	B
OI-20	Subterminales	Colonias cremosas incoloras de borde regular	B

Anexo 2. Frecuencia y proporción de las especies patógenas y no patógenas caracterizadas bioquímicamente mediante el Kit comercial API-20A®.

Microorganismo	PATOGENOS		
	NO	YES	TOTAL
<i>Clostridium beijerinckii</i>	5 (83,3%)	-	5(20,0%)
<i>Clostridium bifermentans</i>	1(16,7%)	-	1(4,0%)
<i>Clostridium botulinum</i>	-	11(57,9%)	11(44,0%)
<i>Clostridium perfringens</i>	-	1(5,3%)	1(4,0%)
<i>Clostridium septicum</i>	-	7(36,8%)	7(28,0%)
TOTAL	6 24,0%	19 76,0%	25 100,0%
	100,0%	100,0%	100,0%

Anexo 3. Cepas de *Clostridium* spp., aisladas en los predios afectados por la ola invernal.

ID	Finca	Identificación	Porcentaje
OI-1	La victoria	<i>Clostridium botulinum</i>	96,50%
OI-2A	Maricurie	<i>Clostridium botulinum</i>	99,90%
OI-2B	Maricurie	<i>Clostridium botulinum</i>	99,70%
OI-3	Cabuyas	<i>Clostridium botulinum</i>	98,70%
OI-4A	Los Acales	<i>Clostridium botulinum</i>	87,30%
OI-4B	Los Acales	<i>Clostridium septicum</i>	99,90%
OI-4C	Los Acales	<i>Clostridium beijerinckii</i>	99,90%
OI-5A	Carretonal	<i>Clostridium beijerinckii</i>	99,90%
OI-5B	Carretonal	<i>Clostridium bifermentans</i>	98,80%
OI-5C	Carretonal	<i>Clostridium beijerinckii</i>	99,90%
OI-6	Las Juntas	<i>Clostridium septicum</i>	99,90%
OI-7	El Trébol	<i>Clostridium septicum</i>	99,90%
OI-8	Pubenza	<i>Clostridium botulinum</i>	85,40%
OI-9	Tibaitata	<i>Clostridium botulinum</i>	96,50%
OI-10	Marengo	<i>Clostridium botulinum</i>	96,50%
OI-11	SENA	<i>Clostridium botulinum</i>	96,50%
OI-12	Entre Ríos	<i>Clostridium septicum</i>	99,90%
OI-13	Bodegón	<i>Clostridium septicum</i>	99,90%
OI-14	Santa Lucy	<i>Clostridium perfringens</i>	87,60%
OI-15	Santa Ana	<i>Clostridium beijerinckii</i>	99,90%
OI-16	El Campin	<i>Clostridium beijerinckii</i>	99,90%
OI-17	Borinque	<i>Clostridium septicum</i>	99,90%
OI-18	Ogamora	<i>Clostridium botulinum</i>	87,30%
OI-19	El Castillo	<i>Clostridium septicum</i>	99,90%
OI-20	Santa Isabel	<i>Clostridium botulinum</i>	96,50%

Anexo 4. Unidades Formadoras de Colonia por gramo de muestra de suelo analizado de predios afectados por la ola invernal.

ID	Finca	UFC/g
OI-1	La victoria	$7,0 \times 10^4$
OI-2 ^a	Maricurie	$1,1 \times 10^3$
OI-2B	Maricurie	$4,0 \times 10^2$
OI-3	Cabuyas	$3,2 \times 10^2$
OI-4 ^a	Los Acales	$4,0 \times 10^4$
OI-4B	Los Acales	$9,0 \times 10^2$
OI-4C	Los Acales	$3,0 \times 10^3$
OI-5 ^a	Carretonal	$1,4 \times 10^5$
OI-5B	Carretonal	$2,5 \times 10^3$
OI-5C	Carretonal	$3,0 \times 10^3$
OI-6	Las Juntas	$4,0 \times 10^3$
OI-7	El Trébol	$2,0 \times 10^4$
OI-8	Pubenza	$1,4 \times 10^3$
OI-9	Tibaitata	$7,0 \times 10^4$
OI-10	Marengo	$8,0 \times 10^4$
OI-11	SENA	$1,9 \times 10^3$
OI-12	Entre ríos	$1,2 \times 10^3$
OI-13	Bodegón	$2,0 \times 10^3$
OI-14	Santa Lucy	$2,9 \times 10^5$
OI-15	Santa Ana	$6,0 \times 10^3$
OI-16	El Campin	$1,4 \times 10^3$
OI-17	Borinque	$1,9 \times 10^3$
OI-18	Ogamora	$3,0 \times 10^3$
OI-19	El Castillo	$4,0 \times 10^2$
OI-20	Santa Isabel	$9,0 \times 10^2$

