

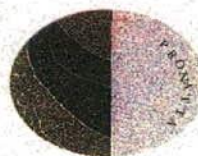
22935

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

57203



Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria



PRONATTA

Programa Nacional de Investigación en Salud Animal

**Seminario:
El Botulismo en Bovinos, Historia,
Causas y Recomendaciones de
Manejo**

**PUBLICACIONES TÉCNICO
CIENTÍFICAS**

Villavicencio, Junio 26 de 2003. Auditorio de la Cámara de
Comercio de Villavicencio

22935

TABLA DE CONTENIDO

1. El Diagnóstico de Toxinas Botulínicas en el Laboratorio en Colombia. Benavides, E., Ortiz, D. & Benavides, J. (1999). Informe Institucional. Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria. pp 1-9
2. Association of Botulism and Tetanus as Causative Agents of an Outbreak of Bovine Paraplegic Mortality in the Eastern Plains of Colombia. Benavides, E., Ortiz, D. & Benavides, J. (2000). Annals of the New York Academy of Sciences 916, 646-649.
3. Factores de Riesgo Asociados con la Ocurrencia del Síndrome Neuroparalítico Bovino en la Orinoquía Colombiana. Ortiz, D., Benavides, E. & Villamil, L. (2001 a). Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. 6 (15), 228-229
4. Etiología, Epidemiología y Alteraciones Clínico –Patológicas Asociadas con el Síndrome Neuroparalítico Bovino en la Orinoquía Colombiana. Ortiz, D., Benavides, E. & Villamil, L. (2001 b). Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. 6 (15), 224-226.
5. Epidemiología, Diagnóstico y Control del Botulismo Bovino en Colombia. Ortiz, D. & Benavides, E. (2002). Carta Fedegan 77, (Anexo coleccionable), 162-174.
6. Las Neurotoxinas Tipo C y D de *Clostridium botulinum* Responsables de Parte de la Mortalidad de Bovinos Afectados por el Síndrome Neuroparalítico en Cuatro Fincas de la Orinoquía Colombiana. Ortiz, D. & Benavides, E. (2002). Revista de Medicina Veterinaria 2 (3), 7-20.

El Diagnóstico de Toxinas Botulínicas en el Laboratorio en Colombia

Benavides, E., Ortiz , D. & Benavides, J. (1999). Informe Institucional. Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria. pp 1-9



El Diagnóstico de Toxinas Botulínicas en el Laboratorio en Colombia¹.

Efraín Benavides O., Diego Ortiz O. y Johanna Benavides A.²

Resumen

Desde finales de 1995 un grupo de investigadores del Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria de CORPOICA, liderado por Efraín Benavides, ha venido desarrollando metodologías de laboratorio, aceptadas por la comunidad científica internacional, que permitan la confirmación diagnóstica del Botulismo bovino en Colombia, particularmente en lo que refiere a la identificación de los tipos de toxinas incriminados con los casos de mortalidad que se observan en la Orinoquía. Las investigaciones han implicado un proceso de auto-capacitación a partir de procesos Pausterianos básicos; los que han permitido el refinamiento de protocolos de laboratorio para el desarrollo de la prueba biológica en ratón y de pruebas de seroneutralización consecuentes, utilizando antitoxinas específicas de referencia. Esto ha permitido la confirmación diagnóstica del Botulismo en Colombia y la identificación del (los) tipo de toxina(s) involucradas. Se definió como "caso" a un episodio de mortalidad en un predio en una fecha específica, del cual se recolectan muestras de uno o varios animales afectados. En cerca de cuatro años de trabajo se han recibido en el laboratorio, muestras correspondientes a 78 casos y se han procesado mediante prueba biológica un total de 71 casos; de estas, 28 han demostrado algún tipo de toxicidad para ratón, de las cuales 23 eran termolábiles; sin embargo no siempre la mortalidad luego de la inoculación en la prueba biológica, está asociada con botulismo. Con la experiencia acumulada, se ha desarrollado una rutina para facilitar la interpretación de lo observado en los procesos de laboratorio; en la cual, los resultados que se van obteniendo para cada caso son examinados por un grupo de trabajo, quien decide el siguiente proceso a ejecutar, hasta llegar a una conclusión para poder darlo por cerrado. El proceso de cada caso puede tomar 3 a 6 semanas. Utilizando este procedimiento mejorado, durante 1998 se procesó un total de 34 muestras, de las cuales, sólo 4 casos demostraron toxicidad y sintomatología compatible con botulismo. Las pruebas de seroneutralización con antitoxinas específicas demostraron la presencia conjunta de toxinas tipos C y D del *Clostridium botulinum*, en dos casos (Puerto Carreño y Cumaribo); en otro, presencia conjunta de toxinas tipos A y D (Nueva Antioquia); mientras en un caso (El Porvenir), la mortalidad fue inhibida al utilizar antitoxina tetánica. Se han realizado cultivos anaeróbicos de suelos recolectados en las fincas afectadas y se ha demostrado toxicidad en sobrenadantes del cultivo de 32 muestras. La prueba de neutralización se ha culminado en sólo cuatro de estas muestras, de los cuales todas han demostrado contener toxina tetánica.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

¹ © Contribución del Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA (1999). Este documento sólo disponible hasta el momento como informe interno institucional, se ha editado para el público para el evento "El Botulismo en Bovinos, Historia, Causas y Recomendaciones de Manejo". Villavicencio, junio 26 de 2003. Programa Nacional de Investigación en Salud Animal, CORPOICA – Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, PRONATTA.

² Respectivamente: Médico Veterinario, MSc., PhD.; Médico Veterinario, Patólogo y Médica Veterinaria. Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria (Hoy Programa de Salud Animal). Centro de Investigación en Salud y Producción Animal, CEISA. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Bogotá. Colombia. Email: ebenavid@andinnet.com

1. INTRODUCCION.

El botulismo es una intoxicación alimentaria que causa enfermedad neuromuscular en el hombre y diversas especies de animales; debido a la presencia en el organismo de exotoxinas de la bacteria anaerobia esporulada *Clostridium botulinum* (Hatheway, 1988). Las esporas del *C. botulinum* se encuentran normalmente en los suelos y sedimentos acuíferos de la mayoría de regiones del mundo, pero generalmente se acepta que el botulismo ocurre únicamente si las esporas tienen la capacidad de germinar en los alimentos, dando lugar a crecimiento bacteriano y la subsecuente producción de toxina botulínica; la bacteria es un anaerobio obligado, es decir no puede crecer en presencia de oxígeno (Hatheway, 1990). Todos los síntomas clínicos del botulismo en bovinos, incluyendo la parálisis flácida, son debidos a las neurotoxinas botulínicas que bloquean la liberación de acetil colina de las uniones neuromusculares. Su enorme potencia se atribuye a su neuro-especificidad y a su desconocida actividad enzimática intracelular (Schiavo *et al.*, 1992).

En humanos ocurren tres tipos de botulismo: el **botulismo infantil**, asociado con la colonización de la bacteria en el intestino de infantes menores de un año, los que aún no han desarrollado la flora normal que impide normalmente la colonización de *C. botulinum* en el tubo digestivo; el **botulismo por heridas** puede ocurrir por el crecimiento de la bacteria en heridas profundas y extensas, de manera análoga a como ocurre en el caso del tétano, y está generalmente asociado a heridas de guerra o heridas traumáticas contaminadas con suelo (Hatheway, 1988; Hatheway, 1990). El botulismo asociado con la **colonización intestinal en adultos** se ha descrito en casos de pacientes que reciben altos tratamientos antibióticos que pueden afectar la flora del tracto gastrointestinal (Shapiro *et al.*, 1998).

Los bovinos contraen el botulismo de dos formas: la primera, comiendo cadáveres o huesos contaminados con la toxina botulínica que encuentran abandonados; y la segunda, por el consumo de heno contaminado con esta toxina; entonces la primera forma es más común en sistemas de producción extensivos y semi-extensivos y la segunda, es más frecuente en sistemas de producción intensivos con manejo en confinamiento. En aquellas partes del mundo en las que el suelo es deficiente en fósforo el botulismo contraído por el consumo de heno se denomina corrientemente "intoxicación del forraje" (Blood *et al.*, 1986).

Los suelos de los Llanos orientales de Colombia se caracterizan por ser ácidos y de baja fertilidad con altos niveles de saturación de aluminio, lo que los limita para la producción agrícola (García, 1992). Allí se reconocen tres regiones bien diferenciadas según sus particularidades agroecológicas: el piedemonte Llanero, la Orinoquía mal drenada (sabanas inundables localizadas al norte y margen izquierdo del río Meta) y la Orinoquía bien drenada o Altillanura (caracterizada por la presencia de sabanas y bosques de galería, reducidos a las márgenes de las fuentes de agua y localizada a la margen derecha del río Meta). La altillanura posee las condiciones edafológicas y climáticas más limitantes de la región (Sanchez & Cochrane, 1985; García, 1992).

En la región, desde comienzos de la década del noventa y especialmente en la altillanura, ocurre un incremento en los casos de mortalidad de ganado adulto, los que se han presentado en forma de brote durante el segundo semestre del año. Aunque en la región se reconocen diversas causas de mortalidad de los bovinos adultos (García *et al.*, 1984), la enfermedad que se viene presentado en forma epidémica en la región se ha caracterizado por poseer una sintomatología particular y específica; lo observado en los animales, es un cuadro nervioso

caracterizado por parálisis de los miembros traseros, que afecta generalmente a animales mejorados genéticamente, en especial a las hembras; novillas y vacas, durante su gestación y lactancia; además aparece durante los primeros y últimos meses del invierno (Garmendía *et al.*, 1993). Estas alteraciones clínicas de los animales afectados se han asociado con un síndrome neuromuscular, lo que ha conducido al diagnóstico tentativo de que el botulismo bovino, es la causa de esta enfermedad en Colombia (Parra *et al.*, 1997; Uribe, 1996).

2. EL DIAGNÓSTICO DE BOTULISMO EN COLOMBIA.

En Colombia, a mediados de 1995 no existía ninguna institución o grupo de investigación con la experiencia, formación e inmunorreactivos necesarios para adelantar un diagnóstico confirmatorio de botulismo. Debido a que desde 1994 se venían adelantando algunos procesos de laboratorio tendientes a la identificación, caracterización y diagnóstico en el laboratorio de agentes causantes de muerte súbita en bovinos (bacterias anaeróbicas: Clostridiosis), un grupo de profesionales del Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria, liderado por Efraín Benavides, reorientó sus actividades con el fin de desarrollar capacidades y experiencias para la confirmación diagnóstica de esta enfermedad en el país.

Luego de una intensa revisión bibliográfica sobre el tema, los trabajos se iniciaron utilizando métodos Pausterianos básicos (Benavides *et al.*, 1996; Benavides *et al.*, 1997), basados en el conocimiento de las propiedades biológicas de la toxina botulínica, destacando entre ellas su inactivación por calor, su tamaño y su posible potenciación luego del tratamiento enzimático (Hatheway, 1988; Sugiyama, 1986). Los protocolos y métodos de laboratorio han venido sufriendo mejoras paulatinas a través del tiempo, basados en la experiencia acumulada y a consultas realizadas con laboratorios especializados en el exterior, particularmente el Centre for Disease Control (CDC, Atlanta, USA), desde donde, a inicios de 1997, se obtuvieron antitoxinas de referencia para la tipificación del tipo de toxinas botulínicas involucradas.

La confirmación diagnóstica de botulismo en el laboratorio implica tres pasos fundamentales: el primero, la extracción de toxinas a partir de fluidos y materiales biológicos de animales afectados; segundo, se debe verificar esa actividad tóxica sobre animales de laboratorio (generalmente ratones); y tercero, se debe demostrar que esa actividad tóxica es inhibida específicamente por antitoxinas de referencia (Hatheway, 1990).

La prueba biológica se realiza inoculando ratones por vía intraperitoneal con extractos de suero, hígado, contenido intestinal y ruminal, observando posteriormente la aparición de sintomatología neuromuscular en ratones. El diagnóstico se confirma cuando la toxina en el extracto es neutralizada por una antitoxina específica (Thomas, 1991). Esta prueba biológica en ratón demuestra bastante sensibilidad, permitiendo detectar niveles de toxina menores que 5 DL₅₀/ml en muestras biológicas; pero tiene muchos inconvenientes, debido al gran número de animales de laboratorio requeridos para su comprobación, la tardanza para obtener los resultados y la probabilidad de muerte inespecífica de los ratones, debida a interferencia de otras sustancias que pueden ser letales o influenciar la neutralización de las toxinas.

Ha sido recomendado (Hatheway, 1988), que la investigación sobre botulismo sólo sea llevada a cabo en un número limitado de laboratorios de referencia. Muchos laboratorios, aún del nivel regional, pueden trabajar durante años sin encontrar un sólo espécimen positivo. La interpretación adecuada de resultados requiere de gran experiencia acumulada, tanto con

especímenes negativos como positivos. Uno de los principales problemas es el reconocimiento de las reacciones no específicas, ya que materiales tóxicos inespecíficos pueden ocurrir en muestras de materia fecal y órganos. Un laboratorista experimentado podrá reconocer signos de botulismo en ratón y generalmente podrá diferenciarlos de otros efectos tóxicos no asociados a botulismo; la experiencia indica que debe tenerse cuidado con los reportes tempranos, los cuales deben ser siempre tomados como provisionales. Las pruebas deben repetirse hasta donde sea posible y demostrar que los resultados son consistentes (Hatheway, 1988).

Aunque se han descrito métodos alternos para el diagnóstico de botulismo en animales domésticos, tales como el uso de pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) (Gregory *et al.*, 1996; Jubb *et al.*, 1993; Thomas, 1991), y una prueba de fijación de complemento (Dutra *et al.*, 1993) la prueba biológica en ratón con el uso de antitoxinas específicas continúa siendo el método más confiable y de más frecuente uso en laboratorios alrededor del mundo para el diagnóstico de botulismo (Hatheway, 1990).

La confirmación diagnóstica de botulismo en el laboratorio, requiere realizar serias consideraciones sobre una serie de factores que interfieren en el logro de resultados exitosos. Estos factores se relacionan con la calidad de la muestra, el procesamiento de la misma y características del huésped experimental a utilizar ; entre ellos se destaca:

- Identificación clara de la enfermedad en el campo. Un diagnóstico tentativo del botulismo en el campo se basa en una muy buena observación de signos y síntomas de pacientes afectados (parálisis motriz progresiva) y su relación con la conducta de osteofagia (alotriofagia) en los animales (figura 1), como consecuencia de praderas pobres en fósforo; o por otros tipos de evidencia epidemiológica, como el hallar animales muertos en heno o silos (Fernández *et al.*, 1989).

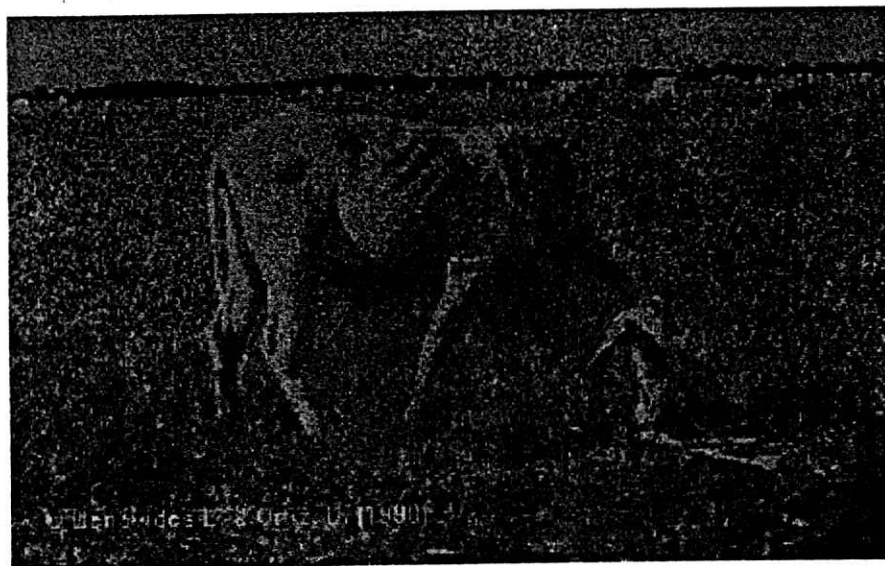


Figura 1. Evidencia de consumo de huesos por parte de bovinos adultos en la altillanura, como factor predisponente para la intoxicación por Botulismo. (Foto©. Benavides, E. & Ortiz, D. 1990).

