



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA EL BOTULISMO  
AVIAR Y SU APLICACIÓN PARA CONFIRMAR ESTA ENFERMEDAD EN AVES  
SILVESTRES ACUÁTICAS CON SIGNOLOGÍA CLÍNICA”**

**DIEGO MONTECINO LATORRE**

Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

**PROFESOR GUÍA: DR. HÉCTOR HIDALGO OLATE**

**SANTIAGO – CHILE**

**2010**



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA EL BOTULISMO AVIAR Y SU APLICACIÓN PARA CONFIRMAR ESTA ENFERMEDAD EN AVES SILVESTRES ACUÁTICAS CON SIGNOLOGÍA CLÍNICA”**

**DIEGO MONTECINO LATORRE**

Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

	CALIFICACIÓN	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. HECTOR HIDALGO O.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: DR. PEDRO ABALOS	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: DR. ANA MARÍA RAMÍREZ	_____	_____

**SANTIAGO – CHILE**

**2010**

A mis padres, Ruby Latorre Fuenzalida y Diego Montecino San Martín, porque como hijo, me siento afortunado de haber sido elegido por ustedes. Gracias por su paciencia en tiempos no muy iluminados.

A mi tía, porque creo en su amor.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Héctor Hidalgo Olate, mi profesor guía, por haber creído y apoyado en todo momento, mi intención de entregar un aporte a la medicina de fauna silvestre en Chile, sin importar las dificultades técnicas ni de presupuesto que se presentaron. Agradezco que haya podido apreciar y reconocer mis cambios durante una etapa de maduración personal y elección de camino.

Para la realización de esta memoria fue necesaria la colaboración, tanto directa e indirecta, de varias personas que desinteresadamente me entregaron su apoyo, sin el cual, este trabajo no habría sido posible. Comienzo con la gente del Servicio Agrícola Ganadero, específicamente el personal del SAG Metropolitano: Loreto Álvarez, don Jorge Juri, Rogelio Urrutia y Julio Bustamante. Les agradezco toda su buena voluntad y les doy mis respetos por la relevancia que tiene el trabajo que realizan día a día. Agradezco a la doctora Tonie Rocke, de la National Wildlife Health Center, por habernos facilitado la antitoxina botulínica tipo C, y a Scott Taylor, de este mismo organismo, por haber gestionado con tanta paciencia e interés el envío de la misma desde Estados Unidos a Chile. Así mismo, doy mis gracias a Francisca Izquierdo, por ayudarme en la toma de muestras. También a Jurgen Rottman y a Ignacio Canales de Mundo Granja, por haber dispuesto de las aves domésticas utilizadas en esta investigación. A los doctores Claudia López y Marcelo Mezzano, del Instituto de Salud Pública, por las facilidades otorgadas para obtener y mantener en buenas condiciones a los ratones utilizados en los bioensayos. Debo dar las gracias a Miguel Martínez, del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, por todas las gestiones que realizó para poder contar con los reactivos necesarios para el desarrollo de esta memoria. Finalmente, agradezco al personal del Laboratorio de Patología Aviar, en especial a Fernando Navarrete y Ramón Molina, por su asistencia durante el desarrollo de la parte experimental.

Mención aparte para el Dr. Santiago Urcelay, a quien agradezco la confianza completamente ciega que tuvo en mí desde el primer minuto, como también su real y desinteresada preocupación por mi desarrollo personal y académico. Debo dar las gracias a Gabriel, Raúl y Tadaishi, por entregarme un camino profesional y su amistad, la cual que me permite estar rodeado de gente de una inmensa calidad humana. A los zorros, esos que se cuentan con los dedos de una mano, por su paciencia, por su amistad durante ya muchos años y la permanente alegría que irradian. A mis padrinos, Cecilia y Ronaldo, por ser una inspiración de cómo vivir. Finalmente a ti, por todo lo que representas en mi vida.

## RESUMEN

El método de diagnóstico del botulismo conocido como Prueba de Protección en Ratón (PPR) fue implementado para su futuro uso frente a la sospecha de esta enfermedad durante brotes de mortalidad en aves silvestres acuáticas en Chile. Este bioensayo consiste en inocular un par de ratones (*Mus musculus*) con el suero de un ave sospechosa de presentar la enfermedad, siendo uno de ellos previamente protegido con la antitoxina correspondiente. Se considera un suero como positivo si el ratón no protegido muere y el ratón protegido vive. Debido a que la gran mayoría de los brotes de botulismo en aves son causados por la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub>, decidimos implementar la PPR con la antitoxina tipo C. Para validar este diagnóstico se generaron experimentalmente, a partir de patos domésticos sanos, sueros positivos y negativos a la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub>. Se utilizaron cuatro grupos de ratones; dos grupos fueron inoculados con suero positivo, siendo uno de ellos previamente protegido con la antitoxina tipo C; el otro grupo fue inoculado con suero fisiológico. La misma operación se realizó con los dos grupos de ratones restantes inoculados con suero negativo. Luego de obtener el resultado esperado, es decir, el grupo de ratones inoculados con suero positivo a la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> e inyectados previamente con suero fisiológico murieron mostrando la signología característica, mientras que los ratones de los otros 3 grupos vivieron, aplicamos la PPR con sueros provenientes de aves acuáticas silvestres sospechosas de presentar botulismo aviar tipo C. Los sueros obtenidos a partir de aves capturadas en el humedal Laguna de Batuco y en el tranque de Relave Las Tórtolas resultaron negativos, sin embargo, los sueros de patos domésticos capturados en un Fundo Pangalillo, Melipilla, resultaron positivos, reportándose así el primer diagnóstico de botulismo aviar tipo C en Chile.

## SUMMARY

The diagnostic method known as Mouse Protection Test (MPT) was implemented for its future use in front of the suspect of this disease during mortality outbreaks in aquatic wild birds in Chile. This bioassay consists in the inoculation of a pair of mice (*Mus musculus*) with the serum of a bird suspicious of having the disease, being one of them previously protected with the corresponding antitoxin. A serum is considered positive if the non protected mouse dies and the protected one lives. Due that most of avian botulism outbreaks are caused by botulinum toxin type C<sub>1</sub>, we decided to implement the MPT with the antitoxin type C. To validate this diagnostic, from healthy domestic ducks, positive and negative serums to the botulinum toxin type C<sub>1</sub> were experimentally generated. Four groups of mice were used; two groups were inoculated with positive serum, being one of them previously protected with antitoxin type C; the other group was inoculated with physiologic serum. The same operation was executed with the two remaining groups inoculated with negative serums. After getting the expected result, that is to say, the group of mice inoculated with serum positive to the botulinum toxin type C<sub>1</sub> and previously injected with physiologic serum died showing the characteristic clinical signs, while the mice of the another three groups lived, we applied the MPT with the serums from aquatic wild birds suspicious of avian botulism type C. The serums obtained from birds captured in Laguna de Batuco wetland and Las Tórtolas tailings pond were negative, however, the serums from domestic ducks captured in Pangalillo, Melipilla, were positive, reporting the first diagnosis of avian botulism type C in Chile.

## INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. OBJETIVO GENERAL.....	34
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6. RESULTADOS.....	43
7. DISCUSIÓN.....	46
8. CONCLUSIONES.....	49
9. BIBLIOGRAFÍA.....	50

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se afronta una importante pérdida de biodiversidad y rápidas alteraciones en las condiciones ambientales ocasionadas por las actividades humanas. El aumento de temperatura es quizás el aspecto más conocido, pero éste es sólo uno más de los distintos componentes del cambio global. La transformación del hábitat y variaciones en el uso de suelo, la intensificación de las actividades agrícolas y ganaderas y la introducción (intencionada o no) de especies fuera de su área de distribución, así como la extinción de especies y pérdida de la biodiversidad son otros componentes de este cambio (Figuerola y Soriguer, 2006).