Anexo 5. Análisis de correlación estadística entre casos positivos y negativos con la altura (msnm).

Altura (msnm)	PATOGENOS		
	NO	YES	TOTAL
2434	-	1(5,3%)	1(4,0%)
2555	-	1(5,3%)	1(4,0%)
2557	-	1(5,3%)	1(4,0%)
2559	-	2(10,5%)	2(8,0%)
2560	-	1(5,3%)	1(4,0%)
2562	-	1(5,3%)	1(4,0%)
2565	-	1(5,3%)	1(4,0%)
2566	-	4(21,1%)	4(16,0%)
2568	-	1(5,3%)	1(4,0%)
2569	1(16,7%)	1(5,3%)	2(8,0%)
2570	-	1(5,3%)	1(4,0%)
2571	1(16,7%)	-	1(4,0%)
2600	-	2(10,5%)	2(8,0%)
2650	4(66,7%)	2(10,5%)	6(24,0%)
TOTAL	6	19	25
% Fila	24,0	76,0	100,0
% Columna	100,0	100,0	100,0

Patógenos	Muestras	Altura Media (msnm)	p
NO	6	2623,3333	0,0137
YES	19	2569,5789	

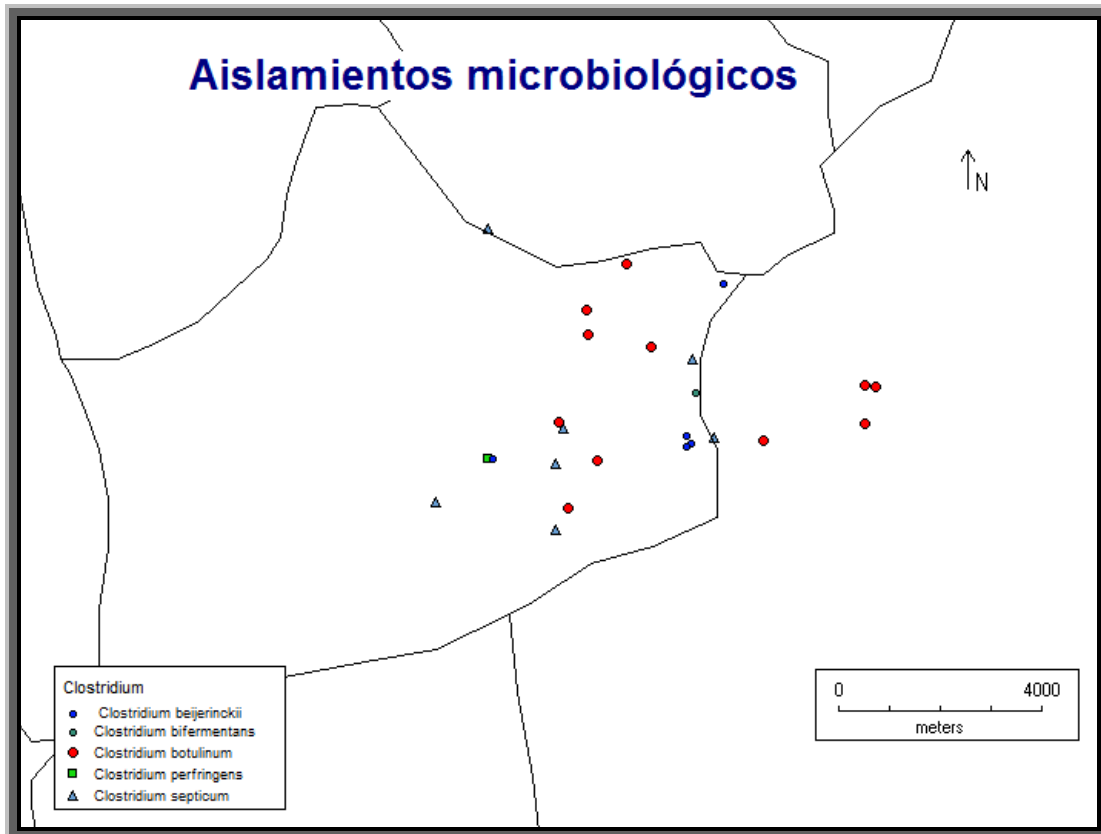
Anexo 6. Variables cuantitativas y cualitativas utilizadas para el análisis epidemiológico con *Epiinfo*®.