- Calidad y cantidad de la muestra enviada para análisis. Las muestras de elección para la confirmación de botulismo en el laboratorio son: suero sanguíneo, contenido ruminal, contenido intestinal e hígado de animales, enviando como mínimo 250 gr. de muestra. Esta debe ser obtenida de animales sacrificados o recientemente muertos, que no presenten avanzado estado de autólisis (Hatheway, 1988).
- Conservación de las muestras durante el transporte. Todas las muestras deben enviarse refrigeradas (5-8 grados centígrados), empacadas en bolsas estériles y debidamente rotuladas (Hatheway, 1988).
- Preparación del extracto en el laboratorio e inoculación de animales experimentales. Las neurotoxinas botulínicas se identifican como agentes letales en ratones, cuya toxicidad puede ser neutralizada con antitoxinas específicas. Es una prueba altamente susceptible para todos los tipos de toxinas conocidas. Se inoculan vía intraperitoneal en ratones de aproximadamente 18-25 gr. de peso (Sugiyama, 1980).
- Identificación de la sintomatología en huéspedes experimentales. Los signos característicos de intoxicación botulínica en ratones son: debilidad pronunciada en los cuartos traseros, acompañado de bajo tono de los músculos abdominales con presencia de un síntoma denominado **abdomen encintado** (figura 2), dificultad respiratoria y finalmente muerte de los animales que ocurre entre 24 y 48 horas posterior a la inoculación experimental (Hatheway, 1988).



Figura 2. Prueba Biológica de la actividad de Toxinas botulínicas en ratón. Desarrollo de síntomas de Neurotoxicidad y Paraplejía en ratones inoculados experimentalmente, demostrando el típico signo de **Abdomen Encintado**. (Foto©. Benavides, E. & Ortiz, D. 1989)

A pesar de parecer ser un proceso sencillo, la ejecución de estas pruebas de manera rutinaria en un alto número de muestras, requiere de desarrollos logísticos que permitan asegurar que los resultados en cada paso del proceso son adecuadamente interpretados. Para esto, en el seno del grupo de investigadores involucrado con estos procesos, se conformó un comité técnico que cada semana examinaba los resultados alcanzados en las pruebas biológicas de la semana anterior y tomaba decisiones sobre los procesos a desarrollar para cada caso en la semana siguiente. Un diagrama del esquema de seguimiento de muestras finalmente definido en el seno del grupo, se presenta en la figura 3.

Flujograma del Proceso de Muestras en el Laboratorio para el Diagnóstico de Botulismo.

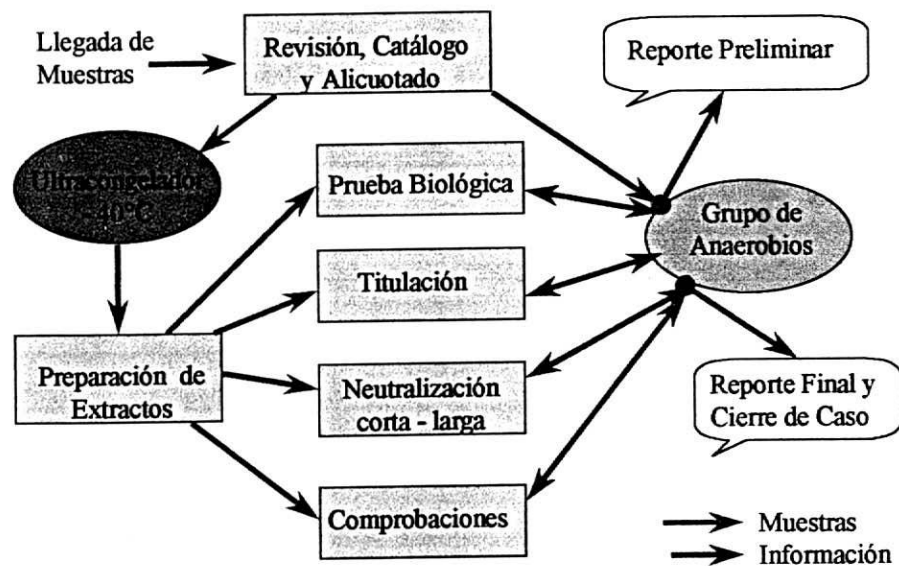


Figura 3. Diagrama del Proceso de muestras en el laboratorio para el diagnóstico de Botulismo, utilizando la Prueba Biológica en Ratón y Pruebas de Seroneutralización. Se indican los niveles de toma de decisiones. CORPOICA -CEISA, 1998-1999.

3. RESULTADOS ALCANZADOS.

Como se describió arriba, desde finales de 1995, varios profesionales del Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria de CORPOICA, iniciaron actividades de laboratorio tendientes a la confirmación diagnóstica del botulismo en Colombia. Las actividades de laboratorio de nuestro grupo de trabajo pueden dividirse en dos fases bien definidas:

- El período 1995 - 1997, donde se inició con procesos Pasteurianos básicos y se realizó una mejora gradual de los procedimientos y protocolos de laboratorio, incluyendo la realización de las primeras pruebas de seroneutralización (Benavides *et al.*, 1996; Benavides *et al.*, 1997). Los resultados de esta fase de trabajo deben tomarse como tentativos, debido a que por agotamiento de las muestras, no todos los procesos pudieron ser repetidos de manera suficiente en el laboratorio, para asegurar la máxima confiabilidad;

de cualquier manera, es información valiosa desde el punto de vista epidemiológico. De esta fase aún existen en los ultracongeladores del CEISA, 7 casos por procesar, actividad que se ha aplazado por limitaciones presupuestales.

- El período 1998 - 1999, en el cual el grupo de trabajo ya había afinado y experimentado los protocolos y procesos de laboratorio aceptados por la comunidad científica internacional (Benavides *et al.*, 1998; Hatheway, 1988). Durante este período, las pruebas fueron apropiadamente repetidas, teniendo un corto intervalo de tiempo entre la realización de la prueba biológica inicial y la de neutralización; además, se estableció un protocolo para incluir antitoxina tetánica en las pruebas de seroneutralización, lo que ha permitido concluir el diagnóstico en algunos casos que no eran neutralizados por antitoxina botulínica. Entonces, los resultados obtenidos durante este período deben tomarse como definitivos.

En la tabla 1 se presenta un resumen de los casos procesados durante el período 1995 –1997; de 37 casos trabajados en el periodo, 22 demostraron algún tipo de toxicidad para ratón, siendo tres de ellos termoestables (es decir, continuaron siendo tóxicos luego del tratamiento a 100° C.), condición no compatible con botulismo. Diez de estos casos fueron sometidos a pruebas de neutralización con antitoxinas botulínicas específicas. Es interesante anotar que todas las muestras termoestables en este periodo correspondieron a extractos preparados a partir de contenido intestinal.

Tabla 1. Casos procesados mediante Prueba Biológica para Diagnóstico Preliminar de Botulismo en el Laboratorio de Bacterias Anaerobias durante el periodo 1995-1997 y Resultados Obtenidos

TIPO DE MUESTRA	NUMERO DE CASOS	TÓXICO TERMOLABIL	TOXICO TERMOESTABLE	NEUTRALIZACIÓN
CONTENIDO RUMINAL	29	17		9
HIGADO	31	5		2
CONTENIDO INTESTINAL	15	4	3	
RESUMEN POR CASO	37	19	3	10

En seis de estos casos sometidos a neutralización, no fue posible confirmar un diagnóstico de botulismo, debido a que las antitoxinas utilizadas no inhibieron la mortalidad en ratón (en tres casos usando las siete antitoxinas disponibles y en tres utilizando un protocolo corto con antitoxinas A, C, D y polivalente); mientras un caso adicional perdió toxicidad y no pudo ser concluido. En tres casos se obtuvo neutralización se obtuvo neutralización específica (la cual, tal como se indicó arriba, debe tomarse como diagnóstico tentativo): el primero correspondiente al caserío del Porvenir – Puerto Gaitán (por discreción de los propietarios, se omitirá el nombre de las fincas y se indicará el lugar de referencia geográfica más cercano y municipio al que pertenece), donde se detectó actividad conjunta de toxinas A, C y D; un segundo caso, en cercanías de Carimagua – Puerto Gaitán, donde la mortalidad fue inhibida por las antitoxinas C y D; y un tercer caso (El Retorno), donde se detectó actividad de toxinas A y C.

En la tabla 2 se discriminan los resultados obtenidos en el período 1998 –1999, cuando se utilizaron métodos mejorados y la confiabilidad de los resultados ya se considera óptima. De 34 casos procesados durante esta fase de trabajo, ocho mostraron algún grado de toxicidad resultando 7 de estos, termolábiles.

Tabla 2. Casos procesados mediante Prueba Biológica para Diagnóstica Preliminar de Botulismo en el Laboratorio de Bacterias Anaerobias durante el período 1998 – 1999 y Resultados Obtenidos.

TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE CASOS	TOXICO TERMOLABIL	TOXICO TERMOESTABLE	NEUTRALIZACION
CONTENIDO RUMINAL	30	3	1	3
HIGADO	26	4	1	5
CONTENIDO INTESTINAL	16	2	1	3
MATERIA FECAL	1			
RESUMEN POR CASO	34	7	1	8

En esta ocasión, todas las muestras que resultaron tóxicas fueron sometidas a prueba de neutralización; en dos casos no fue posible concluir diagnóstico, debido a que las muestras perdieron toxicidad, en uno y fue insuficiente en el segundo; en otros dos casos, no se demostró neutralización al usar un protocolo corto con antitoxinas A, C, D y polivalente. Se confirmó inequívocamente la presencia de botulismo en tres casos: dos casos pertenecientes al mismo predio (El viento, Cumaribo), demostraron contener la presencia conjunta de toxinas de *C. botulinum*, tipos C y D; mientras en otro caso (Nueva Antioquia – Puerto Carreño) existía la presencia conjunta de toxinas tipo A y D.

Para finalizar es importante discutir algunos aspectos relacionados con la interpretación epidemiológica de estos resultados. Un diagnóstico negativo en la prueba de laboratorio, no necesariamente implica que el botulismo no fuese la causa de la muerte de los animales, es posible que esto sea debido a que las toxinas no estaban presentes en el extracto inoculado en una cantidad suficiente para causar la toxicidad en ratones (5 Dosis Letal 50 – 5 DL₅₀ en ratón), o a que las muestras obtenidas no fueron enviadas en forma adecuada.

Este último aspecto, la calidad y forma de envío de la muestra, parece crucial para alcanzar resultados exitosos en estos procesos. No es coincidencia, el hecho de que de los cuatro casos que resultaron positivos en la prueba de seroneutralización durante el período 1998 – 1999, tres fueron recolectadas directamente por profesionales del Programa de Epidemiología Veterinaria y conducidas en corto plazo al CEISA. Las muestras enviadas por terceros, en ocasiones, toman dos o más semanas entre el momento de su recolección y su arribo al laboratorio, entonces las muestras llegan sin adecuada refrigeración y en avanzado estado de descomposición; bajo estas condiciones cualquier toxina que estuviese contenida en esos materiales será inactivada por los procesos autolíticos y de descomposición.

Por otra parte, un resultado positivo en la prueba biológica inicial, aún con características de termolabilidad, no es garantía de que dicho extracto posee toxinas botulínicas. Existen varias posibilidades ante el evento de una respuesta biológica positiva (Evidencia de sintomatología nerviosa y mortalidad en los ratones):

- Mortalidad producida por toxinas con características de termoestabilidad, no mencionada en la literatura como típico de toxinas botulínicas; podría tratarse de un tóxico inespecífico o de la presencia de toxina tetánica.
- Mortalidad con características de termolabilidad que después de almacenada pierde toxicidad; mortalidad posiblemente asociada a contaminación bacteriana del extracto u otro tipo de toxicidad inespecífica.
- Mortalidad por toxinas termolábiles, característica típica de toxinas botulínicas.
- Agente tóxico con características de mortalidad, termolabilidad y sintomatología nerviosa, no neutralizable con antitoxinas botulínicas conocidas, atribuida posiblemente a serotipos no descritos aún.

4. CONCLUSIÓN

Utilizando métodos y protocolos de laboratorio aceptados por la comunidad científica internacional, nuestro grupo de trabajo ha comprobado que al menos parte de los casos de mortalidad bovina que ocurren en la Orinoquia Colombiana posee como causa etiológica a las neurotoxinas de *Clostridium botulinum*, las que son ingeridas por el ganado, cuando consume huesos y carroña al tratar de corregir sus deficiencias minerales. Los tipos de neurotoxinas implicados con los casos de mortalidad, corresponden a los tipos A; C y D, lo que aparecen de manera combinada en diversos predios.

Por otra parte, se evidenció que en un caso, la mortalidad estaba asociada a una toxina termoestable, la que resultó corresponder a la neurotoxina de *Clostridium tetani*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

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 O., E.; BENAVIDES A., J.; ALTUZARRA B., R.; ORTIZ O., D.; LONDOÑO B., M.; ORTIZ O., D. & CORTEZ G. H. (1997). **Botulismo bovino en Colombia: Avances de Investigación con relación al brote de mortalidad de Bovinos en la Orinoquia Colombiana, 1996 - 1997.** (Memorias IV Encuentro

Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias - ENICIP, Medellín, noviembre 6 y 7 de 1997). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 10, (Suplemento) pp. 52.

BENAVIDES O., E.; ORTIZ O., D.; DUQUE, D.; ESTUPIÑAN, C.; ALTUZARRA B., R.; & BENAVIDES A., J. (1998). **Research efforts to Identify the caustive agent of an Outbreak of Bovine Paraplegic Mortality in the Eastern Plains of Colombia.** In: "Abstracts of the European Clostridia Conference", 1st 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>)



- 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.
- DUTRA, I.; WEISS, H.E.; WEISS, H. & DOBEREIRNER, J. (1993). **Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento**. Pesquisa veterinaria Brasileira 13(3/4), 83-86.
- FERNANDEZ, R.; CICCARELLI, A.; ARENAS G.; GIMENEZ 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(2), 47-53.
- GARCIA D., O. (1992). **Desarrollo de Sistemas de Producción de Ganado de Doble Propósito en Pastoreo bajo condiciones de la Orinoquía y Amazonía Colombianas**. En: Memorias Seminario Internacional sobre Ganadería de Doble Propósito. Centro Internacional de Capacitación para el Desarrollo Pecuario, CICADEP. Cartagena de Indias, Colombia, Octubre 7,8 y 9 de 1992. 15p.
- GARCIA D., O.; ZULUAGA, F.N. & AYCARDI, E. (1984). **Causas de Mortalidad Bovina en una Ganadería de los Llanos Orientales de Colombia**. Revista Acovez 8(25), 39-46.
- GARMENDIA, J.C.; PACHECO G., G. & REINA, N.Y. (1993). **El Síndrome Parapléjico de los Bovinos**. En: "Aspectos de Sanidad Animal en áreas afectadas por el Síndrome Parapléjico del Bovino". Boletín N° 2. Programa de Cooperación Agrícola, Convenio MAC/PDVSA (Ministerio de Agricultura y Cria/Petróleos de Venezuela, S.A.). Caracas, Venezuela. pp. 19-34.
- 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.
- 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. 111-133.
- HATHEWAY, C.L. (1990). **Toxigenic Clostridia**. Clinical Microbiology Reviews 3(1), 66-98.
- JUUB, T.; ELLIS, T.; GREGORY, A. (1993). **Diagnosis of Botulism in cattle using ELISA to detect antibody to botulinum toxins**. Australian Veterinary Journal 70(6), 226-227.
- PARRA, J.L.; OLARTE, L.F.; BARRERA M., J.E. & ACEVEDO, L.F. (1997). **Mortalidad Bovina en la Altillanura del Vichada**. Informe Técnico N° 01. Convenio CORPOICA - SENA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Servicio Nacional de Aprendizaje). Septiembre de 1997. 57p.
- SANCHEZ, L.F. & COCHRANE, T.T. (1985). **Paisajes, suelos y clima de los Llanos Orientales de Colombia**. En: "Sistemas de Producción pecuaria Extensiva; Brasil, Colombia, Venezuela". Informe final del Proyecto ETES (Estudio Técnico Económico de Producción Pecuaria) 1978 - 1982. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. (eds., Raúl R. Vera & Carlos Seré). Cali, Colombia. 538p.
- SCHIAVO, G.; ROSSETTO, O.; SANTUCCI, A.; DASGUPTA, B. & MONTECUCCO, C. (1992). **Botulin Neurotoxins are Zinc Proteins**. The Journal of Biological Chemistry 207(33), 23479-23483.
- SHAPIRO, R.L.; HATHEWAY, C. & SWERDLOW, D. (1998). **Botulism in the United States. A Clinical and Epidemiological Review**. Annals of Internal Medicine 129, 221-228.
- SUGIYAMA, H. (1980). **Clostridium botulinum Neurotoxin**. Microbiological Reviews 44(3), 419-448.
- SUGIYAMA, H. (1986). **Clostridium botulinum**. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Chapter 8. (Gyles, C.L. & Thoen, C.O., eds.). Iowa State University Press, Ames. pp. 60-68.
- THOMAS, R. (1991). **Detection of Clostridium botulinum types C and D toxin by ELISA**. Australian Veterinary Journal 68(3), 111-113.
- URIBE P., 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. Santafé de Bogotá, Junio 14 de 1996. 132p.