Las poblaciones de muchas especies se han reducido de manera tan importante por otras actividades humanas que la aparición de una enfermedad puede ser sencillamente el factor aleatorio que las lleve a su desaparición. En el caso de las aves, los continuos cambios del paisaje debido a las demandas espaciales para la vida humana y otras necesidades básicas, han alterado la distribución geográfica de las poblaciones, y han producido su agregación, aumentando la frecuencia de aparición y la capacidad de dispersión de las enfermedades por encima del nivel que se daba en siglos anteriores (Figuerola y Soriguer, 2006).

Las aves representan el segundo grupo más numeroso de vertebrados de Chile. En el país existen alrededor de 460 especies, de las cuales aproximadamente un 60% es residente y sólo 2% (10 especies) corresponden a especies endémicas. Sin embargo, si se considera la zona correspondiente al cono sur de Sudamérica (Patagonia Chileno-Argentina), el porcentaje de endemismo aumenta hasta alcanzar niveles de un 60%. Por lo tanto, la conservación de las aves en Chile no sólo representa una labor de interés local sino que constituye además una actividad de gran relevancia global (Estades, 2004).

El botulismo aviar, actualmente destaca como uno de los problemas principales para las poblaciones de aves silvestres a nivel mundial, debido a la magnitud de las pérdidas, la frecuencia anual de epizootias y el continuo aumento del área geográfica de ocurrencia (Rocke y Friend, 1999). En algunos años se ha estimado que más de un millón de aves acuáticas han muerto por botulismo, brotes con pérdidas de 50 mil aves o más son relativamente comunes y ciertos humedales experimentan pérdidas casi todos los años (Locke y Friend, 1989). En una base mundial, el botulismo aviar es la enfermedad más importante de las aves migratorias, especialmente en patos, cisnes, gansos (waterfowl en inglés) y aves costeras (Rocke y Bollinger, 2007).

El botulismo aviar es una enfermedad usualmente fatal que se produce cuando las aves ingieren la toxina producida por la bacteria *Clostridium botulinum*. Ésta altera la función de los



nervios periféricos y genera parálisis de los músculos voluntarios. Las aves usualmente se ahogan o mueren por falla respiratoria (Rocke y Friend, 1999). Siete tipos distintos de toxina designadas con las letras A a G han sido identificadas en base a su antigenicidad (Smith y Sugiyama, 1988). Los brotes de mortalidad en las aves debido a botulismo son usualmente causados por la toxina tipo C<sub>1</sub>. Las aves acuáticas sufren la mayoría de las pérdidas, pero probablemente todas las especies son susceptibles a esta toxina con la excepción de los buitres (Rocke y Friend, 1999).

En Chile, desde el año 2005 el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) ha detectado brotes de alta mortalidad en aves acuáticas silvestres, los cuales han sido atribuidos al botulismo. Estos eventos han ocurrido en el humedal Laguna de Bатуco y en las Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas La Cadellada y La Farfana, reportándose la muerte de hasta 2.150 aves silvestres en uno de estos episodios (Gallardo *et al.*, 2007) y la muerte de 3.170 aves silvestres durante el período 2005 – 2007 en dichos lugares (Hidalgo *et al.*, 2008).

A pesar de la importante mortalidad atribuida a esta enfermedad, Chile no contaba con una prueba toxicológica objetiva y estandarizada que permitiera confirmar o descartar la responsabilidad de la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> en los brotes que han ocurrido y que continuarán presentándose. Es así como el SAG y la ONG AvesChile basaron el reconocimiento de esta enfermedad sólo en diagnósticos presuntivos; por los signos clínicos y el descarte de otras patologías.

Con la intención de solucionar el vacío existente en el diagnóstico del botulismo aviar en Chile, este trabajo propuso la implementación de la prueba conocida como “Mouse-Protection Test” o Prueba de Protección en Ratón. Esta prueba es el método empleado y recomendado por la National Wildlife Health Center (NWHC) (Rocke y Friend, 1999) y por Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (CDC, 1998) para el diagnóstico de esta enfermedad en los Estados Unidos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.- ETIOLOGÍA

El botulismo, tanto en seres humanos como en animales, es causado por neurotoxinas que son producidas por un grupo heterogéneo de bacterias conocidas como *Clostridium botulinum* (Rocke y Bollinger, 2007), aunque se ha detectado la producción de neurotoxinas por el *Clostridium butyricum* (Aurelli *et al.*, 1986) y el *Clostridium baratii* (Hall *et al.*, 1985). La enfermedad es una típica intoxicación por alimentos resultante de la ingestión de elementos que contienen la toxina, pero también puede ser producida como una toxiinfección (bacterias productoras de toxina colonizan el tracto intestinal de un individuo) o cuando infectan secundariamente una herida (Rocke y Bollinger, 2007).

Las toxinas botulínicas son las neurotoxinas más letales conocidas para el hombre y animales. Éstas se unen selectivamente a los terminales nerviosos presinápticos colinérgicos y bloquean la liberación de acetilcolina (Ohishi *et al.*, 1979). A lo menos existen 7 diferentes, las cuales han sido designadas como tipo A, B, C<sub>1</sub>, D, E, F y G (Sakaguchi, 1983). Estos 7 serotipos de *Clostridium botulinum* no pueden ser distinguidos en base a sus características morfológicas, sin embargo, las neurotoxinas que producen son serológicamente distintas (Smith y Sugiyama, 1988). Cada tipo es único en su distribución geográfica y en las especies que son susceptibles a su acción. Las toxinas A, B, E y F causan botulismo tanto en humanos como en animales, mientras que los tipos C<sub>1</sub> y D provocan botulismo principalmente en animales (Rocke y Friend, 1999). Los organismos que producen la toxina G han sido experimentalmente aislados desde la tierra, pero no se han reportado brotes de botulismo generados por su neurotoxina (Jin *et al.*, 2009). La mayoría de los brotes de botulismo en las aves son causados por la toxina tipo C<sub>1</sub> (Rocke y Friend, 1999), pero muertes esporádicas entre las aves ictiófagas, como las gaviotas (*Larus sp.*), han sido causadas por la toxina tipo E (Reed y Rocke, 1992).

Los organismos que componen este grupo bacteriano conocido como *Clostridium botulinum* se caracterizan por ser bacilos Gram positivos y presentar endoesporas subterminales ovoides. En cultivo, las células varían considerablemente en tamaño, desde 2 a 22 µm de largo y 0,5 a 2 µm de ancho, dependiendo del medio de cultivo y otros factores (Cato *et al.*, 1986). La bacteria vegetativa es móvil por medio de un flagelo y puede presentarse de forma individual o en cadenas cortas (Rocke y Bollinger, 2007).

Como otros clostridios, los serotipos de *Clostridium botulinum* son anaerobios estrictos que pueden sobrevivir en condiciones ambientales extremas produciendo esporas, las cuales son

resistentes al calor y a la desecación y pueden permanecer viables por años (Hofer y Davis, 1972). Las esporas de *Clostridium botulinum* están ampliamente distribuidas en los suelos y sedimentos de humedales a través del mundo (Smith y Sugiyama, 1988).

El *Clostridium botulinum* es inofensivo en el estado de espora; la toxina es producida solo luego de que éstas germinan y las células están creciendo activamente y multiplicándose (Rocke y Friend, 1999). La toxina es liberada cuando las células sufren autólisis (Simpson, 2004). En los medios de cultivo el título de toxina es bajo durante la fase log de crecimiento, pero aumenta cuando el crecimiento celular cesa y las membranas celulares se rompen (Niemann, 1991). Destaca el hecho que la toxina no posee ningún rol en el crecimiento ni en la fisiología de la bacteria, y muchos aislados naturales de *Clostridium botulinum* no producen la toxina (Rocke y Bollinger, 2007). Sin embargo, la liberación de una neurotoxina mata animales cuyos cadáveres pueden apoyar el crecimiento de millones de clostridios, por lo tanto, la producción de toxina sería funcional en el ciclo de vida de un anaerobio estricto (Schiavo *et al.*, 2000).