VARIABLES CUANTITATIVAS	VARIABLES CUALITATIVAS
1. UFC/g 2. Altura (msnm) 3. Tamaño del predio (Ha) 4. Hectareas Afectadas por la inundación 5. Hectareas destinadas a ganadería 6. Hectáreas con cultivos 7. Hectareas aun inundadas	8. Topografía del predio 9. Tipo de suelo 10. Sistema de pastoreo para el ganado 11. Grupo etareo del ganado 12. Otras especies muertas 13. Lugar de traslado del ganado 14. Cultivos en el predio 15. Presencia de humedales en el predio 16. Persistencia de la inundación 17. Método de evacuación del agua 18. Disposición de cadáveres

Anexo 7. Cepas de *Clostridium* spp., aisladas en cada una de las muestras analizadas, con sus correspondientes coordenadas decimales y geográficas.

ID	Predio	Microorganismo	Y (decimal)	X (decimal)	Y (geográfica)	X (geográfica)	Vereda
OI-1	La victoria	<i>Clostridium botulinum</i>	4,645094	-74,219436	04°38'42,28	074°13'10,07	SAN JOSE
OI-2A	Maricurie	<i>Clostridium botulinum</i>	4,666583	-74,164634	04°40'0,25725	074°9'53,83933	SAN FRANCISCO
OI-2B	Maricurie	<i>Clostridium botulinum</i>	4,666879	-74,166579	04°40'0,79413	074°9'58,198	SAN FRANCISCO
OI-3	Cabuyas	<i>Clostridium botulinum</i>	4,659964	-74,166579	04°39'35,71145	074°10'48,77183	SAN FRANCISCO
OI-4A	Los Acales	<i>Clostridium botulinum</i>	4,657100	-74,184813	04°39'26,851	074°11'40,820	SAN JOSE
OI-4B	Los Acales	<i>Clostridium septicum</i>	4,657650	-74,193557	04°39'27,573	074°11'37,930	SAN JOSE
OI-4C	Los Acales	<i>Clostridium beijerinckii</i>	4,657904	-74,198374	04°39'28,683	074°11'53,158	SAN JOSE
OI-5A	Carretonal	<i>Clostridium beijerinckii</i>	4,656579	-74,19751	04°39'4,591	074°11'45,061	SAN JOSE
OI-5B	Carretonal	<i>Clostridium bifermentans</i>	4,665573	-74,196695	04°36'6,591	074°11'48,061	SAN JOSE
OI-5C	Carretonal	<i>Clostridium beijerinckii</i>	4,655979	-74,19837	04°39'11,563	074°11'55,381	SAN JOSE
OI-6	Las Juntas	<i>Clostridium septicum</i>	4,641179	-74,221726	04°38'27,7	074°13'17,7	PLAYON
OI-7	El Trébol	<i>Clostridium septicum</i>	4,653074	-74,22151	04°39'11,7	074°13'32	PLAYON
OI-8	Pubenza	<i>Clostridium botulinum</i>	4,688659	-74,209181	04°41'20,11	074°12'32,9	SAN FRANCISCO
OI-9	Tibaitata	<i>Clostridium botulinum</i>	4,673834	-74,204668	04°41'06	074°12'24,6	SAN JOSE
OI-10	Marengo	<i>Clostridium botulinum</i>	4,68026	-74,216111	04°40'48,5	074°12'57,1	SAN JOSE
OI-11	SENA	<i>Clostridium botulinum</i>	4,675865	-74,215897	04°40'33,63	074°12'56,52	SAN JOSE
OI-12	Entre ríos	<i>Clostridium septicum</i>	4,646164	-74,242916	04°38'45,153	074°14'36,612	PLAYON
OI-13	Bodegón	<i>Clostridium septicum</i>	4,694952	-74,233738	04°40'143,37	074°12'18,13	SAN JOSE
OI-14	Santa Lucy	<i>Clostridium perfringens</i>	4,653883	-74,233738	04°39'13,89	074°14'02,63	SAN FRANCISCO
OI-15	Santa Ana	<i>Clostridium beijerinckii</i>	4,653869	-74,232867	04°39'13,6	074°13'56,79	PLAYON
OI-16	El Campin	<i>Clostridium beijerinckii</i>	4,68509	-74,191855	04°41'06,8	074°11'30,78	CANOAS
OI-17	Borinque	<i>Clostridium septicum</i>	4,659309	-74,220287	04°39'32,52	074°13'13,91	PLAYON
OI-18	Ogamora	<i>Clostridium botulinum</i>	4,660436	-74,221153	04°39'38,51	074°13'15,37	SAN JOSE
OI-19	El Castillo	<i>Clostridium septicum</i>	4,671546	-74,197148	04°40'17,47	074°11'49,49	SAN JOSE
OI-20	Santa Isabel	<i>Clostridium botulinum</i>	4,653555	-74,21417	04°39'12,43	074°12'4,56	SAN JOSE