REVISTA DE AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

Association of Botulism and Tetanus as Causative Agents of an Outbreak of Bovine Paraplegic Mortality in the Eastern Plains of Colombia

Benavides, E., Ortiz, D. & Benavides, J. (2000). *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 646-649.

E. Benavides

(2000) *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 646-649.

Association of Botulism and Tetanus as Causative Agents of an Outbreak of Bovine Paraplegic Mortality in the Eastern Plains of Colombia

EFRAÍN BENAVIDES,^a DIEGO ORTIZ,^a AND JOHANNA BENAVIDES^a

*Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria (EpiVet),
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria,
CORPOICA-CEISA, Santafé de Bogotá, Colombia*

INTRODUCTION

Soils of the Eastern Plains of Colombia are characteristically to be acidic and of low fertility with high levels of aluminum and phosphorus deficiency.¹ Three different subregions are well defined: the Piedemonte Llanero, the swampy savannas (North and left margin of the River Meta), and the well drained savannas or Altillanura. The Altillanura possesses the more restrictive edafic and climatic conditions of the region.² Since 1994, especially in the Altillanura, a dramatic increase of mortality in adult cattle has been observed. Diverse causes of bovine mortality are recognized in the region,³ but the illness that occurs as epidemic waves during the second semester of each year produces characteristic nervous symptoms, mainly paralysis of the legs in heifers and cows during pregnancy and lactation.⁴ Botulism has been suggested as the cause of the mortality;⁵ however, no laboratory in the country conducted any valid test to confirm this hypothesis. For this reason, our group started to develop methodologies to establish in Colombia the mouse neutralization test, improving our methods with time.⁶

MATERIALS AND METHODS

Samples were collected from affected animals in the region, consisting of liver, ruminal, and intestinal contents; at least 250 g for each sample.⁷ A case was defined as any number and type of sample received on a given date from a single farm, from one or more dead animals. Laboratory methods were improved with time. Initially, a basic approach was used to demonstrate toxic activity of extracts in conjunction with thermolability (period, 1995–1997) and then a mouse neutralization test⁷ was started on frozen materials that previously showed toxicity; 37 cases were studied. For the period 1998–1999 the Centers for Disease Control, Atlanta, USA (CDC) recommended protocol⁷ was established, using primarily A, C, D, and polyvalent

^aCentro de Investigación en Salud y Producción Animal, CEISA, Apartado aéreo 39144, Bogotá, Colombia. Voice: (+57-1)-3686252.
ebenavid@hemeroteca.icfes.gov.co dortizor@bachue.usc.unal.co

antitoxins; 34 cases were processed during this phase. Reference antitoxins were obtained from CDC. Samples that were negative to botulism and still toxic for mice were subjected to a neutralization test using tetanus antitoxin with reagents provided by Instituto Nacional de Salud (INS), Colombia.

RESULTS AND DISCUSSION

Results from the period 1995–1997 should be regarded as tentative (training of personnel and no possibility to repeat some tests). The second period used improved methods and these results are regarded as conclusive. During the first period, 22 cases demonstrated some toxicity for mice (see TABLE 1). Three of the cases exhibited thermostable toxic activity (they were toxic after treatment at 100°C). This is not compatible with botulism. Ten of the thermolabile cases were subjected to neutralization tests with specific botulinum antitoxins; in six of them, it was not possible to confirm a diagnosis of botulism. In three cases, specific neutralization was obtained; in El Porvenir (Puerto Gaitán) a combined activity of A, C, and D toxins was detected; a second case in Carimagua (Puerto Gaitán), showed inhibition by C and D antitoxins; and in a third case (El Retorno, San José del Guaviare), A and C toxins were detected. All the thermostable samples during this period corresponded to extracts prepared from intestinal contents.

TABLE 1. Results of biological tests in mouse for testing the toxicity of extracts, during the period 1995–1997

Type of Sample	Number of Cases ^a	Thermolabile Toxin	Thermostable Toxin	Neutralization ^b
Ruminal contents	29	17		9 (2) El Porvenir El Retorno
Liver	31	5		2 (1) Carimagua
Intestinal contents	15	4	3	
Summary per case ^c	37	19	3	10 (3)

^aA case is defined as any number and type of samples received on a given date from a single farm, from one or more dead animals. Not all cases received the same type of samples.

^bOnly ten of the cases showing toxicity in mice were subjected to neutralization with specific botulinum antitoxins using a modification of the CDC protocol. First a short test with A, C, D, and polyvalent antitoxins was used and if negative in the specific toxins, a second test was performed using B, E, F, and G antitoxins. Values in parentheses show the number of cases that were positive to botulism, the name of the locality is indicated (see text for information on type of toxin identified).

^cThe values shown under summary per case do not correspond to the sum of the number of samples since cases differed in the type of samples received. The meaning of the bottom row is that samples from 37 cases were processed, 19 of them contained a thermolabile toxic agent and 15 of the cases studied included a sample of intestinal content.

For the period 1998–1999 (see TABLE 2) 34 cases were processed. Eight cases demonstrated some type of toxicity and seven of these were thermolabile. All toxic samples were subjected to neutralization. In two cases no diagnosis was possible. In another two, neutralization was not achieved using a short protocol with antitoxins A, C, D, and polyvalent. The presence of botulism was confirmed in three cases. Two cases belonged to the same property (El Viento, Cumaribo) where toxins of *C. botulinum*, types C and D were detected. Another case (Nueva Antioquia, Puerto Carreño) was neutralized by A, C, and D antitoxins. In an additional case (Carimagua, Puerto Gaitán) tetanus toxin was detected by inhibition of the mortality in mice using tetanicus antitoxin.

Epidemiologic interpretation of these results is complicated.⁷ A negative neutralization does not necessarily imply that botulism was not involved. The toxin in extracts could be at too low a level to cause symptoms in mice, or samples may not have been appropriately managed. The quality and form of shipment of samples seems crucial in obtaining successful results. It is not a coincidence that of four positive cases during the second period, three were gathered directly by EpiVet veterinarians, and transported in a short period to the laboratory. Samples sent by others, on occasion took more than two weeks to arrive at the laboratory, sometimes without proper refrigeration and in a decomposed state. Toxins contained in these materials could have been inactivated.⁷ The study demonstrated that botulism is responsible for at least part of the mortality that occurs in the Altillanura. Tetanus toxin has not

TABLE 2. Cases processed by a biological test in mouse for preliminary diagnosis of botulism during the period 1998–1999

Type of Sample	Number of Cases ^a	Thermolabile Toxin	Thermostable Toxin	Neutralization ^b
Ruminal contents	30	3	1	3
Liver	26	4	1	5 (1) El Viento
Intestinal contents	16	2	1	3 (2) El Viento Neuva Antioquia
Feces	1	0	0	0
Summary per case ^c	34	7	1	8 (3)

^aA case is defined as any number and type of samples received on a given date from a single farm, from one or more dead animals. Not all cases received the same type of samples.

^bOnly ten of the cases showing toxicity in mice were subjected to neutralization with specific botulinum antitoxins using a modification of the CDC protocol. First a short test with A, C, D, and polyvalent antitoxins was used and if negative in the specific toxins, a second test was performed using B, E, F, and G antitoxins. (The second test could not be performed on two cases.) Values in parentheses show the number of cases that were positive to botulism, the name of the locality is indicated (see text for information on type of toxin identified).

^cThe values shown under summary per case do not correspond to the sum of the number of samples since cases differed in the type of samples received. The meaning of the bottom row is that samples from 34 cases were processed, 7 of them contained a thermolabile toxic agent and 16 of the cases studied included a sample of intestinal content.

been regarded as a food poison.⁸ The significance of findings related to tetanus toxin is unclear. A new type of toxin crossreacting with tetanus could be suggested, or alternatively, due to the high concentration of *C. tetani* spores in soils in that particular farm (unpublished observations), the animals could be suffering from an active infection with this organism after entrance through a skin lesion.

REFERENCES

1. GARCIA, D.O. 1992. Desarrollo de Sistemas de Producción de Ganado de Doble Propósito en Pastoreo bajo condiciones de la Orinoquía y Amazonía Colombianas. In: "Memorias Seminario Internacional sobre Ganadería de Doble Propósito". Centro Internacional de Capacitación Desarrollo Pecuario, CICADEP. Cartagena de Indias, Colombia, Octubre 7, 8, y 9 de 1992. 15.
2. SANCHEZ, L.F. & T.T. COCHRANE. 1985. Paisajes, suelos y clima de los Llanos Orientales de Colombia. En: *Sistemas de Producción pecuaria Extensiva; Brasil, Colombia, Venezuela*. Informe final del Proyecto ETES (Estudio Técnico Económico de Producción Pecuaria) 1978–1982. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. R.R. Vera & C. Seré, Eds.: 538–549. Cali, Colombia.
3. GARCIA, O., F.N. ZULUAGA & E. AYCARDI. 1984. Causas de Mortalidad Bovina en una Ganadería de los Llanos Orientales de Colombia. *Revista Acovez* 8(25): 39–46.
4. GARMENDIA, J.C., G.G. PACHECO & N.Y. REINA. 1993. El Síndrome Parapléjico de los Bovinos. In: "Aspectos de Sanidad Animal en áreas afectadas por el Síndrome Parapléjico del Bovino". Boletín N° 2. Programa de Cooperación Agrícola, Convenio MAC/PDVSA (Ministerio de Agricultura y Cría/Petróleos de Venezuela, S.A.). Caracas, Venezuela. 19–34.
5. URIBE, P.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 de 1996. 12.
6. BENAVIDES, O., E. ORTIZ, O.D. DUQUE, D. ESTUPIÑAN, C. ALTUZARRA & A.J. BENAVIDES. 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. First 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>>
7. HATHEWAY, C.L. 1988. Botulism. In *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases*, Vol. 1, Ch. 12. A. Balows, W.J. Hausler Jr., M. Ohashi & A. Turano, Eds.: 111–133. Springer-Verlag, New York.
8. SING, B.R., B. LI & D. READ. 1995. Botulinum versus tetanus neurotoxins: why is botulinum neurotoxin but not tetanus neurotoxin a food poison? *Toxicon* 33: 1541–1547.

**Factores de Riesgo Asociados con la Ocurrencia
del Síndrome Neuroparalítico Bovino en la
Orinoquía Colombiana**

Ortiz , D., Benavides, E. & Villamil, L. (2001 a). Informe
Quincenal Epidemiológico Nacional. 6 (15), 228-229

Factores de riesgo asociados con la ocurrencia del síndrome neuroparalítico bovino en la Orinoquia colombiana

Diego Ortiz, Efraín Benavides, Centro de Investigación en Salud Animal, Corpoica; Luis Carlos Villamil, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional; residente, Programa SEA.

Desde mediados de la década de los noventa, la ganadería bovina de la altillanura plana colombiana (Meta y Vichada) ha estado afectada por un brote de mortalidad que incide sobre las hembras adultas con síntomas relacionados con un cuadro neuroparalítico (síndrome neuroparalítico bovino, SNB), que se caracteriza porque los animales se apartan del grupo, presentan ataxia del tren anterior o posterior, micción frecuente, caminado tambaleante seguido de decúbito sin perder el apetito y mueren por paro respiratorio. Se habían sugerido diversas etiologías como causa de la enfermedad, destacándose la intoxicación por nitratos y nitritos y el botulismo bovino, las hipótesis de mayor mención previo al inicio de este estudio.

Objetivo

Caracterizar epidemiológicamente los factores que determinan la mortalidad bovina en la Orinoquia colombiana, para lograr estrategias de prevención y control que permitan disminuir las pérdidas económicas asociadas.

Diseño experimental

Entre abril y diciembre de 1998 se desarrolló un estudio epidemiológico transversal basado en una encuesta dirigida a los ganaderos de los departamentos de Vichada, Meta, Casanare y Arauca. Se tomó como unidad muestral el hato y el marco de muestreo fue el total de hatos ganaderos de la región (indeterminado). El tamaño de la muestra se determinó mediante un modelo aleatorio para detectar la enfermedad en poblaciones grandes (358 fincas). Las variables de la encuesta recolectaron información general de la explotación, el manejo de praderas, malezas, plantas tóxicas, plagas y parásitos, el estado nutricional y los planes de control sanitario. El análisis de la información estuvo basado en el uso del paquete Epilnfo y constó de la determinación de la estadística descriptiva y la evaluación de los factores de riesgo mediante tablas de contingencia y pruebas de asociación, más el uso de regresión logística.

Resultados y discusión

Se determinó que la prevalencia global de fincas fue del 35% (Arauca, 4%; Casanare, 34%; Meta, 43%, y Vichada, 36%). El reporte de consumo de huesos resultó ser el factor de riesgo que presentó mayor fuerza de asociación (razón de probabilidades (OR)=3,45; IC 95%=2,11-05,68; $p<0,001$). Este factor demostró interacción con la quema de sabana nativa en época de verano y se encontró que los valores de OR aumentan al realizar el análisis por estratos, de tal forma que las fincas que no queman la sabana nativa, tienen mayor posibilidad de presentar mortalidad asociada con el consumo de huesos por parte de los animales, (OR=11,5; IC 95%=4,1-33,5; $p<0,001$), comparado con las fincas que queman la sabana nativa en verano (tabla 1) en donde la posibilidad de presentar mortalidad asociada con el consumo de huesos es menor (OR=1,8; IC 95%=1,0-3,3; $p<0,001$).

Tabla 1. Modelo de regresión logística para explicar la asociación de factores de riesgo hipotéticos y la mortalidad por el síndrome neuroparalítico bovino en la Orinoquia colombiana.

Factores	CR (β)	EE	Z	OR	LI (OR)	LS(OR)	p
QSNVER	0,5028	0,2491	2,0186	1,65	1,014	2,694	0,0435
CONSUHU	1,1688	0,2399	4,8720	3,22	2,011	5,150	0,0001

CR: coeficiente 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; QSNVER: quema de sabana nativa en época de verano; COSUHU: consumo de huesos por parte de los

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración y participación de los médicos veterinarios que colaboraron con el desarrollo de la encuesta en el campo. Se hace un especial reconocimiento al apoyo prestado por Fernando de la Hoz por su asesoría en la ejecución de la regresión logística. El estudio fue cofinanciado por el Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria del Ministerio de Agricultura (PRONATTA) y CORPOICA.

Referencias

1. Benavides OE, Benavides AJ, Altuzarra BR, Ortiz OD, Londoño BM, Cortez GH. Botulismo bovino en Colombia: avances de investigación con relación al brote de mortalidad de bovinos en la Orinoquia colombiana, 1996-1997. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 1997;10(Supl.):152.
2. Cipagauta HM. Características nutritivas de praderas manejadas con quema en los Llanos Orientales de Colombia. *Revista ICA* 1993;2(3):253-63.
3. Dean A, Dean J, Burton A, Dicker R. *Epilnfo, versión 5. Epidemiología con microordenadores*. Sevilla (España): Departamento de Evaluación de la Salud; 1992.
4. Hatheway CL. Botulism. En: Balows A, Hausler Jr. WJ, Ohashi M, Turano A, editors. *Laboratory diagnosis of infectious diseases*. New York: Springer-Verlag; 1988. p.111-33.
5. Martin SW, Meek AH, Willebreg P. *Epidemiología veterinaria: principios y métodos*. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A.; 1997.
6. Otte J. El diseño de investigaciones epidemiológicas. Proyecto colombo-alemán: Introducción de un sistema de asistencia técnica integral pecuaria, GTZ, ICA, UNISALLE. Santafé de Bogotá, Colombia: Centro Internacional de Capacitación en Desarrollo Pecuario, CICADEP; 1991.
7. Parra J, Olarte F, Barrera J, Acevedo L. Mortalidad bovina en la altillanura del Vichada. Informe técnico No. 01. En: Jaramillo CA, editor. Programa regional de métodos de transferencia de tecnología. Villavicencio (Meta): Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA, regional Meta y Orinoquia; 1997.
8. Thrusfield M. *Epidemiología veterinaria*. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S.A.; 1990.

**Etiología, Epidemiología y Alteraciones Clínico –
Patológicas Asociadas con el Síndrome
Neuroparalítico Bovino en la Orinoquía
Colombiana**

Ortiz , D., Benavides, E. & Villamil, L. (2001 b). Informe
Quincenal Epidemiológico Nacional. 6 (15), 224-226

1997;2:93-4.

Programa de Servicio de Epidemiología Aplicada

VI Encuentro de Epidemiólogos de Campo

13 de agosto de 2001

Trabajos presentados, resúmenes

Etiología, epidemiología y alteraciones clínico-patológicas asociadas con el síndrome neuromuscular bovino en la Orinoquia colombiana

Diego Ortiz, Efraín Benavides, Centro de Investigación en Salud Animal, Corpoica; Luis Carlos Villamil, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional; residente, Programa SEA.