El crecimiento vegetativo del *Clostridium botulinum* y la producción de neurotoxina es afectada por muchos factores incluyendo la temperatura (Smith y Turner, 1987), pH, potencial de oxidación-reducción (Smith y Pierson, 1979), y la presencia de un medio de crecimiento favorable que contenga los aminoácidos apropiados (Leyer y Johnson, 1990).

El Manual de Bacteriología Sistemática (Cato *et al.*, 1986) categoriza los serotipos de *Clostridium botulinum* en 4 grupos (I-IV), basado en sus características fisiológicas y de cultivo (Tabla 1).

GRUPOS CLOSTRIDIUM BOTULINUM				
	I	II	III	IV
TIPO TOXINA	A,B,F	B,E,F	C,D	G
LIPASA	+	+	+	-
GLUCOSA	+	+	+	-
T° CRECIMIENTO °C				
OPTIMA	5 - 40	18 – 25	40	37
MINIMA	12	3,3	15	
RESISTENCIA ESPORAS °C	112	80	104	104
GEN TOXINA	CELULA	CELULA	BACTERIOFAGO	CELULA

Tabla 1. Características de las bacterias que producen neurotoxina botulínica. (Modificado de Hatheway, 1995).

Las cepas de *Clostridium botulinum* tipo C tienden a tener una temperatura de crecimiento dentro de un rango más elevado que los otros serotipos. La temperatura óptima para el crecimiento del tipo C es de 40° C (Smith y Sugiyama, 1988), y no crece correctamente a temperaturas menores de 15° C (Segner *et al.*, 1971). El serotipo C es levemente proteolítico y no digiere estratos proteicos complejos como carne cocida, huevo coagulado, suero y leche, a diferencia de otros serotipos. La glucosa u otros carbohidratos son requeridos como fuente de energía y son necesarios para el crecimiento y multiplicación de la bacteria (Rocke y Bollinger, 2007). Debido a que no puede sintetizar ciertos aminoácidos, la bacteria requiere de un sustrato altamente proteico para su replicación (Rocke y Friend 1999).

Las esporas de *Clostridium botulinum* tipo C se encuentran principalmente en los hábitat de agua dulce y pueden ser encontrados en invertebrados (Eklund y Poysky, 1970), incluyendo insectos acuáticos, moluscos y crustáceos (Rocke y Friend, 1999) y en tejidos de vertebrados (Reed y Rocke, 1992), incluyendo aves sanas (Rocke y Friend, 1999). Ocasionalmente, las esporas del *Clostridium botulinum* tipo C son encontradas en ambientes marinos (Rocke y Bollinger, 2007).

Los serotipos C y D difieren de los otros tipos de *Clostridium botulinum* en que la producción de la neurotoxina depende de la presencia de bacteriófagos específicos que infectan la bacteria. El análisis de hibridación demostró que el gen estructural para la neurotoxinas C<sub>1</sub> y D está localizado en el genoma de los bacteriófagos TOX+ (Fujii *et al.*, 1988), cuyo material genético corresponde a ADN de doble hebra (Sakaguchi *et al.*, 2005). Cuando los serotipos C y D son curados de la infección del bacteriófago con radiación UV o por tratamiento con naranjo de acridina, éstos pierden la habilidad para producir neurotoxinas C<sub>1</sub> o D. Los serotipos curados vuelven a producir toxina sólo una vez que son re infectadas con ciertos bacteriófagos (TOX+) derivados del "stock" toxigénico parental (Eklund *et al.*, 1971; Eklund *et al.*, 1972). Algunas cepas tipo C y D curadas de sus bacteriófagos, continúan produciendo bajas cantidades de otra toxina, designada como C<sub>2</sub> (ver más adelante). Estas cepas curadas tipo C y D se vuelven indistinguibles respecto a la toxina producida (Eklund y Poysky, 1972). Los bacteriófagos TOX+ aislados de ciertas cepas del serotipo D, pueden infectar ciertas cepas del serotipo C no toxigénicas e inducirlas a producir toxina tipo D, y bacteriófagos TOX+ aislados de ciertas cepas del serotipo C, pueden infectar ciertas cepas del serotipo D e inducirlas a producir toxina tipo C<sub>1</sub>. Estas evidencias sugieren que los serotipos C y D podrían generarse de una cepa curada (Eklund y Poysky, 1974).

Debido a que la relación con el hospedero bacteriano tipo C y D es inestable, los fagos TOX+ han sido descritos comoseudolisogénicos (Eklund *et al.*, 1987), pues pueden suprimir la lisis de las células a través de varias generaciones (Eklund *et al.*, 1989). La replicación de la bacteria que contiene bacteriófagos seudolisogénicos puede resultar en bacterias no infectadas y en

bacterias que sufren lisis y liberan bacteriófagos, así como también en células intactas que contienen el bacteriófago. La estabilidad de la relación entre el bacteriófago y el hospedero depende de la cepa, de las condiciones ambientales como la temperatura, la fase de crecimiento de la bacteria (Eklund *et al.*, 1989) y la salinidad (Eklund y Poysky, 1974).

Un mecanismo similar para la producción de toxina tipo A, B, E y F no ha sido descubierto (Eklund *et al.*, 1989). La producción de toxina en estos tipos es mucho más estable que en los tipos C y D, los cuales poseen predisposición a perder su toxicidad luego de algunos pasajes (Rocke y Bollinger, 2007). A pesar de las diferencias en la localización del gen de la toxina, los 7 tipos de neurotoxina de *Clostridium botulinum* poseen una estructura similar, y consecuentemente, una acción farmacológica similar.

Un aspecto único de las cepas de *Cl. botulinum* tipo C y D es que muchas cepas producen otra toxina, designada C<sub>2</sub>, que no actúa en el sistema nervioso. Las cepas del tipo C puede que produzcan ambas C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> o sólo una de ellas. C<sub>2</sub> es una toxina altamente letal cuando es inyectada en animales de laboratorio causando un incremento en la permeabilidad vascular que induce hemorragia pulmonar y edema (Rocke y Bollinger, 2007). Es producida como una protoxina que requiere de tratamiento con tripsina para que pueda demostrarse su toxicidad (Eklund y Poysky, 1972). A diferencia de la neurotoxina, el gen para la toxina C<sub>2</sub> está localizado en el genoma bacteriano y no en un bacteriófago (Simpson, 1989). A pesar que la toxina ha sido implicada en la patogenia del botulismo en algunos animales como caballos, su rol en el botulismo aviar, si existe, aún es desconocido (Rocke y Bollinger, 2007).

El esquema que clasifica las cepas en base al tipo de toxina que producen está siendo cuestionado. El supuesto valor de este esquema surgió de la creencia que cepas individuales podían sintetizar y liberar solo un tipo de toxina. Ahora se sabe que esto es incorrecto. Hay al menos 3 situaciones en que la regla “una cepa – una toxina” no se cumple. Lo más obvio es que hay cepas que no son toxigénicas, las cuales crecen y multiplican normalmente (Simpson, 1981). La segunda situación es que hay cepas que producen más de una toxina como ocurre con las toxinas C<sub>1</sub> y D (Eklund y Poysky, 1974). La tercera es que recientemente se han aislado cepas de *Clostridium botulinum* que contienen la información genética necesaria para sintetizar una toxina botulínica que es un mosaico del tipo C<sub>1</sub> y D (Takeda *et al.*, 2005).