Anexo 8. Mapa de Mosquera con georeferenciación de los puntos muestreados y la identificación del microorganismo aislado para esa zona.



Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic

11. Hay 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. Presentaron signos clínicos lo animales afectados?

Si

No

15. Descríbalos: _____

16. ¿Cómo dispone de los animales muertos?

Entierra _____

Vende _____

No hace nada, los zamuros se los comen _____

Quema _____ Otros _____

II. Descripción de 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 _____

17. ¿La finca tiene áreas inundables? Área de inundación (%)

NOTA: Si su respuesta es sí por favor especifique el porcentaje

Si

No

Porcentaje (< del 50%) _____ (= al 50 %) _____ (> del 50%) _____

III. Manejo de Praderas

18. ¿Ara o subsola los potreros? Cada cuanto (mes)

Si ¿Cada cuánto? _____

No

19. El sistema de Pastoreo es:

Continuo o extensivo _____

Rotacional _____

Intensivo (pasto de corte) _____

20. Tipo de suelo

Arenoso _____

Arcilloso _____

Humíferos (tierra negra) _____

Calizos (color blanco, secos y áridos) _____

Pedregosos _____
Mixtos (arenosos, arcillosos) _____

21. ¿Abona las praderas?
Si
No

22. Producto(s) empleado(s) _____

IV. Manejo Animal

23. Suministra sales mineralizadas
Si
No

24. Frecuencia _____

25. Marca _____

26. Bultos al mes _____

27. Otros Suplementos _____

V. Manejo del agua

28. Fuente de agua: _____

29. Suministro de agua a los animales: _____

30. Tratamiento de agua: _____

31. Presencia de caracoles en el predio: Si _____ No _____

32. Control de caracoles: Si _____ No _____ Cual? _____

33. Manejo de excretas:
Ninguno _____
Estercolero _____
Esparcimiento _____
Lombricultura _____

VI. Plantas Tóxicas

34. ¿Hay plantas tóxicas?
Si
No

35. ¿Cuáles existen en la finca?

36. ¿Asocia la presencia de plantas tóxicas con el problema de mortalidad?

Si

No

VII. Pesticidas

37. ¿En la finca se utilizan pesticidas?

Si

No

38. ¿Asocia el uso de pesticidas con el problema de mortalidad?

Si

No

VIII. Manejo Sanitario

33. Vacunas

Aftosa _____

Carbón o Rayo _____

Brucelosis _____

Cuales _____

34. Compra de animales _____ Procedencia _____

35. Venta de animales _____ Causa _____

IX. Observaciones