En un estudio epidemiológico relacionado con el brote de mortalidad bovina que ha venido ocurriendo en la Orinoquia (síndrome neuromuscular bovino, SNB), se determinó que la frecuencia de fincas afectadas era del 35% y que su presencia estaba asociada con el consumo de hueso por parte de los animales (motivado por las intensas deficiencias minerales de la región), pero también con el tipo de manejo dado a las praderas (quemadas). Aunque las asociaciones encontradas en ese estudio previo permiten sugerir algunas etiologías como causantes del SNB, se requiere determinar con precisión el cuadro clínico patológico y la causa de esta afección.

Objetivo

Estudiar y caracterizar clínica y epidemiológicamente el patrón temporo-espacial de ocurrencia de la enfermedad y los factores que determinan la mortalidad bovina en la Orinoquia colombiana asociada con el SNB, para lograr estrategias de prevención y control que permitan disminuir las pérdidas económicas asociadas.

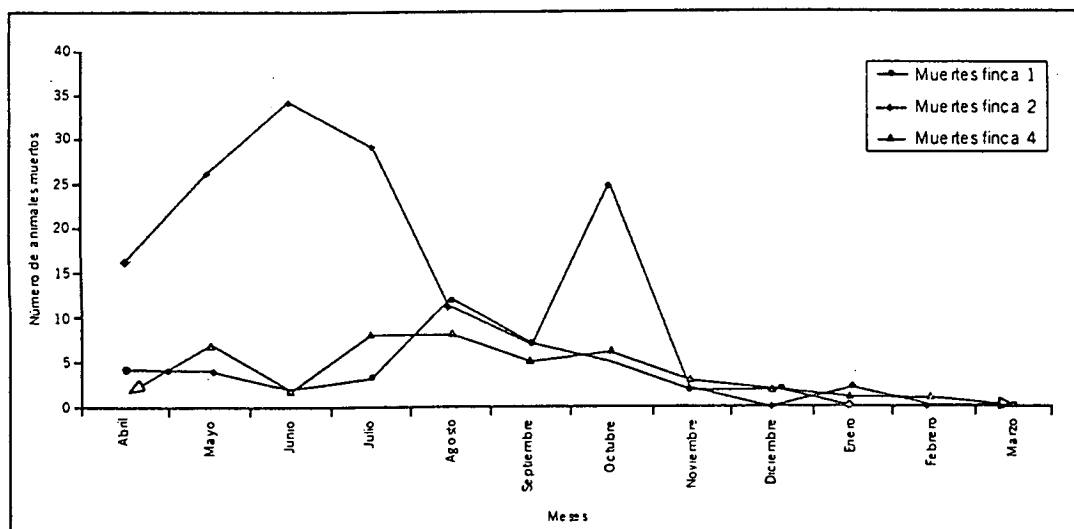
Diseño experimental

Se desarrolló un estudio epidemiológico prospectivo de un año de duración (abril/1998, marzo/1999) en cuatro fincas del departamento del Meta, ubicadas en la altillanura plana. En cada una de ellas se recolectó información y muestras biológicas, tanto de animales naturalmente afectados por la enfermedad (casos incidentes) como de controles, consistentes en animales sanos de la misma finca, correspondientes al mismo grupo de edad y de condición fisiológica de los afectados. Con base en información complementaria, se estudiaron los factores de riesgo asociados con el SNB. El estudio incluyó 39 animales naturalmente afectados entre los 2 y 8 años de edad. Las muestras biológicas incluyeron necropsias, análisis histopatológico de los tejidos, pruebas de hematología, química sanguínea, inmunofluorescencia indirecta para hemoparásitos, inmunofluorescencia directa para rabia, bioensayos en ratones y pruebas de neutralización para detectar la presencia de neurotoxinas botulínicas en extractos de tejidos. Se cuantificaron los niveles de nitratos y nitritos en los suelos y pastos y se correlacionaron los hallazgos con la mortalidad bovina. El análisis estadístico se basó en el estudio de los factores de riesgo mediante tablas de contingencia y pruebas de asociación con el apoyo del paquete Epi Info.

Resultados y discusión

Se demostró que el grupo de edad en mayor riesgo eran las hembras mayores de 2 años de edad (novillas, vacas en gestación, vacas lactantes y vacas horras), de buena condición corporal principalmente de la raza cebú, sometidas a deficiencias minerales. La mortalidad ocurre principalmente en épocas de lluvia (figura 1). La tasa anual de mortalidad global encontrada para estas fincas fue de 7,8, mientras que la tasa anual de mortalidad (tasa de ataque) por el SNB en hembras mayores de 2 años fue de 12,7. Se demostró que factores como los hemoparásitos, la rabia, los nitratos y los nitritos no estaban asociados con la mortalidad por SNB. Por otra parte, se comprobó en el laboratorio - por primera vez en Colombia -, utilizando pruebas de seroneutralización aceptadas por la comunidad científica, la presencia de neurotoxinas botulínicas tipo C y D, como etiología de esta enfermedad; hallazgo consistente con el cuadro clínico y con los resultados epidemiológicos.

Figura 1. Distribución mensual de la mortalidad de bovinos en 3 fincas de la Orinoquia colombiana, sometidas a seguimiento en el estudio epidemiológico longitudinal.



Agradecimientos

Los autores expresan especial reconocimiento a los propietarios de las fincas participantes en el estudio. El estudio fue cofinanciado por el Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria del Ministerio de Agricultura (PRONATTA) y CORPOICA.

Referencias

1. Benavides E, Ortiz D, Benavides J. Association of botulism and tetanus as causative agents of an outbreak of bovine paraplegic mortality in the Eastern Plains of Colombia. En: House JA, Kocan KM, Gibbs PJ, editors. Tropical veterinary diseases. Control and prevention in the context of the New World Order. Ann NY Acad Sci 2000;916:646-9.
 2. Dean A, Dean J, Burton A, Dicker R. Epi Info. versión 5. Epidemiología con microordenadores. Sevilla (España): Departamento de Evaluación de la Salud; 1992.
 3. Hatheway CL. Botulism. En: Balows A, Hausler Jr. WJ, Ohashi M, Turano A, editors. Laboratory diagnosis of infectious diseases. New York: Springer-Verlag; 1988. p.111-33.
 4. Martin SW, Meek AH, Willebreg P. Epidemiología veterinaria: principios y métodos. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A.; 1997.
 5. Sabino L, editor. Paquete tecnológico contra el síndrome parapléjico bovino. Programa de Cooperación Agrícola, convenio MAC/PDVSA. Síndrome parapléjico de los bovinos y mejoramiento integral de la ganadería. Refolit, C.A.; 1992.
-

**Epidemiología, Diagnóstico y Control del
Botulismo Bovino en Colombia.**

Ortiz , D. & Benavides, E. (2002). Carta Fedegan 77,
(Anexo coleccionable), 162-174.



Epidemiología, Diagnóstico y Control del Botulismo Bovino en Colombia¹

Diego Ortiz Ortega & Efraín Benavides O.²

Resumen

Se presenta una breve síntesis del conocimiento acumulado sobre la epidemiología del Botulismo Bovino en rumiantes en pastoreo en sabanas tropicales, con énfasis en una descripción de la situación colombiana. Se destaca que el botulismo en estas especies es una intoxicación alimentaria, no un proceso infeccioso y que su presencia esta determinada por la pobreza mineral de los suelos. Se describen los adelantos del Programa Nacional de Salud Animal de CORPOICA en cuanto a los procesos de laboratorio, aceptados por la comunidad científica, que permitieron la confirmación diagnóstica de los tipos de toxina actuantes en nuestros campos; pero también se discute la importancia de los estudios epidemiológicos desarrollados, que aportan en la identificación de factores de riesgo y características de su presentación. Finalmente, se examinan las diversas alternativas de control que es necesario implementar para controlar las pérdidas económicas asociadas con esta enfermedad.

¹ Una versión resumida de este documento fue publicada en Carta FEDEGAN 77, Diciembre de 2002. Se ha re-editado para el público para el evento "El Botulismo en Bovinos, Historia, Causas y Recomendaciones de Manejo". Villavicencio, junio 26 de 2003. Programa Nacional de Investigación en Salud Animal, CORPOICA – Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, PRONATTA.

² Respectivamente, Médico Veterinario, MSc., Investigador Adjunto y Médico Veterinario, MSc., PhD. Investigador Principal. Programa Nacional de Investigación en Salud Animal. Centro de Investigación en Salud Animal, CEISA. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Avenida El Dorado No. 42 – 42 Bogotá D.C., Colombia. Email: ortorte@andinet.com; ebenavid@andinet.com.



1. Introducción.

En las sabanas tropicales del mundo, donde impera la ganadería extensiva, la presencia de casos de mortalidad del ganado se convierte en una importante restricción para la adecuada productividad de los sistemas de producción ganaderos. Aunque la presencia de casos de mortalidad en el ganado, generalmente es un indicio de algún tipo de desequilibrio ambiental, diversos agentes; bacterianos, virales, parasitarios o tóxicos; se han asociado como causa de esas muertes. Dadas las características clínicas de presentación de la enfermedad en el campo, generalmente los productores le asignan nombres comunes (ejemplo “Peste Rayo” o “enfermedad de las bonitas”) que describen la forma típica de presentación de la enfermedad. Esta descripción es valiosísima para los epidemiólogos veterinarios, ya que permite orientar los esfuerzos para la confirmación diagnóstica en el laboratorio y por ende, permite un mejor uso de los siempre escasos recursos.

El botulismo es una de las enfermedades que se incluye dentro de las causas de muerte súbita del ganado, es decir ese cuadro clínico en el que repentinamente el animal cae y muere relativamente rápido, no dando lugar a la observación de síntomas clínicos. En condiciones de ganadería extensiva, muchas enfermedades se incluyen en este grupo, dadas las dificultades para el manejo y observación cercana del ganado. Pequeños detalles acerca del comportamiento de los animales o signos clínicos previos a la muerte, son entonces un apoyo importante en la clarificación diagnóstica.

El botulismo bovino, con su característica sintomatología neuroparalítica, siempre se ha asociado con situaciones de mortalidad del ganado en sabanas tropicales, particularmente de animales adultos de buena condición. Se trata de una parálisis motora, rápidamente mortal causada por la ingestión de toxinas de la bacteria anaerobia esporulada *Clostridium botulinum*; este microorganismo prolifera en los tejidos animales en descomposición y a veces en materiales vegetales (Blood, Radostits & Henderson, 1986); en condiciones favorables de temperatura y humedad la bacteria se multiplica rápidamente y produce una toxina altamente mortal y relativamente estable, que al ingerirse produce la enfermedad. El cuadro clínico característico consiste en parálisis muscular progresiva que afecta los músculos de extremidades, mandíbulas y garganta; comienza el cuadro por debilidad, temblores y fasciculaciones musculares, principalmente de extremidades posteriores, el que luego progresa a las anteriores, cabeza y cuello.

El botulismo es una intoxicación alimentaria que causa enfermedad neuroparalítica en el hombre y en diversas especies animales; existen en la naturaleza ocho distintos tipos de neurotoxina botulínica (Hatheway, 1988), los que se han identificado con base en diferencias antigénicas (denominadas: A, B, C α , C β , D, E, F y G). Las esporas del *C. botulinum* se encuentran normalmente en los suelos y sedimentos acuíferos de la mayoría de regiones del mundo, pero generalmente se acepta que el botulismo ocurre únicamente si las esporas tienen la capacidad de germinar en los alimentos, dando lugar al crecimiento bacteriano y a la subsecuente producción de toxina botulínica; la bacteria es un anaerobio obligado, es decir no puede crecer en presencia de oxígeno (Hatheway, 1990).



La epidemiología del botulismo se entiende a partir de la comprensión de la historia natural de la bacteria en el suelo ya que éste es su hábitat natural. En su forma vegetativa el organismo es residente común del aparato digestivo de los herbívoros y puede llegar a nuevas áreas siguiendo esta vía. Una vez fuera del organismo, la bacteria posee la capacidad de producir formas resistentes a las adversidades ambientales; las esporas. Para una mejor comprensión de la situación, es necesario describir al grupo de organismos patógenos de los animales conocidos como “bacterias asociadas al suelo” (Seifert *et al.*, 1996).

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*. La familia de las bacterias del género *Clostridium* es un grupo poco homogéneo, de organismos bastante diferentes, siendo igual de inconsistente el complejo de enfermedades que ellas causan, los que se agrupan bajo el denominador común de “Clostridiosis”, mientras las bacterias que hacen parte de este grupo se refieren comúnmente como los “Clostridios”. Estos son organismos saprofitos, de vida libre, distribuidos ampliamente en el suelo, aunque con algunas diferencias en regiones geográficas, cierto número de especies ocurren naturalmente en el tracto digestivo de animales y del hombre (Carter & Chengapa, 1991).

Por su parte, *Bacillus anthracis* es el agente causal del Carbunco, “Carbón bacteridiano” o “Peste Rayo”, se trata de una enfermedad caracterizada por septicemia y muerte repentina con exudación de sangre oscura por los orificios corporales. Esta bacteria posee la capacidad de esporular al ser expuesta al aire y se ha demostrado que las esporas pueden sobrevivir en el suelo por décadas bajo condiciones favorables.

Los clostridios se pueden agrupar de acuerdo al tipo de afección que ocasionan en los animales y el hombre (Hatheway, 1990), en:

- Las enterotoxemias, generalmente asociadas con *Clostridium perfringes*, aunque *Clostridium septicum* algunas veces causa infección gástrica en ovejas. Incluye la disentería de los corderos y la enfermedad del riñón pulposo en ovejas.
- Las infecciones tisulares, las cuales causan una multitud de síndromes en animales domésticos, agrupados bajo el nombre de “Carbones”, los que incluyen la gangrena gaseosa (mionecrosis con evolución de gas y toxemia), la pierna negra y el edema maligno en diversas especies animales, particularmente en bovinos. Las especies generalmente involucradas son *Clostridium chauvoei*, *C. septicum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium haemolyticum* y *Clostridium sordelli*. La patogénesis es similar para todas estas patologías, las bacterias normalmente presentes en los tejidos o introducidas de modo traumático, se multiplican y producen toxinas en el tejido traumatizado, las toxinas crean una lesión local y son absorbidas al torrente sanguíneo causando toxemia (Gyles, 1986).



- Las neurotoxicosis, asociadas con la actividad en el organismo de las neurotoxinas producidas por *Clostridium tetani* y *C. botulinum*. Estas toxinas pueden ingerirse preformadas como ocurre en la mayoría de casos de botulismo (Hatheway, 1988) o ser el resultado del crecimiento de las bacterias en alguna parte del cuerpo, tal como ocurre en el caso del tétano (Bizzini, 1986).

Para el caso de cualquiera estos grupos, la patogénesis y epidemiología de la enfermedad, su diagnóstico, lo mismo que su prevención, se basan en un adecuado conocimiento de: la bacteria, su capacidad de producción de toxinas y la influencia de múltiples factores desconocidos, la mayoría de ellos relacionados con el ambiente o con el manejo de los animales en las fincas; aspectos que para ser determinados requieren de estudios epidemiológicos adecuadamente diseñados. Condiciones locales 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 la enfermedad; mientras el tratamiento es raramente efectivo, la utilización de vacunas específicas (bacterinas o toxoides), generalmente ha conducido a adecuados niveles de control (Blood, Radostits & Henderson, 1986).

La primera descripción de la ocurrencia del botulismo en el territorio nacional se remonta a la década del setenta, cuando el Programa de Salud Animal del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1978), indicó en su informe anual la presencia de casos de botulismo en inmediaciones del Centro experimental Carimagua, donde se describió textualmente: “El bajo contenido de fósforo de estos suelos tropicales y de las gramíneas nativas, también conduce a la condición denominada “pica” o apetito desmedido, la cual predispone a los animales al botulismo, una condición tóxica que, sin lugar a dudas, produjo la muerte a varios animales en este año ...”. La ocurrencia de esta enfermedad en la región era aparentemente esporádica.

Por factores que aun no se han explicado completamente, esta enfermedad tomó características epidémicas en la Altillanura plana de la Orinoquía a mediados de la década del noventa (Uribe, 1996). Esto causó la movilización de diversos sectores e instituciones buscando brindar una óptima respuesta ante esta problemática. Lo que sigue en este artículo, es una descripción resumida de aspectos de epidemiología y diagnóstico del botulismo; del conocimiento de su situación en el país y de las estrategias para el control de las pérdidas económicas asociadas con la presencia de esta enfermedad.