## 2.2.- ESPECIES AFECTADAS

En la naturaleza, las aves acuáticas sufren las mayores pérdidas (Rocke y Friend, 1999). Una revisión de la literatura desde 1987 junto con 2 mil reportes de diagnóstico confirmado de botulismo tipo C, entregaron un total de 263 especies aviares en 39 familias que se cree han muerto por esta enfermedad. Sin embargo, la frecuencia de ocurrencia de esta intoxicación varía considerablemente entre las especies. Las más afectadas son: anseriformes, charadriiformes y podicipediformes (Rocke y Friend, 1999). Una notable ausencia en esta lista son algunos carroñeros, como cuervos y buitres. Probablemente todas las aves son susceptibles a la toxina botulínica tipo C con la excepción de estas últimas, posiblemente por la ausencia de receptores de membrana específicos (Rocke y Bollinger, 2007).

## 2.3.- DISTRIBUCIÓN

Los brotes de botulismo tipo C han sido reportados en las aves silvestres en todos los continentes, excepto en la Antártica, y por lo menos en 28 países (Rocke y Bollinger, 2007). Los biólogos primero notificaron una “enfermedad misteriosa” en los estados occidentales de los Estados Unidos, que provocó pérdidas desastrosas durante el período de 1909 – 1913, estimadas en millones de aves (Kalmbach, 1968). Los primeros brotes ocurridos en aves silvestres fuera de Norteamérica fueron registrados en Rusia en 1957 (Kuznetzov, 1992), posteriormente en Suecia en 1963, y Dinamarca en 1965 (Jensen y Price, 1987). Le siguió Inglaterra en 1969 y Holanda en 1970 (Jensen y Price, 1987). Durante este período, la enfermedad fue reconocida también en Sudáfrica en 1965, Nueva Zelanda en 1971 (Jensen y Price, 1987), y Japón en 1973 (Skulberg y Holt, 1987). Más tarde en España en 1975 (León *et al.*, 1979), Argentina en 1979 (Polero *et al.*, 1980), y Brasil en 1981 (Schonhofen y Ferreira, 1981), a pesar que ninguno de los brotes descritos fue tan grande como aquellos reportados al mismo tiempo en Norteamérica.

Los otros países donde han ocurrido brotes de botulismo son: Alemania, Australia (Woodall, 1982), China (Li, 1990), Chekoslovakia, Escocia, (Jensen y Price, 1987), Francia (Jubilo y LaMarque, 1998), Holanda (Jensen y Price, 1987), Hungría (Mikuska *et al.*, 1986), Israel (Gophen *et al.*, 1991), Italia, México, Noruega (Skulberg y Holt, 1987), Uruguay (Jensen y Price, 1987), Venezuela (Leon *et al.*, 1989) y Yugoslavia (Mikuska *et al.*, 1986). La mayoría de estos reportes son recientes, usualmente dentro de los últimos 30 años (Rocke y Friend, 1999).

## 2.4.- EPIZOOTIOLOGÍA DEL BOTULISMO AVIAR

La investigación cuantitativa de las enfermedades en aves de vida libre está limitada por nuestra inhabilidad para determinar con precisión varios parámetros epidemiológicos importantes: el índice de casos, el primer caso mortal en un brote, la morbilidad, la mortalidad, el número de animales enfermos o muertos por número en riesgo; y el sitio de exposición al agente causal de la enfermedad. Esta información es necesaria para evaluar la significancia de un evento en una población y para comparar brotes en diferentes lugares y tiempos (Rocke y Brand, 1994). Mucho del conocimiento colectivo sobre el botulismo aviar deriva de las observaciones de los brotes masivos en las aves acuáticas en los humedales del oeste de Norteamérica. Sin embargo, cada vez es más claro que la epizootiología del botulismo en aves es más compleja de lo que se creía y también bastante diversa, dependiendo del número de factores, que incluyen las condiciones ambientales locales y los eventos climáticos, como también la conducta forrajera de las especies de aves involucradas (Rocke, 2006).

El *Clostridium botulinum* requiere un ambiente privado de oxígeno, así como también de otras condiciones ambientales apropiadas para lograr la germinación de las esporas, la replicación celular, y por ende que ocurra la producción de toxina (Rocke y Bollinger, 2007). Como con la mayoría de las bacterias, la temperatura juega un rol crítico en la multiplicación de *Clostridium botulinum*. Muchos de los brotes tipo C en las aves ocurren durante el verano y otoño, cuando las temperaturas ambientales son más altas (Rocke y Friend, 1999), sin embargo, la evidencia sugiere que en algunos humedales puede persistir la toxina preformada durante el invierno, y así causar brotes durante invierno o primavera.

### 2.4.1.- Botulismo en aves acuáticas asociadas con humedales.

La mayoría de las grandes mortalidades (pérdidas de 100 mil o más aves) han ocurrido en los humedales de Norteamérica. En algunos de estos lugares se han reportado más de un millón de aves muertas por brotes localizados de botulismo aviar tipo C. Brotes con pérdidas de 50 mil aves o más son relativamente comunes. Sin embargo, las pérdidas varían en un amplio rango de un año a otro. Solo unos pocos centenares de aves pueden morir en un humedal, mientras que en el mismo lugar decenas de miles podrían fallecer al año siguiente (Rocke, 2006).

Los brotes de botulismo aviar pueden ocurrir en humedales sin registro previo de la enfermedad, son impredecibles, ocurren anualmente en algunos humedales pero no en los adyacentes que presentan hábitat y patrones de uso aviar similar (Rocke, 2006). Estos lugares cercanos parecen ecológicamente similares, por ende, existen características desconocidas que juegan un rol importante en los brotes (Sandler *et al.*, 1993).

Las esporas o células de *Clostridium botulinum* tipo C están ampliamente distribuidas en los humedales que las aves frecuentan (Wobeser *et al.*, 1987). Las esporas pueden ser llevadas en los tejidos de éstas (Reed y Rocke, 1992) y pueden ser distribuidas a nuevos ambientes a través de sus heces (Matveev y Konstantinova, 1974). La evidencia disponible sugiere que las aves pueden ser hospederos temporales del *Clostridium botulinum*, con pocos o sin ningún síntoma de enfermedad. Esta relación hospedero parásito puede contribuir significativamente a la distribución geográfica de esta bacteria (Ohishi *et al.*, 1979). La alta prevalencia de esta bacteria ha sido reportada en los sedimentos de humedales en California, Estados Unidos (Sandler *et al.*, 1993), Saskatchewan, Canadá (Wobeser *et al.*, 1987), y en muchos otros lugares (Azuma y Itoh, 1987). Sandler *et al.* (1993) realizaron un estudio en 10 pantanos dentro de un complejo de humedales de unos 40 km<sup>2</sup> en California, Estados Unidos. La hipótesis consistía en que la prevalencia de esporas de *Clostridium botulinum* estaba directamente asociada con la probabilidad de los brotes, pero no encontró tal relación, es decir, la prevalencia de las esporas botulínicas no difería entre los pantanos con o sin brotes. La ocurrencia de los brotes de botulismo probablemente no está limitada por el número de esporas o de aves susceptibles, los cuales son abundantes en los humedales (Williamson *et al.*, 1999). Los bacteriófagos por su abundancia tampoco son considerados como un factor limitante (Rocke y Friend, 1999).

Bell *et al.* (1955) establecieron 2 hipótesis para explicar la ocurrencia de los brotes de botulismo. La primera llamada “cama de lodo”, sugería que grandes cantidades de materia orgánica en descomposición lleva a una disminución de oxígeno, lo que permite la germinación de las esporas botulínicas que están en un ambiente de elevada temperatura y pH. Posteriormente, las células en estado vegetativo comienzan a producir la toxina. La segunda, el “concepto de microambiente”, proponía que estas condiciones pueden matar invertebrados, otorgando microambientes favorables para que el *Clostridium botulinum* tipo C germine, se reproduzca y sintetice su toxina en cantidades pequeñas, independientemente de las condiciones ambientales.