2. Epidemiología y diagnóstico de botulismo en rumiantes

Las esporas de *C. botulinum* son muy resistentes y sobreviven durante mucho tiempo bajo las circunstancias ambientales más variadas; sí bien los cadáveres de animales muertos por botulismo son la fuente más común de toxina, el microorganismo puede también proliferar en material vegetal en descomposición. La toxina una vez producida es capaz de sobrevivir por



largos períodos, sobretodo al interior de los huesos o cuando se la protege de alguna manera de la lixiviación (Blood, Radostits & Henderson, 1986). La fuente de infección para los animales es casi siempre la carroña y productos descompuestos procedentes de animales silvestres, domésticos y de aves. Los bovinos contraen el botulismo en dos formas, o comiendo cadáveres y huesos contaminados con la toxina botulínica que encuentran abandonados o por el consumo de heno contaminado con la neurotoxina. La enfermedad suele adoptar la forma de brote en regiones deficientes en fósforo, donde el ganado desarrolla osteofagia (alotriofagia, conducta de consumir alimentos diferentes a los de su dieta normal) para buscar suplir sus deficiencias.

Se debe resaltar entonces, que el botulismo no es una enfermedad infecciosa, sino una intoxicación alimentaria, que afecta principalmente a vacas en gestación y lactantes de buena condición en regiones deficientes en fósforo. Cuando muere un animal que alberga en su flora normal del tracto digestivo *C. botulinum*, todo su organismo llega a ser invadido por estas bacterias, resultando en gran producción de toxina. En consecuencia, la ingestión de una pequeña cantidad de material tóxico de este cadáver o unas pocas migajas de músculo adheridas a un hueso puede llegar a ser mortal. 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 el animal muerto constituye un peligro especial para los otros animales de la manada, especialmente en zonas deficitarias en fósforo. Se forman también muchas esporas que contaminan densamente el suelo por debajo y alrededor del cadáver (De Souza & Langenegger, 1987).

La enfermedad se conoce en Africa del Sur como “Lamsiekte” (en Africander, enfermedad de la cojera); en Australia como “parálisis bulbar” o “enfermedad de la costa o de la caída” y en Senegal como “Gniedo”, “enfermedad de los estanques profundos”. El botulismo contraído por el consumo de heno se denomina corrientemente “intoxicación del forraje” (Smith, 1977). En Venezuela se reconoce como el “Mal de Agüapey” o “Enfermedad de las Bonitas”.

El botulismo no tiene límites geográficos, se observan brotes esporádicos en casi todos los países, sin embargo su importancia económica es notable en regiones deficientes en fósforo (Blood, Radostits & Henderson, 1986) y 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. La deficiencia nutricional se refleja en que los animales tienden a consumir huesos o cadáveres (figura 1). Esta razón explica porqué el botulismo bovino se presenta en mayor proporción en animales de producción (vacas lactantes, animales gestantes), de muy buena condición corporal (Ortiz, 2000).

2.1. Cuadro clínico y hallazgos de patología

La deficiencia de fósforo se caracteriza por pica (alotriofagia), retardo en el desarrollo, infecundidad y en las últimas etapas osteodistrofia, o en otras palabras, reblandecimiento de los huesos (Blood, Radostits & Henderson, 1986); la deficiencia primaria por este elemento es común en sabanas y selvas de América Tropical. Como evidencia de este tipo de deficiencia, en las fincas se cuenta con la comprobación de la conducta de alotriofagia o el hallazgo de objetos extraños (piedras, huesos, etc.) en la panza, en casos de necropsia o matadero.

Los primeros signos de botulismo aparecen tres a siete días después de haber tenido contacto los animales con el material tóxico, pero el período de incubación se acorta acorde a la cantidad de toxina. Pueden existir casos hiper agudos con muerte súbita real, sin ningún tipo de síntomas. En casos agudos, los animales inician por rehusarse a comer o beber, seguido de parálisis muscular progresiva ascendente, representada por andar tambaleante, debilidad del tren posterior, seguida de caída del animal y muerte algunos días después en medio de dificultad respiratoria. En la mayoría de los casos la enfermedad es sub aguda, los pacientes presentan inquietud, incoordinación, marcha insegura y ataxia, seguidos de incapacidad para levantarse o erguir la cabeza, sin pérdida de la sensibilidad cutánea. La muerte ocurre en medio de parálisis respiratoria y los animales conservan la conciencia hasta el final. Se han descrito casos leves (Blood, Radostits & Henderson, 1986), con inquietud, dificultades respiratorias y falta de disposición para levantarse, que pueden presentar curación en tres o cuatro semanas.



Figura 1. Evidencia de consumo de huesos por parte de bovinos adultos en la altillanura, como factor predisponente para la intoxicación por Botulismo (Foto: Benavides, E. & Ortiz, D., 1996).



Las lesiones patológicas halladas en casos de botulismo son escasas, salvo la presencia de cuerpos extraños en los estómagos y ocasionalmente el hallazgo de una vesícula biliar pletórica. Histológicamente se ha descrito la hiperemia de vasos sanguíneos con dilatación edematosa de espacios perivasculares y hemorragias perivasculares, con desmielinización en medula oblonga (France, 1989). Sin embargo estos cambios patológicos no explican los síntomas observados en los animales y pueden tratarse de lesiones subyacentes, relativamente comunes en ganado de la región (Ortiz & Benavides, 2002).

2.2. Confirmación diagnóstica

Dada la diversidad de toxinas botulínicas existentes en la naturaleza, la confirmación diagnóstica debe ir dirigida a determinar el (los) tipo (s) de toxina actuantes en el campo. El método aceptado por la comunidad científica es la prueba de sero neutralización en ratón utilizando anti-toxinas de referencia (Hatheway, 1988); sin embargo se han descrito métodos alternos, tales como el uso de pruebas inmuno - enzimáticas (ELISA) (Gregory *et al.*, 1996) o una prueba de fijación de complemento (Dutra *et al.*, 1993).

El diagnóstico de botulismo utilizando la prueba de neutralización es un proceso complejo; primero, debe buscarse extraer la toxina a partir de fluidos y materiales biológicos de animales afectados; segundo, se debe demostrar que esos extractos inducen signos de naturaleza neuromuscular en animales experimentales (ratones); y tercero, tal toxicidad debe ser inhibida con el uso de antitoxinas de referencia (Hatheway, 1988).

Las muestras de elección para el diagnóstico son suero sanguíneo, contenido ruminal, contenido intestinal e hígado de animales afectados, enviando como mínimo 250 gr. de muestra, la que debe ser obtenida de animales sacrificados o recientemente muertos, que no presenten descomposición (muestras deben enviarse refrigeradas, 5-8° C, empacadas en bolsas estériles y debidamente rotuladas). La prueba biológica se realiza inoculando ratones de 25 - 40 g por vía intraperitoneal, con los extractos y observando la posible presentación de síntomas hasta por 96 horas. Los signos característicos de botulismo en ratones son: debilidad pronunciada en los cuartos traseros, acompañada de bajo tono de los músculos abdominales con presencia de un signo denominado **abdomen encintado** (figura 2), dificultad respiratoria y finalmente muerte de los animales que ocurre entre 24 y 48 horas posterior a la inoculación experimental (Hatheway, 1988).

El diagnóstico se confirma cuando la toxina en el extracto es neutralizada por una antitoxina específica. La prueba es bastante sensible, permitiendo detectar niveles de toxina menores que 5 DL50/ml en muestras biológicas; pero tiene varios inconvenientes, entre ellos, el gran número de animales de laboratorio requeridos, la tardanza para obtener los resultados y la probabilidad de muerte inespecífica de los ratones, debida a interferencia de otras sustancias que pueden ser letales o influenciar la neutralización de las toxinas.

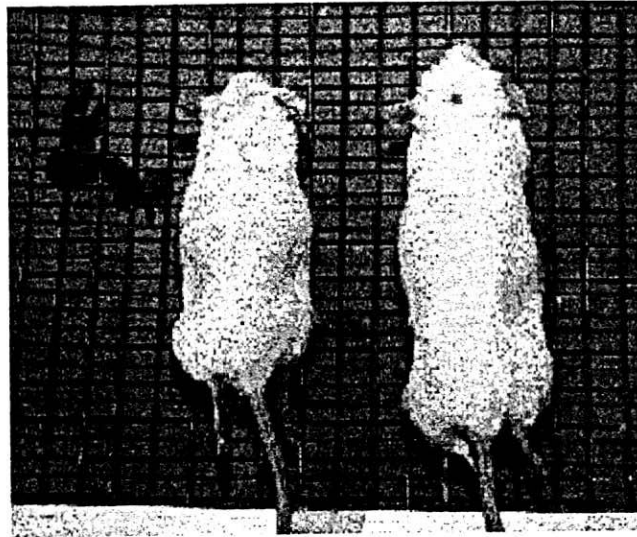


Figura 2. Prueba Biológica de la actividad de Toxinas botulínicas en ratón. Desarrollo de síntomas de Neurotoxicidad y Paraplegia en ratones inoculados experimentalmente, demostrando el típico signo de Abdomen Encintado, correspondiente a parálisis de los músculos inter costales (Foto: Benavides, E. & Ortiz, D., 1998).

Por otra parte, una prueba biológica negativa no excluye la presencia de botulismo, dado que la toxina no es detectable en los casos promedio de animales de granja (Blood, Radostits & Henderson, 1986), debido entre otros factores, al tiempo de incubación entre ingestión de toxina y desarrollo de los síntomas; y en casos subagudos cuando el animal está postrado por varios días, porque la toxina circulante ya no existe en los tejidos recolectados. Por esto se ha recomendado (Hatheway, 1988), que la investigación sobre botulismo sólo sea llevada a cabo en un número limitado de laboratorios de referencia. Muchos laboratorios, aún del nivel regional, pueden trabajar durante años sin encontrar un sólo espécimen positivo. La interpretación adecuada de resultados requiere de gran experiencia acumulada, tanto con especímenes negativos como positivos. Un laboratorista experimentado podrá reconocer signos de botulismo en ratón y generalmente podrá diferenciarlos de otros efectos tóxicos no asociados a botulismo; la experiencia indica que debe tenerse cuidado con los reportes tempranos, los cuales deben ser siempre tomados como provisionales. Las pruebas deben repetirse hasta donde sea posible y demostrar que los resultados son consistentes (Hatheway, 1988).

En el campo, un diagnóstico tentativo del botulismo se basa en la presencia de sintomatología neuromotriz (parálisis motriz progresiva) y su relación con la conducta de alotriofagia en praderas pobres en fósforo; o por otros tipos de evidencia epidemiológica, como el hallar



animales muertos en heno o silos. El diagnóstico diferencial debe incluir, la paresia obstétrica de los bovinos (fiebre de leche), la Rabia paralítica bovina, la encefalomielitis asociada a herpesvirus y diversas intoxicaciones por vegetales (Blood, Radostits & Henderson, 1986).

2.3. Laboratorio de bacterias asociadas al suelo del CEISA y el proceso de diagnóstico

Ante la epidemia de mortalidad en la Orinoquía, en 1994 el laboratorio de **Bacterias asociadas al suelo** del Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria (Hoy Salud Animal) inició el desarrollo de protocolos de laboratorio para la confirmación diagnóstica de botulismo en Colombia; se importaron inmuno reactivos de referencia del CDC (Centre for Disease Control, Atlanta, USA) y se procedió al entrenamiento del personal en el desarrollo de los protocolos de laboratorio requeridos en este proceso. De esta manera, por cerca de tres años, entre 1996-1999, nuestro grupo de trabajo condujo para el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, a modo de pruebas tarifadas, una serie de procesos de laboratorio para apoyar el desarrollo de las actividades oficiales sobre botulismo en el país (Huertas, Brito & Cárdenas, 1999).

Dado el complejo proceso de interpretación de los resultados de las pruebas de laboratorio, se conformó un comité técnico que cada semana examinaba los resultados alcanzados en las pruebas biológicas de la semana anterior y tomaba decisiones sobre los procesos a desarrollar para cada caso en la semana siguiente. Un diagrama del esquema de seguimiento de casos se presenta en la figura 3. El proceso de cada caso puede tomar entre 3 - 6 semanas y en ocasiones mayor tiempo, si se presentan resultados conflictivos que exijan la repetición de las pruebas.

Flujograma del Proceso de Muestras en el Laboratorio para el Diagnóstico de Botulismo.

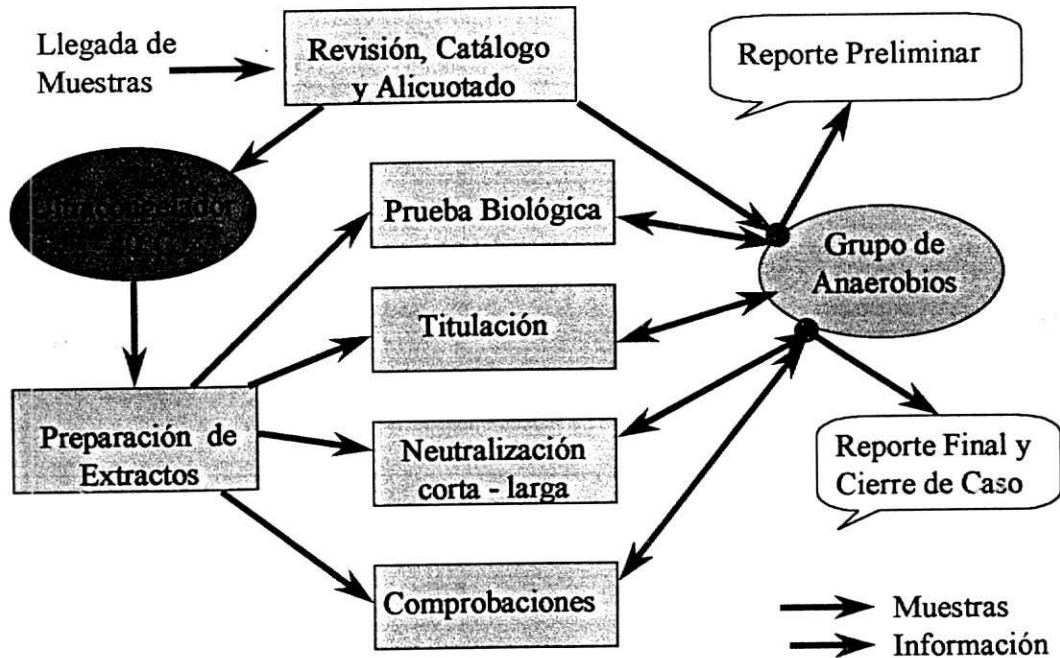


Figura 3. Diagrama del Proceso de muestras en el laboratorio para el diagnóstico de Botulismo, utilizando la Prueba Biológica en Ratón y Pruebas de Seroneutralización. Se indican los niveles de toma de decisiones. Programa de Salud Animal, CORPOICA - CEISA.

3. Experiencias colombianas

Luego del reporte de CIAT (1978) sobre la presencia de botulismo en la Orinoquía, la comunidad veterinaria nacional había prácticamente olvidado esta posibilidad diagnóstica, hasta que Uribe (1996) recordó el hecho con relación a la epidemia en la Altillanura en la década pasada. A partir de sus experiencias en la Orinoquía, el segundo autor de este documento rememora el haber atendido varios casos de Mortalidad, con sintomatología compatible con Botulismo (aunque en su momento, no recordamos la posibilidad etiológica) en el Vichada, el primero en Santa Rosalía en 1984 y el segundo en Nueva Antioquia en 1992 (figura 4); casos en los que aunque no fue posible concluir el diagnóstico, sí brindan indicios de que la enfermedad se hallaba presente en la región, de forma esporádica.



Figura 4. Caso de muerte súbita del ganado en el Municipio de Nueva Antioquia (Vichada) en el año de 1992 (Foto: Benavides, E., 1992).

A mediados de la década del noventa en la altillanura del Meta y Vichada se presentó un incremento de la mortalidad de bovinos adultos, caracterizada porque afectaba de forma preferencial a vacas en gestación y lactantes de buena condición, con la presencia de signos clínicos de naturaleza neuromuscular (Uribe, 1996; Ortiz, 2000), presentando los animales una parálisis ascendente, representada por andar tambaleante, debilidad del tren posterior, seguida de caída del animal y muerte algunos días después en medio de dificultad respiratoria. Desde un inicio se asoció el consumo de huesos por parte de los animales, con el desarrollo de sintomatología³; destacándose que los ganaderos fácilmente identificaban la enfermedad una vez la habían visto dos o tres veces, gracias a las características de los síntomas observados en los animales.

³ BARRERA, J. & ESTRADA, A. (1994). Informe Institucional de visita al municipio de la Primavera departamento del Vichada, para atender un caso de mortalidad del ganado. Centro de Diagnóstico Veterinario, Villavicencio, Meta. CORPOICA y División de Sanidad Animal ICA. 5 p.

Diversas instituciones se movilizaron para tratar de buscar soluciones, incluyendo investigadores particulares (Uribe, 1996), el ICA (Huertas, Brito & Cárdenas, 1999) y CORPOICA (Parra *et al.*, 1997; Ortiz, 2000). Debido a su asociación con el consumo de huesos, el botulismo bovino fue sugerido como causa de la enfermedad (Uribe, 1996). Como se describió arriba, nuestro grupo de trabajo, contribuyó con el desarrollo de protocolos y metodologías de laboratorio para la confirmación diagnóstica de los tipos de toxina actuantes en el campo (Benavides, Ortiz & Benavides, 2000), utilizando métodos de diagnóstico aceptados por la comunidad científica (Hatheway, 1988); pero también 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, Benavides & Villamil, 2001a; Ortiz, Benavides & Villamil, 2001b).