Un estudio de las características del sedimento y del agua en 32 pares de humedales (16 con brotes de botulismo y 16 humedales control) en 9 estados de Estados Unidos (Rocke y Samuel, 1999) demostró que el riesgo de brotes de botulismo en los humedales está asociado con varias características medibles. En general, el riesgo estaba fuertemente asociado con el pH, siendo mayor cuando el pH del agua estaba entre 7.5 y 9. Sin embargo, el efecto del pH estaba influenciado por la temperatura del agua y el potencial redox. El riesgo aumentaba cuando el potencial redox era negativo (-200 mv), y la temperatura del agua era mayor a 20°C a pesar de que el pH no estuviese en rango óptimo, y disminuía cuando el potencial redox era positivo (mayor a +100 mv), y la temperatura del agua era baja (10-15°C), aún cuando el pH estuviera en el rango de mayor riesgo.



Los autores advirtieron que a pesar de que sus modelos identificaban condiciones en los humedales potencialmente importantes asociadas con el riesgo de brotes de botulismo, no debían usarse para predecir la probabilidad de un brote en un humedal específico, pero sí para determinar riesgo relativo o potencial (alto, medio, bajo). Incluso, cuando las condiciones del humedal son permisivas e indicativas de alto riesgo de un brote, otros factores, como la densidad de los invertebrados, la abundancia de aves, y otras características del sedimento y del agua, probablemente interactúan para determinar si el botulismo efectivamente se desencadena en un humedal específico y pueden además influenciar en su severidad. Por ejemplo, en un estudio, *Rocke et al.*, (1999) encontraron que la probabilidad de botulismo en patos de collar (*Anas platyrhynchos*) centinelas estaba asociada con un aumento de la temperatura, de la abundancia de invertebrados o biomasa, y con una disminución de la turbidez.

Los humedales con salinidad aumentada (> 2 ppt) tienen un mayor riesgo de presentar un brote de botulismo. El riesgo disminuye en agua fresca (< 1 ppt) y en aguas altamente salinas (> 5 ppt) (*Rocke y Samuel*, 1999). Bajo condiciones de laboratorio, la adición de cantidades reducidas de sal (< 2%) promueve y estabiliza la relación hospedero-bacteriófago que lleva a la producción de toxina (*Eklund y Poysky*, 1974).

Actualmente, los mecanismos para la compleja asociación entre las condiciones ambientales y el riesgo de botulismo aviar no están claros. Presumiblemente, las condiciones del humedal permiten el crecimiento bacteriano y la producción de toxina, generando una situación de alto riesgo, pero para que un brote realmente ocurra, los alimentos tóxicos deben ser encontrados y digeridos por las aves.

En algunas instancias, la materia orgánica en descomposición que contiene la toxina puede ser directamente digerida por las aves. A pesar de que este mecanismo de transferencia no ha sido claramente demostrado en brotes naturales (*Rocke y Bollinger*, 2007). En otras instancias, las aves acuáticas pueden ser envenenadas secundariamente debido al consumo de zooplankton (*Neubauer et al.*, 1988) o de invertebrados (*Rocke y Bollinger*, 2007) del humedal que inadvertidamente consumen material tóxico. El ciclo cadáver-larva, descrito con detalle más adelante, es un ejemplo clásico de intoxicación secundaria a través del consumo de larvas de moscas y otros invertebrados con carga tóxica.

La conducta alimenticia aparece como el factor de riesgo más significativo para la ingestión de la toxina botulínica. Las aves chapoteadoras y que filtran su alimento, como los patos de collar (*Anas platyrhynchos*), están entre las especies con mayor riesgo de contraer el botulismo tipo C (*Rocke y Friend*, 1999). Estas aves presentan una alta probabilidad de encontrar una amplia variedad de materia orgánica en descomposición o invertebrados muertos que pueden contener

niveles tóxicos suficientes para provocar botulismo (Rocke y Bollinger, 2007). Las aves costeras que se alimentan cerca de la superficie del sustrato de los humedales, presentan un mayor riesgo de ingerir toxina botulínica que aquellas especies que buscan comida en el sedimento más profundo y es poco probable que éstas últimas sean menos susceptibles, sino que están menos expuestas a la toxina (Adams *et al.*, 2003). Las aves que se alimentan en el límite de los lagos, en aguas poco profundas y que son más tibias, han presentado un alto porcentaje de afección en ciertos brotes (Galvin *et al.*, 1985).

En dos estudios (Reed y Rocke, 1992; Rocke y Brand, 1994), se comunicó que los patos de collar (*Anas platyrhynchos*) machos se enfermaron o murieron de botulismo, en mayor proporción que las hembras. Estas diferencias en las tasas de intoxicación pueden haber resultado por preferencias sexuales en hábitos alimenticios, o por diferencias fisiológicas entre los sexos en la absorción de la toxina botulínica (Rocke y Brand, 1994).

#### 2.4.2.- Ciclo cadáver-larva del botulismo.

Las aves acuáticas y otros vertebrados inadvertidamente ingieren esporas botulínicas mientras se alimentan y las transportan por un período en sus tejidos. En un estudio en California, Estados Unidos, las esporas de botulismo tipo C fueron detectadas en el hígado o intestino en alrededor del 50% de los patos de collar sanos muestreados en un humedal propenso al botulismo (Reed y Rocke, 1992). Cuando estas aves mueren por cualquier razón, hay putrefacción e invasión del *Clostridium botulinum* desde el intestino hacia los tejidos. El ambiente anaeróbico y la rica fuente de proteínas de los cadáveres resulta óptimo para la germinación de las esporas, el crecimiento celular vegetativo y la producción de toxina (Rocke y Bollinger, 2007). Las aves acuáticas que se han alimentado en ambientes contaminados con esporas botulínicas y que han muerto por cualquier razón, presentan la misma probabilidad de iniciar brotes que aquellas aves que ingieren la toxina preformada y mueren por la enfermedad (Hunter *et al.*, 1970).

La densidad o abundancia de cadáveres durante la fase de iniciación de los brotes de botulismo aviar es, probablemente, un factor importante en determinar si un brote prosperará durante la fase de progresión (Soos y Wobeser, 2004). La fuente inicial de sustrato para la proliferación y toxigenesis del *Clostridium botulinum* en la fase de iniciación de los brotes de botulismo aviar generalmente no se conoce (Soos y Wobeser, 2004). En algunos lagos, durante el período de reproducción, la alta mortalidad de las aves juveniles acuáticas, como las Gaviotas de Franklin, coincide con los brotes de botulismo en patos (Soos, 2004). Las colisiones de las aves con los cables de corriente eléctrica han estado implicadas como un factor de iniciación en los brotes de botulismo en Montana, Estados Unidos (Malcolm, 1982). Las algas verde azules han estado asociadas a los brotes de botulismo aviar en Norteamérica que han resultado en millones

de aves muertas (Murphy, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que ciertos brotes de botulismo en aves acuáticas han comenzado y se han mantenido en la ausencia de cadáveres de vertebrados (Rocke y Brand, 1994).

A pesar que la mayoría de las aves no consumen directamente los cadáveres de otros vertebrados, si comerán fácilmente cualquier larva que caiga desde éstos (Rocke y Friend, 1999). Las larvas de mosca y otros invertebrados parecen no ser afectados con la toxina, y mientras se alimentan del cadáver en descomposición, pueden concentrarla (Rocke y Friend, 1999). Además pueden contener células bacterianas y esporas (Wobeser, 1987). Duncan y Jensen (1976) reportaron que los invertebrados acuáticos y terrestres que se encontraban normalmente en estrecha asociación con aves muertas y en descomposición, contenían toxina, señalando niveles de toxina tan altos como 409.600 dosis letales mínimas (DLM) de toxina en ratón, por gramo de larvas de mosca recolectadas desde los cadáveres de una variedad de aves. Se requiere de pequeñas cantidades de invertebrados para consumir una dosis fatal de toxina; según Hubalek y Halouzka (1991) basta con una larva de mosca y de acuerdo a Locke y Friend (1989) de 2 a 4. Son estas larvas las que presentan el mayor potencial para causar mortalidades masivas en las aves (Wobeser, 1997b). Esto se conoce actualmente como el ciclo cadáver-larva del botulismo aviar, y es la razón por la cual los brotes de esta enfermedad se perpetúan (Rocke y Friend, 1999).