En su informe final de un proyecto sobre la mortalidad en la región, Uribe (1996) concluyó que los animales se encontraban en una situación crítica respecto a sus balances minerales: en la mayoría de los casos solamente encontraban un tipo de pasto para consumir, las sales mineralizadas que se les ofrecían no copaban sus exigencias en minerales, vivían en potreros muy bien cercados y no existían fuentes naturales donde podían saciar sus instintos nutricionales. Bajo estas condiciones afirmaba que el animal desarrollaba “pica”, “malacia” o “depravación del gusto”, cuando según parece era un intento natural del animal por compensar un error humano al no interpretar correctamente sus tendencias compensatorias naturales. Sin embargo, este estudio no incluyó un esfuerzo formal para comprobar los tipos de toxina implicados en la mortalidad.

Los esfuerzos realizados en nuestro laboratorio permitieron comprobar de forma inequívoca la actividad de neurotoxinas de *Clostridium botulinum* Tipos A, C y D (Botulismo bovino) en casos de enfermedad neuromuscular del ganado de la altillanura (Benavides, Ortiz & Benavides, 2000); en el período 1995-1997 se procesaron muestras de 37 casos de mortalidad, de los cuales 22 demostraron alguna toxicidad para ratón, pero en sólo tres de ellos se comprobó la presencia de toxinas botulínicas; por su parte, durante el período 1998-1999 se procesaron 34 casos de los cuales ocho demostraron actividad tóxica y botulismo fue confirmado en tres ocasiones. Esto es una indicación de la complejidad del proceso de diagnóstico. Se demostró además la actividad de toxinas de *C. tetani*, causante del tétano, en algunos casos en que la toxina presente no era inhibida por el calor (termolabilidad).

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, Benavides & Villamil, 2001b) desarrollada en los cuatro departamentos de la Orinoquía (Meta, Vichada, Arauca y Casanare), se determinó que el porcentaje de fincas afectadas por el Síndrome Neuromuscular Bovino (SNB) fue de 35%, con mayor frecuencia de ocurrencia en los departamentos localizados en el margen derecho del río Meta. El reporte de consumo de huesos por parte de los animales se destacó como el factor de riesgo con mayor fuerza de asociación, con un riesgo de enfermedad 3,5 veces mayor (Límites de confianza 2,1 - 5,7) en fincas que reportaban este evento. Se demostró que fincas que no quemaban la sabana nativa en verano, poseían mayor probabilidad

de presentar este tipo de mortalidad. Esta información dio base a la recomendación práctica de enterrar y/o quemar los animales afectados para disminuir la diseminación de esporas (ver figura 4) y de mejorar el suministro de sal mineralizada, como una manera de combatir la alotrofagia por parte de los animales.



Figura 5. Vaquero de la zona, enterrando un cadáver de animal muerto por el S.N.B, acorde a las recomendaciones. Observe el tipo de fosa utilizado.

Un segundo estudio epidemiológico realizado (Ortiz, Benavides & Villamil, 2001a), se trató de una investigación prospectiva longitudinal de un año de duración, que utilizaba un diseño de estudio de casos y controles (Pereira & Armenian, 1991) en cuatro fincas de la altillanura plana. Se demostró que el grupo en mayor riesgo de sufrir la enfermedad eran las hembras mayores de dos años de edad (novillas, vacas en gestación, vacas lactantes y horras), de buena condición corporal; la tasa de mortalidad por SNB para vacas mayores de dos años de edad fue de 12,7. Los resultados indicaron que la mortalidad se presenta principalmente en épocas de lluvia y concuerda con los máximos picos de precipitación pluvial (Ortiz, 2000).

Se demostró además que el consumo de hueso estaba relacionado con deficiencias minerales principalmente calcio (Ortiz, 2000); los niveles de este mineral difirieron significativamente



entre los animales afectados (caso) y los controles, siendo el valor promedio en los primeros de 5,1 mg/dl, el cual se considera extremadamente bajo. Este tipo de estudio permitió además el levantamiento de datos sobre los cambios histopatológicos asociados con esta enfermedad (Ortiz & Benavides, 2002); la presencia de cuerpos extraños en rumen y retículo fue el hallazgo macroscópico más frecuente. Se confirmó que el botulismo bovino no produce alteraciones microscópicas de valor, pero se detectó como hallazgos importantes; la presencia de cambios en Sistema Nervioso Central (SNC) asociados a neurotoxicidad retardada por pesticidas, la degeneración grasa del hígado, acompañada en ocasiones de megalocitosis, la degeneración de Zenker en músculo cardíaco y la presencia de esquizontes de *Sarcocystis bovis* insertados en el músculo cardíaco. Se destaca el hecho, que ninguna de estas alteraciones explicaba la sintomatología de naturaleza neuromuscular observada en los animales, sino que posiblemente se trataba de hallazgos patológicos de eventos que posiblemente son comunes en la región.

Con referencia a los estudios desarrollados por otros grupos de trabajo, en el boletín técnico sobre botulismo producido por el ICA (Huertas, Brito & Cárdenas, 1999), aunque no se describe la metodología de trabajo, se indica que entre 1994 y 1998 murieron en las sabanas del Meta y Vichada 16 160 vacas y novillas a causa de la enfermedad y que los mayores picos de mortalidad se presentan en el mes de junio; resaltando la problemática de las deficiencias minerales en la región. Por su parte el estudio sobre la mortalidad en el departamento del Vichada (Parra *et al.*, 1997), no intentó identificar etiologías específicas, sino realizar análisis de composición de suelos y forrajes, adicionado del análisis de hematología y química sanguínea, más la evaluación de indicadores de salud y producción en la finca. En ese estudio se destacó la importancia de las deficiencias minerales subyacentes en la región y se recomendó la administración de sales mineralizadas y vacunación de los hatos contra el botulismo; se hizo énfasis además, que el problema que era económicamente importante para el sistema de producción extensivo-extractivo en la Altillanura del Meta y el Vichada. Sugirieron a el Botulismo, La Rabia y la intoxicación por plantas como las tres causas más importantes de mortalidad en la región.

Actualmente nuestro grupo de trabajo adelanta en la altillanura un estudio cofinanciado por PRONATTA (Programa de Transferencia de Tecnología del Ministerio de Agricultura) para determinar los factores asociados al desarrollo de inmunidad contra el botulismo, el cual tiene como objeto 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.

Existen evidencias de que la problemática de botulismo se ha empezado a diseminar a otras regiones ganaderas del país; en agosto de 2002, el programa de Salud Animal de CORPOICA, fue contactado por los gremios ganaderos de San Vicente del Caguán debido a una epidemia de mortalidad de ganado que se viene presentando en esa región desde el año pasado, indicando que en la zona existen más de 20 predios afectados y que la mortalidad supera las 2000 cabezas de ganado. En una visita a la región por parte de profesionales del programa, que incluyó la necropsia de un animal afectado, el examen clínico del animal permitió evidenciar



signos neuromusculares similares a lo observado en la Altillanura Plana; no se hallaron alteraciones histopatológicas de valor y la prueba de neutralización para botulismo no resultó positiva. Posiblemente se está ante el inicio de una epidemia de botulismo.

En tal visita se evidenció que existían algunos diagnósticos por parte de otros grupos de veterinarios, incluyendo Rabia bovina y Sarcocystosis; y aún que en la región se está empezando a introducir un inmunógeno para el supuesto control de la Sarcocystosis. Este mismo tipo de situaciones se observó durante la epidemia en la Altillanura; ante el desespero de los usuarios por la mortalidad, proliferan todo tipo de comerciantes que quieren hacer su agosto con la angustia de los ganaderos; ya en el caso de África, Ghirotti (1996), destacó la importancia de una política para regular y asegurar la disponibilidad de fármacos y biológicos veterinarios en situaciones de proyectos de emergencia.

No existe evidencia científica de que la Sarcocystosis pudiese causar sintomatología neuromuscular en bovinos; acorde a Fayer (1982), se requiere la ingestión de un muy alto número de esporocistos (superior a 200 000), para que se desarrolle enfermedad clínica, la que se caracteriza por fiebre, reducción en el consumo de alimento, anemia, debilidad y en ocasiones aborto; la lesión característica es pancarditis necrótica multifocal, lo que le da la apariencia que popularmente se llama “corazón de arroz”; este tipo de signos o lesiones no se han reportado en el caso de las muertes en el Caquetá.

4. Principios para el control de Botulismo.

El control y prevención del botulismo deben ser abordados desde un enfoque integral, dado que la presencia de la enfermedad está asociada con deficiencias minerales; además se debe considerar, que 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; por lo que una solución consistente en el largo plazo debe considerar aspectos de manejo, nutrición, genética y de inmunidad de la población. A continuación se hace un breve recuento de las bases para el control del botulismo.

4.1. Vacunas y vacunación

La posibilidad de proteger al ganado frente al botulismo utilizando filtrados de toxina inactivada (toxoides) fue descrita a inicios del siglo para el caso del ganado vacuno en Australia (Bennetts & Hall, 1938); posteriormente su uso se popularizó luego de que se describió el modo de producir altas cantidades de toxina en el laboratorio (Sterne & Wentzel, 1950). Para su empleo en los animales domésticos los toxoides se preparan con toxinas de las cepas de los tipos C y D, se inactivan con formalina y se adsorben con hidróxido de aluminio que actúa como adyuvante (Smith, 1977).

En Colombia al iniciarse la epidemia en 1995, el ICA aprobó primero la importación de un lote de emergencia de cerca de 300 000 dosis de la vacuna y posteriormente licenció dos toxoides botulínicos (tipo C y D) comerciales importados; específicamente, la “Vacuna Coopers contra Botulismo®” (Schering-Plough, S.A.) y “Botulic®” (Laboratorios Santa Elena, S.A.; Importado por Farmabio). En animales que reciben por primera vez la vacuna debe aplicarse un refuerzo al mes y después realizar vacunaciones cada año. Actualmente nuestro grupo de investigación desarrolla un proyecto de investigación que estudia la respuesta inmune en animales afectados para indicar al productor el esquema más adecuado de vacunación.

4.2. Mejora nutricional y otros métodos.

La corrección de la conducta de alotrofagia en los animales debe estar basada en el suministro de sales mineralizadas adecuadamente diseñadas para las condiciones de cada región. Las deficiencias de calcio y fósforo pueden ser prevenidas o superadas con el tratamiento directo del animal a través de una suplementación en la dieta o en el agua, o indirectamente por el tratamiento de los suelos con abono en donde el pasto a ser consumido crece. En condiciones de pastoreo extensivo donde las aplicaciones de fertilizantes son antieconómicas, la provisión directa de calcio y fósforo adicional puede ser obtenida dosificando a los animales a intervalos regulares con fosfatos minerales, o por el tratamiento de abastecimiento del agua con fosfatos solubles. El procedimiento más fácil y económico es proveer fosfatos que pueden lamer los animales. El fosfato bicálcico y los superfosfatos son buenas fuentes de fosfato mineral, pero los fosfatos de piedra son relativamente impalatables y la mayoría son demasiado altos en hierro para ser de uso seguro.

Una vaca de 300 Kg de peso y una producción diaria de 5 litros de leche debe consumir cerca de 70 gr diarios de sal mineralizada con 10% de fósforo y 18% de calcio. El suministro de sales mineralizadas formuladas especialmente para la zona es una de las medidas que se pueden tomar para prevenir la mortalidad (Uribe, 1996).

Para ilustrar esta situación, en las tablas 1 y 2 se presentan dos formulaciones sugeridas para los Llanos colombianos, realizadas en años anteriores por expertos, las cuales cumplen con los requerimientos nutricionales de los animales en la región.

Finalmente están las medidas complementarias; nuestra experiencia en la región ha demostrado que la recomendación de enterrar los cadáveres de animales que mueren por la enfermedad es de vital importancia para limitar la diseminación de esporas (De Souza & Langenegger, 1987) y es realizable bajo condiciones prácticas del manejo de las fincas. Aunque se demostró que la quema de la sabana nativa en verano disminuye el riesgo de ocurrencia de la enfermedad (Ortiz, 2000; Ortiz, Benavides & Villamil, 2001b), la recomendación de su uso debe ser tomada con cautela, por consideraciones ecológicas, y ser



utilizada en situaciones cuando las necesidades de manejo de la pradera para proveer forraje tierno para los animales, así lo exija.

Tabla 1. Composición de la mezcla mineral completa suministrada a los bovinos de un sistema de hatos de Carimagua. Fuente: Informe Anual CIAT (1978)

Ingredientes	Porcentajes
Sal	47
Fosfato bicálcico	47
Sulfato de cobre	0.117
Sulfato de hierro	0.3
Oxido de zinc	0.074
Sulfato de manganeso	0.1854
Sulfato de cobalto	0.012
Yoduro potásico	0.0042
Salvado de trigo	5.3

Tabla 2. Suplementación mineral dada por Miles al ganado del Rancho La Plata de su propiedad. Fuente: Miles (1983; reportado por Morales *et al.* 1986).

Minerales/fuente	Nivel en la dieta
Superfosfato triple 19% P	100 Kg
Fosfato monocálcico 21% P	300 Kg
Sal	469 Kg
Azufre	80 Kg
Cal molida	50 Kg
Sulfato de zinc	25 Kg
Sulfato de cobre	5 Kg
Sulfato de cobalto	41 g
Yoduro potásico	41 g
Selenito de sodio	25 g



5. Conclusiones

El botulismo es una intoxicación alimentaria de los animales que esta asociada a problemas de deficiencias minerales en las praderas. Su presentación clínica típica es la de una enfermedad neuro paralítica ascendente, que afecta principalmente a vacas y novillas de buena condición. Es importante que productores y asistentes técnicos recuerden esta posibilidad etiológica cuando enfrentan casos de mortalidad súbita del ganado en sus fincas, principalmente en regiones con altas deficiencias de fósforo.

La confirmación diagnóstica del botulismo es importante para identificar los tipos de toxina actuantes, pero es un proceso complejo y dispendioso; actualmente nuestro grupo de trabajo está en capacidad de adelantarlos como servicio tarifado.

Se requiere brindar apropiada financiación para el desarrollo de estudios epidemiológicos sobre las situaciones de salud del ganado en condiciones tropicales; principalmente, los casos epidémicos de mortalidad. Sólo de esta manera, se contará con argumentos científicos razonables, sobre etiologías y factores de riesgo, que permitirán un mejor uso de los recursos en el desarrollo y puesta en marcha de estrategias sostenibles para su control.

La mortalidad bovina causada por botulismo involucra una serie de medidas de prevención y de control que no requieren de mucha inversión económica. Es necesario que los ganaderos y asistentes técnicos adopten las recomendaciones sencillas que se dan y en un tiempo corto se podrán ver los resultados, que se reflejan en la disminución de las tasas de mortalidad.

6. Bibliografía.

- 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.
- Bennetts, H. W. & Hall, H. T.** (1938). Botulism of sheep and cattle in Western Australia: Its cause and prevention by immunization. *Australian Veterinary Journal* 14, 105-118.
- 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.
- Carter, G.R. & Chengapa, M.M.** (1991) *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. Fourth Edition. Lea & Febiger, London. 304 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical** (1978). Informe Anual 1977. (Gutiérrez, M., ed.). Impreso por Editorial Carrera séptima Ltda. Bogotá (Colombia). 447p.
- 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 Veterinaria Brasileira* 7(1):17-22.
- Dutra, I.; Weiss, H.E.; Weiss, H. & Dobereirner, J.** (1993). Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. *Pesquisa veterinaria Brasileira* 13(3/4), 83-86.
- Fayer, R.** (1982). Sarcocystosis: A clinical entity in bovine practice. En: "Memorias Primer Simposio Nacional e Internacional de Clínica y Medicina Bovina". Bogotá, abril 27-30 de 1982. Asociación



- Colombiana de Médicos Veterinarios y Zootecnistas, ACOVEZ. pp. 199-205.
- France, M.** (1989). Histological Examination of the Central Nervous System in the Diagnosis of Botulism. *Journal of Comparative Pathology* **101**, 101-107.
- Ghirotti, M.** (1996). A proposal for the adoption of an essential veterinary drugs policy for development and emergency projects in Africa. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale* **1**(1-2), 57-65.
- 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.
- 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.
- 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.
- Huertas R., H.; Brito S., E. & Cárdenas G., D.** (1999). Botulismo Bovino en los llanos Orientales de Colombia. Boletín No.1 Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Villavicencio (Meta). 16p.
- Morales G., G.; Aycardi B., E.; Guzman R., V. H. & Uribe P., A.** (1986). Sanidad Animal en el Trópico Andino y los Llanos Orientales. Suplemento Ganadero. *Carta Ganadera* **6**(2), 1-64 .
- Ortiz O., D.** (2000). 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.; Benavides O., E. & Villamil, L.C.** (2001a). 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 O., D.; Benavides O., E. & Villamil, L.C.** (2001b). 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. & Benavides O., E.** (2002). Hallazgos histopatológicos en bovinos naturalmente afectados por el síndrome neuroparalítico en la Orinoquía colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **15**(1), 107-114.
- Parra, J.; Olarte, F.; Barrera, J. & Acevedo, I.** (1997). Mortalidad bovina en la Altillanura del Vichada. Informe técnico No. 01. (Jaramillo S., C.A., ed.). CORPOICA, Regional 8. 57 p.
- Pereira F., M.G. & Armenian, H.K.** (1991). Use of the Case-Control Method in outbreak investigations. *American Journal of Epidemiology* **133**(7), 748-752.
- Seifert, H.S.H.; Bader, K.; Cyplik, J.; González Salinas, J.; Roth, F.; Salinas Meléndez, J.A. & Sukop, U.** (1996). Environment, Incidence, Aetiology, Epizootiology and Immunoprophylaxis of Soil-borne Diseases in North-east México. *Journal of Veterinary Medicine* **43**, 593-606.
- Smith, L.** (1977). Botulismo, el microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Editorial Acribia, Zaragoza (España). 213 p.
- Sterne, M. & Wentzel L., M.** (1950). A new method for the large scale production of a high-titre botulinum formol-toxoid types C and D. *Journal Immunology* **65**, 175-183.
- 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.