Probablemente muchos factores juegan un rol en el ciclo cadáver-larva del botulismo, incluyendo condiciones ambientales como temperatura y la velocidad del viento, que facilita el depósito de los huevos por parte de las moscas, el desarrollo de las larvas, y la dispersión de éstas desde los cuerpos (Reed y Rocke, 1992). Sin embargo, el factor más crítico es la densidad de los cadáveres que son tóxicos, es decir, que contienen esporas de *Clostridium botulinum* tipo C, las cuales germinarán y producirán toxina (Reed y Rocke, 1992). En algunos estudios se encontró que entre el 85-90% de los cuerpos infectados con larvas, contenían larvas tóxicas (Duncan y Jensen, 1976) y en otro estudio esta tasa varió entre 29 y 69% (Reed y Rocke, 1992). A pesar que no todos los cadáveres de un humedal serán infestados por las larvas o producirán larvas tóxicas, los factores que reducen la disponibilidad de cuerpos en descomposición, como la presencia de carroñeros o la recolección artificial de los cadáveres, disminuye el riesgo a la exposición de la toxina botulínica por parte de las aves acuáticas (Reed y Rocke, 1992).

Wobeser (1997a) propuso que la dinámica del ciclo cadáver-larva del botulismo es muy similar al de una enfermedad infecciosa, y que la tasa reproductiva de la enfermedad (R) podía ser definida como el promedio de las intoxicaciones secundarias atribuibles a un solo cadáver introducido a un humedal. La producción de toxina y el botulismo ocurrirían comúnmente en menor grado en los humedales y los factores que influyen R determinan si la enfermedad se expande en una gran epizootia.

#### 2.4.3.- Brotes de botulismo en aves acuáticas durante invierno primavera.

Ocasionalmente los brotes de botulismo tipo C en las aves acuáticas han sido documentados a fines de invierno o a comienzos de primavera (Graham *et al.*, 1978; Wobeser *et al.*, 1983; Hubalek y Halouzka, 1991). Típicamente estos brotes son precedidos por una mortalidad en el mismo lugar en el otoño previo. La epidemiología de los brotes de invierno primavera no ha sido bien estudiada, a pesar que muchas observaciones son pertinentes (Rocke y Bollinger, 2007).

Wobeser *et al.* (1983) encontraron que los patos más afectados en un brote de primavera en Saskatchewan, Canadá, eran los patos zambullidores, mientras que los patos chapoteadores eran el 90% de las aves afectadas identificadas durante los brotes de otoño, a pesar que ambos tipos de patos estaban presentes tanto en otoño como en primavera. Se sugirió que el brote de primavera en los patos zambullidores ocurrió debido a larvas tóxicas que habían caído al fondo del humedal en el otoño anterior, y que fueron accesibles en la primavera solo para los zambullidores. Esta hipótesis fue apoyada por experimentos de laboratorio sobre la resistencia térmica de la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> (Hubalek y Halouzka, 1988), en los cuales suspensiones estériles de ésta eran mantenidas a varias temperaturas y su toxicidad era medida en ratones. A 5° C, el tiempo requerido para la reducir la toxicidad 100 veces era de seis meses, sugiriendo que en climas templados la toxina podía permanecer durante la estación de invierno y provocar la intoxicación durante principios de primavera. Hubalek y Halouzka (1991) realizaron experimentos con larvas tóxicas que colocaban en botellas perforadas que luego eran enterradas en los sedimentos de un humedal por todo el invierno, y demostraron que la toxina aún estaba presente 131 días después, pudiendo la ingesta de 10 larvas provocar botulismo, a pesar que los títulos de toxina cayeron unas 25 a 40 veces.

Al interior de los cadáveres en descomposición, la temperatura puede ser sustancialmente mayor que la del ambiente (Wobeser y Galmut, 1984b). El microclima generado dentro de los cadáveres puede influenciar el crecimiento bacteriano (Wobeser *et al.*, 1983) y puede entregar las condiciones apropiadas para la producción de toxina, permitiendo que ésta continúe durante el clima frío (Wobeser y Galmut, 1984b). El calor en los cadáveres probablemente se produce, al menos parcialmente, por la actividad metabólica de las larvas. El rol de las bacterias en la producción de calor es desconocido (Wobeser y Galmut, 1984b).

## 2.5.- SIGNOS CLÍNICOS

Las toxinas botulínicas interfieren con la transmisión en el sistema nervioso periférico, específicamente en los nervios colinérgicos del sistema nervioso motor y autonómico. Los signos clínicos reflejan este mecanismo de acción. La tasa a la cual los signos clínicos se desarrollan, su severidad y duración, y el tiempo de muerte o recuperación depende de una serie de factores, incluyendo la cantidad consumida y las especies afectadas (Rocke y Bollinger, 2007).

Durante un brote comúnmente se observan aves sanas, enfermas y recientemente muertas, junto con cadáveres en diversos estados de descomposición. Especies que representan 2, 3 o más órdenes de aves sufren pérdidas simultáneamente (Rocke y Friend, 1999).

En general las aves afectadas muestran signos de debilidad progresiva, paresis y parálisis flácida de los músculos esqueléticos. El signo más temprano de botulismo es la dificultad para volar (Haagsma *et al.*, 1972). Presentan dificultad para despegar y aterrizar, tienen un aleteo débil, y vuelan sólo por cortas distancias antes de detenerse (Rocke y Bollinger, 2007). La paresis de las piernas lleva a una marcha torpe e incluso a la imposibilidad de caminar. En esta condición las aves se propulsan a sí mismas por el agua y eventualmente en la tierra usando sus alas como “remos” (Rocke y Friend, 1999). Las aves acuáticas, como los patos, frecuentemente se impulsan fuera del agua hasta las orillas o a la vegetación. En estados tempranos de la enfermedad, incluso con parálisis significativa, las aves mantienen un estado de conciencia pleno. La enfermedad puede progresar afectando los músculos esqueléticos del cuello, condición referida como “limber-neck” (Rocke y Bollinger, 2007). Las aves en el agua pueden ahogarse porque son incapaces de mantener su cabeza sobre ésta (Rocke y Friend, 1999). Las aves tendidas expuestas al sol y al calor se deshidratan rápidamente. El viento, el calor excesivo y los climas inclementes pueden exacerbar los signos clínicos (Rocke y Bollinger, 2007).

Hunter *et al.* (1970) dividió a las aves afectadas en 3 categorías: Clase I: aves alertas y que pueden caminar pero no volar. Clase II: aves que presentan dificultad para caminar y para mantener la cabeza erecta; Clase III: aves postradas y casi totalmente paralizadas. Estas clases han sido utilizadas por los investigadores para evaluar las opciones de tratamiento y probabilidad de sobrevivencia.

El reflejo al tacto de la membrana nictitante desaparece gradualmente (Blaker, 1967), y las aves debilitadas frecuentemente presentan los párpados parcial o completamente cerrados. El fluido lagrimal puede acumularse y puede derramarse fuera de los márgenes de los ojos (Rocke y Bollinger, 2007). La anorexia (Smith *et al.*, 1975) y la diarrea verde (Rocke y Bollinger, 2007) han sido reportadas. La parálisis de los músculos esqueléticos relacionados con la respiración lleva a la

muerte de las aves por asfixia (Rocke y Friend, 1999). Las aves medianamente afectadas pueden recuperarse y otras aves pueden mostrar signos clínicos intermitentes.

Dado que la toxina botulínica también afecta la liberación de acetilcolina en el sistema nervioso autónomo, es dudoso que el rango completo de efectos fisiológicos y signos clínicos del botulismo en las aves hayan sido descritos; y alguno de estos efectos puede tener implicaciones en la sobrevivencia (Rocke y Bollinger, 2007). Cooch (1964) propuso que la toxina botulínica perjudicaba la función de la glándula de la sal debido a la inhibición de la liberación de la acetilcolina desde las fibras nerviosas parasimpáticas del nervio facial, el cual inerva esta glándula. Se requiere mayor investigación respecto al rango y duración de las alteraciones fisiológicas generadas en las aves intoxicadas con toxina botulínica tipo C (Rocke y Bollinger, 2007).

## 2.6.- PATOGÉNESIS

Las toxinas botulínicas son las sustancias más tóxicas conocidas, con una Dosis Letal 50 (LD50) en ratones entre 0,1 y 1,0 nanogramos (ng) por kilo de peso (Schiavo *et al.*, 2000). En las aves, la LD50 de la toxina C<sub>1</sub> por vía oral, parece ser bastante variable, con reportes tan bajos como 500 unidades LD50 intraperitoneales (IP) en ratón para las fúlicas americanas (*Fulica americana*) (Hunter *et al.*, 1970) hasta 2.500.000 dosis letales en ratón para las gaviotas (Haagsma, 1987). Las aves acuáticas, el grupo más afectado por el botulismo, parece ser sólo moderadamente susceptible a la toxina tipo C<sub>1</sub>, con una toxicidad reportada en el rango de 14.000 a 80.000 unidades LD50 IP en ratón por ave.

En base al peso corporal, la sensibilidad a la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> es similar entre las pocas especies probadas experimentalmente (36.000 a 43.000 unidades IP LD50 en Ratón) (Rocke *et al.*, 2000) (Tabla 2). Las toxicidades orales determinadas en diferentes pruebas experimentales son difíciles de comparar porque los resultados son dependientes del sustrato proteico en el cual la toxina es administrada; se han observado toxicidades mucho menores en aves que han sido alimentadas con toxina preparada en medio de cultivo versus la toxicidad observada en las suspensiones de larvas de moscas que contienen el mismo nivel de toxina (Rocke y Bollinger, 2007).

Pato de Collar ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	45.000 - 80.000	Hunter <i>et al.</i> , 1970
	20.000 - 80.000	Duncan y Jensen, 1976
	45.000	Martinez y Wobeser, 1999
Pato Rabudo ( <i>Anas acuta</i> )	16.000 - 76.000	Hunter <i>et al.</i> , 1970
	22.500	Martinez y Wobeser, 1999
Pato Colorado ( <i>Anas cyanoptera</i> )	30.000	Hunter <i>et al.</i> , 1970
Cerceta americana ( <i>Anas caroliniensis</i> )	17.000	Hunter <i>et al.</i> , 1970
	14.000	Rocke <i>et al.</i> , 2000
Fúlica americana	500	Hunter <i>et al.</i> , 1970

Tabla 2. Dosis oral tóxica de la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> para varias especies en unidades de LD50 IP en ratones.

Pese a las diferencias en la ubicación de la información genética de la toxina botulínica, los 7 tipos de neurotoxina botulínica poseen una estructura similar, y en consecuencia, una acción farmacológica análoga. La neurotoxina botulínica es sintetizada en el citosol bacteriano sin una secuencia líder (Schiavo *et al.*, 2000), y como una proteína de cadena simple inactiva con un peso molecular de 150 kDa (DasGupta y Sugiyama, 1972b). Después de la lisis de las células bacterianas, la proteína de cadena simple es liberada al medio y cortada por proteasas endógenas a la bacteria o por tripsina, en un loop de superficie expuesto (DasGupta y Sugiyama, 1972a). Así se genera la neurotoxina activa compuesta por una cadena H pesada (100 kDa) y una cadena liviana L (50 kDa), que están unidas por un puente disulfuro (DasGupta y Sugiyama, 1972b). La molécula de doble cadena está dividida en 3 dominios funcionales, que presentan roles diferentes en la generación de la parálisis flácida. La mitad carboxi-terminal de la cadena H (H<sub>C</sub>) es responsable de la unión específica con los receptores de las células nerviosas, y la mitad amino-terminal (H<sub>N</sub>) participa en la entrada hacia el citosol neuronal. La cadena L es la que presenta actividad enzimática y actúa intracelularmente para interrumpir la liberación del neurotransmisor acetilcolina (Montecucco y Schiavo, 1994).

La neurotoxina, tanto en sustratos naturales como cultivos *in vitro*, se encuentra generalmente asociada a una o más proteínas no tóxicas. Estos complejos tóxicos usualmente son bimoleculares o trimoleculares y varían en su peso molecular de 230 a 900 kDa (Sugiyama, 1980). Algunas de las proteínas no tóxicas poseen actividad hemaglutinina (HA) (Fujinaga *et al.*, 1997). Una proteína no HA grande de 139 kDa siempre está presente y es más conservada entre los diferentes serotipos de *Clostridium botulinum* que la misma neurotoxina en sí (Schiavo *et al.*, 2000) La toxina, que es un complejo tóxico formado por la neurotoxina y el componente no tóxico, parece proteger a la proteína toxica durante la exposición al ácido y enzimas proteolíticas del tracto

gastrointestinal mientras que el componente no tóxico se modifica ligeramente. Sin el complejo tóxico la neurotoxina sería digerida como la mayoría de las proteínas (Chen *et al.*, 1998). En condiciones de baja concentración de neurotoxina, el efecto protector de las proteínas no tóxicas podría ser sustancial (Maksymowych *et al.*, 1999). Cuando se administra por vía oral, los complejos tóxicos son considerablemente más tóxicos que la neurotoxina purificada, y los complejos trimoleculares son más tóxicos que los bimoleculares (Ohishi, 1984). El pH levemente alcalino del intestino causa la disociación del complejo liberando la neurotoxina (Schiavo *et al.*, 2000).

En las cepas de *Clostridium botulinum* tipo C son producidas 2 toxinas C<sub>1</sub> diferentes, con masas moleculares de aproximadamente 500 kDa (toxina 16S) y 300 kDa (toxina 12S). Cada toxina consiste de una neurotoxina y de componentes no tóxicos; la toxina 12S es un complejo de neurotoxina y de un componente no tóxico sin actividad HA, y la toxina 16S es un complejo de toxina 12S y HA (Sakaguchi *et al.*, 1984).

Una serie de estudios indican que el intestino delgado es el sitio primario de absorción (May y Whaler, 1958), aunque hay estudios que demuestran la absorción en el estómago (Maksymowych *et al.*, 1999). Sin embargo, estos estudios han sido realizados con la toxina botulínica tipo A y en un modelo de sistema digestivo diferente al aviar. De todas formas, la toxina en el lumen del sistema digestivo debe cruzar membranas para llegar a la sangre y/o linfa (Simpson, 2004). Tanto las neurotoxinas como los complejos tóxicos son muy grandes para presentar alguna tasa de difusión paracelular significativa (Simpson, 2004). Un estudio con toxina botulínica marcada con yodo radioactivo, demostró que los serotipos A y B pueden unirse a la superficie apical de las células, sufrir transcitosis, y ser liberadas por la cara basolateral de la célula (Maksymowych y Simpson, 1998).