Versión 2.

E. Benavides & D. Ortiz,
Diciembre 2002

Las Neurotoxinas Tipo C y D de *Clostridium botulinum* Responsables de Parte de la Mortalidad de Bovinos Afectados por el Síndrome Neuroparalítico en Cuatro Fincas de la Orinoquía Colombiana.

Ortiz , D. & Benavides, E. (2002). Revista de Medicina Veterinaria 2 (3), 7-20.

LAS NEUROTOXINAS TIPO C Y D DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* SON RESPONSABLES DE PARTE DE LA MORTALIDAD DE BOVINOS AFECTADOS POR EL SÍNDROME NEUROPARALÍTICO EN CUATRO FINCAS DE LA ORINOQUIA COLOMBIANA¹

DIEGO ORTIZ ORTEGA*

Médico Veterinario, Patólogo MSc., Docente - U. La Salle

EFRAÍN V. BENAVIDES ORTIZ

Médico Veterinario MSc., PhD. - U. Nacional

Programa Nacional de Salud Animal. CORPOICA - CEISA

RESUMEN

CON EL FIN DE INVESTIGAR LA ETIOLOGÍA DEL SÍNDROME NEUROPARALÍTICO BOVINO (SNB) SE REALIZÓ UN ESTUDIO epidemiológico longitudinal (casos y controles) en cuatro fincas ubicadas en el departamento del Meta, durante un año (abril 1998 - marzo 1999) Este tipo de estudio pretende demostrar la causalidad desde el punto de vista probabilístico entre varios factores de riesgo y el SNB. Se conformó un grupo de animales que presentaron naturalmente la enfermedad en estudio (casos incidentes) y un grupo de animales que no presentan dicha patología (controles) Los casos y los controles se compararon con respecto a ciertas características (factores de riesgo) pasadas, que se juzgó tenían la posibilidad de ser factores etiológicos o causales del SNB. Se partió de la enfermedad y se buscó la exposición a los factores de riesgo. El estudio incluyó 39 animales naturalmente afectados entre los 2 y 8 años de edad de la raza Cebú principalmente, los cuales se compararon con animales sanos de los mismos grupos de edad. Las características epidemiológicas y clínicas se basaron respectivamente en las condiciones de manejo de los hatos y en el examen físico general de los animales. Se realizaron necropsias, análisis histopatológicos de los tejidos, bio-ensayos en ratones y pruebas de neutralización para detectar la presencia de neurotoxinas botulínicas en extractos de tejidos. Los resultados demostraron que el grupo de edad a riesgo eran las hembras mayores de 2 años de edad (novillas, vacas en gestación, vacas lactantes y vacas horras), de buena condición corporal, principalmente de la raza cebú, sometidas a una deficiente nutrición y a deficiencias minerales. La mortalidad ocurre principalmente en épocas de lluvia. La tasa anual de mortalidad encontrada para estas fincas fue de 7.8%. La tasa anual de mortalidad (tasa de ataque) por el SNB fue de 12.7%. Se comprobó en el laboratorio por primera vez en Colombia la presencia de neurotoxinas botulínicas tipo C y D, hallazgo consistente con el cuadro clínico y con los resultados epidemiológicos.

Palabras Claves: Neurotoxina, Síndrome Neuroparalítico, Bovinos, Colombia.

1 Contribución del proyecto: "Alternativas de Solución para el Problema de Mortalidad Bovina en la Orinoquía Colombiana". CORPOICA - PRONATTA, agosto de 2000.

* A quien debe ser enviada la correspondencia:

email: dortiz@corpoica.org.co y ebenavid@hemeroteca.icfes.gov.co.

ABSTRACT

WITH THE PURPOSE OF INVESTIGATING THE ETIOLOGY OF THE SYNDROME BOVINE NEUROPARALÍTICO (SNB) WAS CARRIED out a longitudinal epidemic study (cases and controls) in four properties located in the department of the Meta, during one year (April 1998, March 1999). This study type seeks to demonstrate the causation from the point of view probability between several factors of risk and the SNB. There was conformed a group of animals that presented the illness naturally in study (incident cases) and a group of animals that don't present this pathology (controls). The cases and the controls were compared with regard to certain characteristics (factors of risk) last that was judged they had the possibility to be factors etiologycs or causal of the SNB. From the illness and the exhibition was looked for the factors of risk. The study included 39 animals naturally affected mainly between 2 and 8 years of age of the race Cebú, which were compared with healthy animals of the same age groups. The characteristic epidemiologycs and clinical were based respectively on the conditions of handling of the clusters and in the general physical examination of the animals. They were carried out autopsies, histopatologyc analysis of the tissues, bioassays in mice and neutralization tests to detect the presence of botulinic neurotoxines in extracts of tissues. The results demonstrated that the age group to risk was the females bigger than 2 years of age (heifers, cows in gestation, cows lactants), of good corporal condition mainly of the race cebú, subjected to a faulty nutrition and mineral deficiencies. The mortality happens mainly in rain times. The annual rate of opposing mortality for these properties was of 7.8. The annual rate of mortality (it appraises of attack) for the SNB it was of 12.% it was proven for the first time in the laboratory in Colombia the presence of botulinic neurotoxines type C and D, consistent discovery with the clinical observations and with the epidemic results.

Keywords: Neurotoxin, Bovine Neuroparalitic Syndrome, Bovine, Colombia.

INTRODUCCIÓN

Desde el año 1993, los 4.4 millones de bovinos de la ganadería Llanera se encuentran a riesgo de una nueva y mortal enfermedad. Hasta ahora los ganados más afectados son los ubicados en las sabanas de los departamentos del Meta y Vichada, pero el resto de los Llanos y la ganadería del Guaviare no están exentos de estos riesgos. (1)

Esta situación no es nueva en los Llanos Orientales, ya que desde 1977 se había reportado un cuadro de mortalidad similar. El bajo contenido de fósforo de los suelos tropicales y de las gramíneas nativas, conduce a la condición denominada “pica” o apetito desmedido, la cual predispone a los animales al botulismo: una condición tóxica que, sin lugar a duda, produjo la muerte de varios animales en este año, en las inmediaciones de la estación experimental de Carimagua. (2)

Sin embargo, una descripción similar del problema la reportan varios autores, (3,4,5), quienes afirmaron que desde 1993 la Orinoquía colombiana, en especial la Altillanura Plana, se ha visto afectada por un brote de mortalidad de bovinos adultos asociado con un Síndrome Neuroparalítico, que ha sido tentativamente diagnosticado como botulismo bovino. Las observaciones hechas implicaban que el mayor número de bajas se encontraba en animales que pastoreaban especies forrajeras nativas, que la mayor mortalidad se hallaba en el grupo de vacas y/o novillas lactantes o en último tercio de gestación en muy buen estado de carnes. Los ganaderos, al abrir los cadáveres de sus animales, no habían detectado en forma primaria ningún tipo de alteración así como tampoco aparecieron lesiones cuando las muestras de distintos tejidos fueron analizadas por expertos de los centros locales de diagnóstico. El cuadro clínico en general de los animales observados era: erizamiento, mirada “vidriosa”, caminar vacilante aumentándose la debilidad de la articulación de la cuartilla en los miembros anteriores y posteriormente caída, para permanecer en decúbito hasta 15 días con muerte para la mayoría. Algunos informaron que el animal que consumía huesos, generalmente enfermaba.

Los diferentes proyectos realizados en Colombia se limitaban a dar diagnósticos presuntivos como causantes de la mortalidad, pero ninguno había hipotetizado con el rigor epidemiológico, factores causales ni factores de riesgo asociados a la problemática.

El desarrollo de una encuesta transversal realizada en 358 fincas de la zona afectada (6), permitió determinar que la prevalencia de fincas afectadas por el Síndrome Neuroparalítico Bovino fue del 35%, (intervalo de confianza 95%= 30%-40%). Las prevalencias encontradas para los departamentos del Meta y Vichada fueron de 43% y 36 % respectivamente, indicando que los departamentos localizados al margen derecho del río Meta son los más afectados. Sin embargo las prevalencias encontradas para los departamentos de Arauca y Casanare fueron de 4% y 34%, indicando que la problemática se ha extendido a otros departamentos al margen izquierdo del río Meta.

Los principales factores de riesgo asociados al problema de mortalidad de la zona que se encontraron en este estudio fueron el consumo de huesos por parte de los animales y la quema de sabana nativa en época de verano, la cual resultó ser un factor de riesgo que interactúa con el consumo de huesos por parte de los animales, demostrando que aquellas fincas donde no se quema, la probabilidad de que los animales mueran por esta causa es mayor.

A pesar de que estos factores están asociados al problema de mortalidad, no indican en ningún momento causalidad, por lo que era necesario desarrollar otro tipo de proyecto epidemiológico que indicara la antecedencia del factor y permitiera comprobar la causalidad, ya que en el país no se habían desarrollado estudios que condujeran a dilucidar estos aspectos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los predios estudiados (cuatro) se ubicaron en el departamento del Meta, al margen derecho del río Meta, representan las ganaderías extensivas extractivas de la subregión natural de la Altillanura Plana del departamento del Meta, con fácil acceso en verano e invierno; los criterios de inclusión para escoger estos predios fueron la ubicación geográfica, cooperación de los dueños de los predios y los reportes previos de mortalidad. El criterio utilizado para escoger el número de hatos (cuatro) fue determinado por los recursos económicos disponibles para la ejecución de este proyecto.

Para seleccionar los animales casos, se tuvieron en cuenta criterios objetivos de diagnóstico, tanto desde el punto de vista clínico, como ayudas diagnósticas de laboratorio, criterios uniformes y fijados con anterioridad al momento de la selección de los casos (7). El caso (caso incidente), fue definido como animales que en buena condición de un momento a otro presentaran síntomas de debilidad de los miembros posteriores y compromiso del sistema nervioso que empezara por parálisis progresiva que se iniciara con dificultad al caminar, caída de la

cola, seguida de caída de los animales en estado de alerta, postración en decúbito y posterior muerte en medio de dificultad respiratoria al cabo de 3 días. Patologías que cursaran con sintomatología diferente fueron descartadas.

Se determinó la presencia de neurotoxinas botulínicas recolectando muestras de los animales afectados por el SNB en los predios escogidos, principalmente hígado, contenido ruminal y contenido intestinal, las cuales fueron remitidas al laboratorio en refrigeración y procesadas individualmente. Estas muestras fueron analizadas para detectar en ellas la presencia de toxinas termolábiles; mediante una prueba biológica en ratón comparando materiales sometidos al calor y no (termolabilidad), de acuerdo a protocolos estandarizados en el Programa Nacional de Epidemiología Veterinaria de CORPOICA (5).

La confirmación diagnóstica de botulismo en el laboratorio implica: la extracción de toxinas a partir de fluidos y materiales biológicos de animales afectados para posteriormente verificar esa actividad tóxica sobre animales de laboratorio (ratones). Una vez se ha comprobado la toxicidad de los fluidos se demuestra que esa actividad tóxica es inhibida específicamente por antitoxinas de referencia. (8) La prueba biológica se realiza inoculando ratones por vía intraperitoneal con extractos de suero, hígado, contenido intestinal y ruminal, observando posteriormente la aparición de sintomatología neuromuscular. El diagnóstico se confirma cuando la toxina en el extracto es neutralizada por una antitoxina específica. (9)

En el laboratorio del CEISA se validó la metodología descrita por Hatheway (8, 11), la que consiste en descongelar rápidamente las muestras clínicas a procesar (contenido ruminal, contenido intestinal, hígado), utilizando para ello un baño de María a 37° C. Se colocaron 50 g. de la muestra en un mortero, adicionando 1 a 2 g. de arena estéril y una pequeña cantidad (aproximadamente 5 ml) de diluyente de gelatina² frío; se trituró hasta obtener una suspensión homogénea. Después de triturar la muestra se adicionó un volumen de diluyente de gelatina¹⁴ (ml) igual al peso (g) de la muestra. Se dejó en refrigeración a 4° C unas 12 - 18 horas para permitir la solubilización de la toxina. Se centrifugó a 12.000 G. durante 20 minutos (en una centrífuga refrigerada).

Los extractos obtenidos en el proceso anterior se sometieron a tres tratamientos:

* Tratamiento 1: el extracto no se sometió a ningún tratamiento (extracto puro)

2 Gelatin Type A: de piel porcina. SIGMA®, Chemical Company, St. Louis, U.S.A. El diluyente se preparó 0.2% de gelatina y 0.4% de Na₂HPO₄, en agua destilada; se ajustó el pH 6.2 con HCl y se esterilizó a 121° C durante 15 minutos.

- * Tratamiento 2: el extracto se tripsinizó³
- * Tratamiento 3: el extracto se calentó a 100° C durante 15 minutos.

Posteriormente se sirvieron en jeringas de insulina por duplicado con 0.5 ml de cada tratamiento, para inocular los ratones intraperitonealmente con 0.5 ml de cada extracto. Los ratones se observaron durante 4 días. La muerte por botulismo en ratones ocurre generalmente entre 6 - 24 horas. Sin embargo, la muerte puede demorarse. Los síntomas de botulismo en ratón a menudo aparecen después de las cuatro horas postinoculación e incluyen erizamiento del pelo, respiración abdominal dificultosa (fuelle) y parálisis de las extremidades. Los ratones deben ser observados cada dos horas. Para todas las pruebas se empleó como control diluyente de gelatina¹⁴ (8,11)

Los sobrenadantes de muestras que resultaron letales para ratones se centrifugaron a 12.350 G por 10 minutos (preferiblemente centrífuga refrigerada). Se colocó el fluido sobrenadante en tubos de ensayo de 15 x 125 mm. para la prueba. En algunos casos fue necesaria la clarificación con una segunda centrifugación. (8; 11)

Se rotularon 7 tubos de ensayo de 1.5 x 85 mm. con tapones de algodón y se prepararon las muestras como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Detección de toxinas de *C. botulinum* en sobrenadantes tóxicos.

TUBO No.	SOBRENADANTE Y ANTITOXINA ⁴	SUERO EN JERINGA (ml)	VOLÚMEN A RATÓN (ml)	VOLUMEN INYECTADO
1	1.0 ml	Sin tratar	0.8	0.4
2	1.0 ml	Calentado 10 min. a 100° C	0.8	0.4
3	1.0 ml	0.25 ml solución de tripsina	1.0	0.5
4	1.0 ml	0.25 ml anti A	1.0	0.5
5	1.0 ml	0.25 ml anti C	1.0	0.5
6	1.0 ml	0.25 ml anti D	1.0	0.5
7	1.0 ml	0.25ml anti ABCDEF	1.0	0.5

Fuente: (8; 11).

3 Trypsin 1:250 DIFCO® Laboratories. La solución de tripsina se preparó 1 g. de tripsina diluida en 100 ml. de agua destilada. Se ajustó el pH a 6.0 y se incubó a 37° C durante 45 minutos.

4 *Clostridium botulinum*, Monovalent and Polyvalent Antitoxins®. C.D.C. Atlanta, Georgia.

Se mezclaron los tubos y se incubaron a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente se inocularon dos ratones *Mus musculus*, cepa ICR, machos de 18-21g. exogénicos (bioterio Instituto Nacional de Salud, Bogotá Colombia), intraperitonealmente con cada mezcla a probar (0.5 ml/ratón). Los ratones se observaron durante 4 días. La muerte por toxinas botulínicas usualmente ocurre 6-24 horas en ratones; sin embargo ocasionalmente mueren tarde. Los síntomas de botulismo en los ratones aparecen 4 horas después de inoculados e incluyen abdomen encintado, dificultad respiratoria y parálisis de los miembros (8; 11)

Si la toxina botulínica está presente en el sobrenadante en suficientes cantidades para ser detectada bajo las condiciones de la prueba, los ratones que recibieron el sobrenadante no tratado deben morir, y ratones que recibieron el material calentado deben sobrevivir. Las toxinas deben ser neutralizadas por las antitoxinas específicas, el tipo involucrado debe ser indicado por la antitoxina usada en la muestra. Si los ratones mueren, no son protegidos por las antitoxinas utilizadas. La verificación del tipo de toxina se logra repitiendo la prueba, utilizando extracto no tripsinizado y la apropiada antitoxina junto con los controles calentado y no calentado. La prueba para titular una potente toxina que se encuentre en un extracto, se realiza diluyendo el sobrenadante en diluyente de gelatina en varias concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, etcétera) y se repite la prueba de neutralización. En este trabajo por tratarse de muestras de bovinos los tipos C y D de antitoxinas se incluyeron rutinariamente en todas las pruebas de neutralización, utilizando dos tipos de protocolos, uno corto que incluye las antitoxinas A, C, D y Polivalente, y otro largo donde se incluyen las antitoxinas A, B, C, D, E, F y G (8, 11)

Las antitoxinas de *C. botulinum* se reconstituyeron de acuerdo a las recomendaciones del CDC (8). En el examen de neutralización que se describe, la antitoxina es diluida de tal manera que una unidad internacional esté presente en 0.1 ml; esto es, cada ratón recibe una unidad internacional de antitoxina. Una unidad internacional de antitoxina es capaz de neutralizar 10.000 dosis letal 50 intraperitoneal en ratón de toxina en el caso de la toxina tipo A, B, C, D y F, ó 1.000 dosis letal 50 de toxina tipo E. (8)

La prueba biológica se realizó inoculando ratones por vía intraperitoneal con extractos de suero, hígado, contenido intestinal y ruminal, observando posteriormente la aparición de sintomatología neuroparalítica. El diagnóstico se confirmó cuando la toxina en el extracto era neutralizada por la antitoxina específica (9). Esta prueba biológica en ratón demuestra bastante sensibilidad, permitiendo detectar niveles de toxina menores que 5 DL₅₀/ml en muestras

biológicas; pero tiene muchos inconvenientes, debido al gran número de animales de laboratorio requeridos para su comprobación y la tardanza para obtener los resultados. (10)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El predio 1 se caracterizó por presentar elevada mortalidad en años anteriores. En 1997 murieron 30 hembras entre novillas, vacas lactantes, vacas preñadas y vacas horras. El predio 2 era una de las fincas más afectadas de la zona en años anteriores; en 1996 según inventarios murieron 202 animales entre mayo y diciembre, afectando principalmente los grupos de novillas de levante y vacas paridas. En 1997 reportó la muerte de 87 animales entre junio y diciembre, afectando el mismo grupo de edad. El predio 3 se caracterizó por ser una finca con altos niveles de inversión en infraestructura, maquinaria, praderas mejoradas y alta selección de los animales. El nivel de asistencia técnica era alto ya que contaba con veterinario y agrónomo de planta y un alto número de obreros que laboraban en forma permanente. En esta finca no se presentó mortalidad durante el año de seguimiento. El predio 4 se dedicaba a la cría, pero por circunstancias de la elevada mortalidad el propietario se ha dedicado a la ceba. La tasa anual de mortalidad encontrada para estas fincas fue de 7.8% La tasa anual de mortalidad (tasa de ataque) por el SNB fue de 12.7%

NEUROTOXINAS BOTULÍNICAS

Se tomaron un total de 84 muestras en las necropsias de los 39 animales estudiados, para realizar pruebas biológicas en ratón. De contenido intestinal se procesaron 8 muestras, de contenido ruminal 28 muestras, y de hígado 47 muestras. Solamente 7 muestras demostraron toxicidad en ratones. Los resultados obtenidos se describen en la Tabla 2.

- Caso 1: Material termolábil (no murieron los ratones con el extracto calentado), resultando tóxico para los extractos puro y tripsinizado. Este extracto fue neutralizado utilizando protocolo corto por antitoxinas A, C, D y Polivalente; el tiempo de muerte del control en la primera prueba fue de 48 horas y en la neutralización fue de 96 horas. Las antitoxinas C, D y Polivalente neutralizaron los respectivos extractos. Como conclusión se determinó que en este caso estaban implicadas las toxinas botulínicas C y D como causantes de la muerte en este animal.

Tabla 2. Prueba Biológica y Neutralización de toxinas de *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*, Extractos de animales afectados por el Síndrome Neuroparalítico Bovino, Altillanura Plana del departamento del Meta.

Finca	Caso	MUESTRA	Prueba biológica			Prueba de neutralización antitoxinas botulínicas									Prueba de neutralización antitoxina tetánica			
			PUR	TRIP	CALE	PUR	A	B	C	D	E	F	G	POL I	TET 1:0.25	TET 1:0.5	TET 1:1	TET 1:2
1	1	Contenido Intestinal	2/2 48 h	2/2 72 h	0/2	2/2 96 h	2/2 124 h		0/2	0/2				0/2				
1	2	Hígado	2/2 72/96h	2/2 96 h	0/2	2/2 120h	2/2 96 h		0/2	0/2				0/2				
1	3	Hígado	2/2 48 h	2/2 72 h	0/2	0/2	0/2		0/2	0/2				0/2				
1	4	Hígado	2/2 20 h	2/2 20 h	1/2 128 h	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2					
2	5	Contenido Intestinal	2/2 72 h	1/2 72 h	2/2 72 h	2/2 120h	2/2 120h	2/2 72 h	2/2 90h	2/2 120h	2/2 36 h	2/2 72 h	2/2 80 h	2/2 74 h		0/2	0/2	0/2
2	6	Hígado	2/2 72 h	2/2 72 h	2/2 72 h	2/2 84 h	2/2 72 h		1/2 96 h	2/2 120h				2/2 96 h	0/2	0/2	0/2	0/2
4	7	Hígado	2/2 44 h	2/2 45 h	0/2	2/2 44 h	2/2 44 h	2/2 44 h	0/2 72 h	1/2 20 h	2/2 20 h	2/2 20 h	2/2 24 h					

Las fracciones indican el número de ratones muertos/ratones inoculados. Las h muestran las horas posteriores a la inoculación en que la muerte se observó en ratones.

- Caso 2: Material termolábil (no murieron los ratones con el extracto calentado) resultando tóxico para los extractos puro y tripsinizado. Este extracto fue neutralizado utilizando protocolo corto por antitoxinas A, C, D y Polivalente; el tiempo de muerte del control en la primera prueba fue de 72 - 96 horas respectivamente y en la neutralización fue de 120 horas. La antitoxinas C, D y polivalente neutralizaron los respectivos extractos. Como conclusión se determinó que en este caso están implicadas las toxinas botulínicas C y D como causantes de la muerte en este animal.
- Caso 3: Material termolábil (no murieron los ratones con el extracto calentado) resultando tóxico para los extractos puro y tripsinizado, pero los resultados de la neutralización se inhabilitan por la ausencia de mortalidad en el extracto utilizado como control. Debido a que las muestras para este caso se agotaron no fue posible repetir las pruebas de neutralización.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

- Caso 4: Material termolábil (murió 1 ratón con el extracto calentado, por accidente de inoculación) resultando tóxico para los extractos puro y tripsinizado, pero igual al caso anterior los resultados se inhabilitan porque no murieron los ratones con el extracto puro al realizar la prueba de neutralización. Debido a que las muestras para este caso se agotaron no fue posible repetir las pruebas de neutralización.
- Caso 5: Material tóxico termoestable (murieron los ratones con extracto calentado) resultando tóxico para los extractos puro y tripsinizado. Se realizó la prueba de neutralización, primero utilizando protocolo corto de neutralización; ningún extracto fue neutralizado. Al repetir la prueba con protocolo largo de neutralización, las antitoxinas tampoco neutralizaron los extractos tóxicos. Finalmente el extracto se sometió a neutralización con antitoxina tetánica, utilizando el protocolo con tres diluciones, y se repitió posteriormente con la dilución más baja, resultando la prueba positiva para esta antitoxina. Como conclusión se demostró que en este caso la toxina actuante era la neurotoxina de *Clostridium tetani*.
- Caso 6: Material tóxico termoestable (murieron los ratones con extracto calentado) resultando tóxico para los extractos puro y tripsinizado. Se realizó la prueba de neutralización, utilizando protocolo corto de neutralización; ningún extracto fue neutralizado. El extracto se sometió a neutralización con antitoxina tetánica, utilizando el protocolo con cuatro diluciones resultando la prueba positiva para esta antitoxina. Como conclusión se demostró que en este caso la toxina actuante era la neurotoxina de *Clostridium tetani*.
- Caso 7: Material termolábil (no murieron los ratones con el extracto calentado) resultando tóxico para los extractos puro y tripsinizado; la prueba de neutralización se realizó utilizando el protocolo largo, y los resultados indican neutralización de los extractos con antitoxinas C y D. Como conclusión se comprueba que en este caso existe la presencia de neurotoxinas botulínicas C y D, las cuales causaron la muerte de este animal.

Los resultados comprueban la intoxicación con neurotoxinas botulínicas tipos C y D, indicando que en la zona sí existe botulismo, y que la intoxicación alimentaria es un gran factor de riesgo asociado al problema de mortalidad. Estos hallazgos son coherentes con lo descrito en el cuadro clínico, y se suman para confirmar la hipótesis de la hiponutrición como causante de alotrofagia en los animales, constituyendo un factor de riesgo para que los animales adquieran esta patología.

En Brasil se confirmó la presencia de intoxicación botulínica en 15 vacas por medio de prueba biológica en ratón, microfijación de complemento y pruebas

de neutralización, encontrando que los animales estaban afectados por las neurotoxinas tipo C y D, corroborado igualmente con estudios clínicos y epidemiológicos, donde las vacas en la necropsia presentaron fragmentos de huesos en el interior del retículo y rumen confirmando la privación del apetito e igual representa el principal riesgo de intoxicación. La presencia concomitante de ambos tipos de toxinas puede ser interpretada como reacción cruzada como consecuencia de la semejanza antigénica entre los tipos C y D de toxina botulínica (12)

En Venezuela se reportaron por primera vez dos casos de botulismo donde la toxina D fue detectada en muestras de hígado de ambos animales y en contenido de abomaso. La evolución, síntomas clínicos y hallazgos *posmortem* en estos animales y en otros casos son compatibles con botulismo. Determinaron la presencia de especímenes tóxicos en carroña de chigüiro y de bovinos. Igualmente evidenciaron la presencia de *Clostridium botulinum*, tipos C, D y G, habiendo logrado aislar dos cepas; una tipo D y otra tipo G (13)

Con respecto a la neurotoxina tetánica se ha demostrado que altas concentraciones de neurotoxina tetánica son capaces de causar síntomas de botulismo, bloqueando la liberación de acetil colina en las membranas presinápticas justo como lo hacen las neurotoxinas botulínicas, debido a la semejanza estructural de estas neurotoxinas, por lo que su mecanismo de acción es similar. Sin embargo, a pesar de las semejanzas entre la neurotoxina tetánica y las neurotoxinas botulínicas, las evidencias científicas indican que únicamente las neurotoxinas botulínicas son venenos alimentarios, que son capaces de atravesar la barrera gastrointestinal. Por el contrario el tétano se presenta únicamente en infecciones de heridas relacionadas con *Clostridium tetani*, origen de la producción de la neurotoxina. (14)

Aunque las muestras de estos dos casos (contenido intestinal e hígado), resultaron positivas a neurotoxina tetánica, no puede tenerse en cuenta este hallazgo debido a que clínicamente los animales no evidenciaron lesiones (heridas) ó sintomatología compatible con esta enfermedad. Existe la posibilidad de que las muestras se hayan contaminado con *C. tetani* y que por las condiciones anaerobias que se presentaron en estos materiales el *C. tetani* se multiplicara allí. (15)

CONCLUSIONES

- Se comprobó a través de pruebas biológicas en ratón por primera vez en Colombia, que al menos parte de los casos (3 casos) de mortalidad bovina que ocurren en las fincas, poseen como causa etiológica las neurotoxinas de

Clostridium botulinum tipo C y D, las cuales son ingeridas por los animales cuando consumen huesos y carroña al tratar de suplir sus deficiencias minerales.

- Se demostró que gran parte de la mortalidad bovina puede explicarse por la intoxicación alimentaria producida por las neurotoxinas botulínicas, pero no todos los animales se mueren por esta causa. Existen otros agentes causales, los cuales producen signos y síntomas compatibles con botulismo, por lo que se puede errar en el diagnóstico fácilmente.
- Se comprobó a través de la necropsia de animales muertos la presencia de cuerpos extraños en el rumen y retículo (fragmentos de hueso principalmente), lo que demuestra que los animales presentaban alotriofagia, perversión del apetito que llevó a los animales a consumir sustancias no alimenticias, comportamiento inducido por las deficiencias minerales en la dieta, especialmente P y Ca.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HUERTAS R., H.; BRITO S., E. & CÁRDENAS G., D. Botulismo Bovino en los llanos Orientales de Colombia. Boletín No. 1 Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Villavicencio (Meta) (1999) 16 p.
- (2) CIAT, Informe Anual. Editor: Mario Gutiérrez. Impreso por Editorial Carrera séptima Ltda. Bogotá (Colombia) (1977) 447 p.
- (3) URIBE, A. 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. Bogotá, junio (1996) 14, 132 p.
- (4) PARRA, J.; OLARTE, F.; BARRERA, J. & ACEVEDO, L. 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) (1997) 57 p.
- (5) BENAVIDES O., E.; BENAVIDES A., J.; ALTUZARRA B., R.; ORTIZ O., D.; LONDOÑO B., M.; ORTIZ O., D. & CORTEZ G. H. Botulismo bovino en

- Colombia: Avances de Investigación con relación al brote de mortalidad de Bovinos en la Orinoquía Colombiana, 1996 - 1997. (Memorias IV Encuentro Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias - ENICIP, Medellín, noviembre 6 y 7 de 1997). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 10, (Suplemento) (1997) 152 p.
- (6) ORTIZ, D. (2000) 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. 317 p.
- (7) FLÓREZ T., J. A.; GONZÁLEZ E., G.; HERNÁNDEZ Z., A.; HERRERA V., J. S.; LONDOÑO F., J. L.; LOPEZ H., C.; MAZUERA, M. E.; MEJIA V., W.; RAMIREZ C., H.; ROJAS L., E.; TORRE, Y. & VASCO U., A. 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. (1994) 443 p.
- (8) HATHEWAY, C.L. *Toxicogenic Clostridia*. Clinical Microbiology Reviews (1990) 3(1): 66-98.
- (9) THOMAS, R.J. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. Australian Veterinary Journal (1991) 68(3): 111-113.
- (10) SMITH, L. Botulismo, el microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Editorial Acribia, Zaragoza (España) (1977) 213 p.
- (11) HATHEWAY, C.L. 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. (1988) Pp. 111-133.
- (12) LISBÔA, J.; KUCHEMUCK, M.; DUTRA, I.; GONÇALVES, R.; ALMEIDA, C. & BARROS, R. Epidemiología e quadro clínico do botulismo epizootico dos bovinos no estado de São Paulo. Pesquisa Veterinaria Brasileira (1996) 16 (2/3):67-74.
- (13) GARCÍA, G.; ÁVILA, F. & CORDERO, F. Reporte preliminar sobre «Botulismo y Síndrome parapléjico» en áreas de ganadería extensiva en el estado Bolívar. En: Aspectos de Sanidad Animal en Áreas Afectadas por el Síndrome Parapléjico del Bovino. Programa de Cooperación Agrícola Convenio MAC/PDVSA. Boletín No.2. Impreso en Talleres Gráficos del FONAAP, 1500 ejemplares. Caracas (Venezuela). (1993) Pág. 103-106.
- (14) SINGH, B. R.; LI, B. & READ, D. Botulinum Versus Tetanus Neurotoxins: Why is Botulinum Neurotoxin But Not Tetanus Neurotoxin a Food Poison? Journal Toxicol. (1995) 33(12):1541-1547.

- (15) BENAVIDES, E.; ORTIZ, D. & BENAVIDES, J. Association of Botulism and Tetanus as Causative Agents of an Outbreak of Bovine Paraplegic Mortality in the Eastern Plains of Colombia. In: "Tropical Veterinary Diseases. Control and Prevention in the Context of the New World Order" (House, J.A.; Kocan, K.M. & Gibbs, P.J., eds.) Annals of the New York Academy of Sciences (2000) 916, 646-649.