Una o más de las proteínas no tóxicas podrían estar involucradas en el transporte de la neurotoxina a través del epitelio digestivo hacia el torrente sanguíneo mediante un "binding receptor" en las células epiteliales (Rocke y Bollinger, 2007). Fujinaga *et al.* (1997) encontraron evidencia en cobayos que sugiere que el antígeno con actividad HA de la toxina tipo C<sub>1</sub> actuaría como adhesina reconociendo el ácido siálico, y cumpliría un rol esencial para la unión de la toxina con el epitelio intestinal. Otros trabajos apoyan la hipótesis que el lugar de unión está en la molécula misma de la neurotoxina botulínica (Maksymowych *et al.*, 1999). Es concebible que, tanto la neurotoxina como las proteínas no tóxicas, tengan dominios que puedan asociarse con receptores que median el transporte a través del epitelio intestinal (Maksymowych *et al.*, 1999). Los estudios recientes implicaron a glucoproteínas como la mucina, como receptores y transportadores de la neurotoxina botulínica a través del epitelio intestinal (Nishikawa *et al.*, 2004).



Jin *et al.* (2009), demostraron que las proteínas con actividad HA de las toxinas botulínicas A, B y C, presentan una potente habilidad para interrumpir la función de la barrera epitelial, lo que prueba que las proteínas con actividad HA son factores que quiebran la defensa del hospedero por interacción directa con su epitelio. Este hecho está presumiblemente ligado a la entrega intestinal transepitelial de la neurotoxina botulínica en las especies susceptibles. Aunque este estudio fue en una línea celular de epitelio renal de perro, los autores señalaron que la disrupción de la función de barrera por las proteínas con actividad HA de la toxina tipo C pueden atribuirse a mecanismos generales de citotoxicidad, pero que queda por demostrar si este daño se produce en el epitelio intestinal de las especies susceptibles y si ocurre *in vivo*.

Schiavo *et al.* (2000) establecieron que no se puede excluir que parte del complejo tóxico es absorbido en el sistema digestivo, y que la disociación de la neurotoxina botulínica de las proteínas no tóxicas ocurra en los fluidos circulantes. En las soluciones de pH fisiológico y con cargas iónicas, el complejo se disocia espontáneamente, lo que significa que debería existir una disociación sustancial en la circulación general (Simpson, 2004). La neurotoxina botulínica en sangre debe dejar el sistema circulatorio, difundir a través del espacio extracelular y llegar a los órganos blanco que son las células nerviosas colinérgicas (Rocke y Bollinger, 2007). No hay estudios respecto a los mecanismos involucrados en el transporte de la neurotoxina a través de las barreras endoteliales.

La toxina actúa en el sistema nervioso periférico, incluyendo las uniones neuromusculares, los ganglios autonómicos, los sitios postganglionares parasimpáticos, los nervios postganglionares simpáticos que liberan acetilcolina y las glándulas adrenales (Simpson, 1981). La toxicidad extrema de las toxinas botulínicas es debida a su alta afinidad a los terminales nerviosos en la unión neuromuscular (Simpson, 2004), y a la persistente y específica inhibición de la liberación del neurotransmisor acetilcolina, provocando su efecto paralítico (Rocke y Bollinger, 2007). La neurotoxina no mata a las neuronas, pero interrumpe su función más esencial de transmisión sináptica (Montecucco y Schiavo, 1994). La neurotoxina botulínica no cruza la barrera hematoencefálica (Rocke y Bollinger, 2007).

La interferencia de la toxina con la transmisión neuromuscular ocurre en un proceso de cuatro pasos: (1) la unión específica a los receptores de las células nerviosas, (2) la internalización de la toxina a la neurona por endocitosis, (3) la traslocación de la cadena L a través de la membrana endosomal hacia el citosol neuronal, y (4) la acción enzimática zinc – endopeptidasa sobre las proteínas blanco en el citosol que interrumpe la habilidad celular para liberar el neurotransmisor (Pellizzari *et al.*, 1999).

### 2.6.1.- Anclaje Neuroespecífico.

La unión de la neurotoxina botulínica a las membranas de las células nerviosas es el primer paso crítico hacia la parálisis. Luego de la difusión a través de los líquidos corporales desde el sitio de producción o absorción de la toxina, la neurotoxina botulínica se une rápida e irreversiblemente a la membrana presináptica de los terminales nerviosos colinérgicos (Simpson, 1989), en zonas no mielinizadas mediante un proceso independiente de la temperatura (Dolly *et al.*, 1984). La evidencia disponible sugiere que la región de la molécula neurotóxica que contiene el sitio de unión (dominio de unión) neuroespecífico probablemente reside en la región carboxy-terminal de la cadena pesada ( $H_C$ ). Las preparaciones aisladas de cadenas pesadas y livianas (L) de la neurotoxina no son parálíticas cuando se aplican a los tejidos por sí solas; ambas se requieren para el bloqueo neuromuscular. Además, la cadena H debe ser aplicada antes que la cadena L para que pueda ocurrir la parálisis (Bandyopadhyay *et al.*, 1987).

Los receptores de las neurotoxinas botulínicas están localizados en la membrana plasmática de la motoneurona en la unión neuromuscular (Montecucco y Schiavo, 1994). A pesar de que muchos investigadores han intentado identificar los receptores presinápticos para la neurotoxina botulínica, los datos son variables. La evidencia reciente sugiere que la unión de la neurotoxina a la célula nerviosa puede involucrar múltiples interacciones (Herrerros *et al.*, 1999). La presencia de subdominios de unión, en la  $H_C$  de la toxina tetánica, apoya la sugerencia que las neurotoxinas clostridiales se unen fuerte y específicamente a la membrana presináptica porque presentan múltiples interacciones con sitios de unión de azúcares y proteínas, como se sugiere en un modelo de doble receptor (Montecucco, 1986). Se cree que las neurotoxinas botulínicas se unen primero a la superficie de la membrana presináptica, cargada negativamente, la cual consiste principalmente de polisialogangliosidos y otros ácidos lipídicos (Montecucco y Schiavo, 1994). La neurotoxina botulínica tipo  $C_1$  se une específicamente a los gangliosidos GD1b y GT1b (Tsukamoto *et al.*, 2005). La toxina luego se mueve lateralmente para unirse a un receptor proteico, propuesto como responsable de la internalización de la toxina hacia el interior de la neurona. Una característica principal del modelo es que esta doble interacción (lípidos y proteínas) de las neurotoxinas genera una unión de alta afinidad (Montecucco y Schiavo, 1994). Sin embargo, al parecer otras regiones de la neurotoxina botulínica están involucradas en la unión ya que la cadena H entrega solo una protección parcial a la intoxicación con la neurotoxina intacta (Pellizzari *et al.*, 1999).

### 2.6.2.- Internalización.

La evidencia disponible indica que las neurotoxinas botulínicas no entran directamente a las células por la membrana plasmática; sino que son internalizadas a través de una endocitosis mediada por receptor (Black y Dolly, 1986a). Los estudios de microscopía electrónica han mostrado que después de la unión, la neurotoxina entra al lumen de las estructuras vesiculares por un proceso dependiente de temperatura y energía, que se acelera con la estimulación nerviosa (Black y Dolly, 1986b). La estimulación nerviosa causa un aumento en la exo y endocitosis de vesículas sinápticas, y se puede hipotetizar que las proteínas de las vesículas sinápticas, expuestas temporalmente en la superficie celular luego de la liberación del neurotransmisor, serían el receptor proteico de las neurotoxinas (Brunger y Rummel, 2009). La evidencia disponible sugiere que el puente disulfuro que une las cadenas H y L debe estar presente para que ocurra la internalización, estableciéndose la hipótesis de un posible rol durante esta fase (Pellizzari *et al.*, 1999).

### 2.6.3.- Traslocación al Citosol Neuronal.

Las cadenas L de las neurotoxinas clostridiales bloquean la neuroexocitosis actuando en el citosol neuronal donde realizan su función proteolítica. Por lo tanto, luego que la neurotoxina ha llegado al lumen vesicular o del endosoma, la cadena L necesita cruzar la barrera hidrofóbica de la membrana vesicular. La evidencia indica que la neurotoxina botulínica debe ser expuesta a un bajo pH para que ocurra la alteración de la función nerviosa (Simpson, 1982). Esta toxina es muy estable en un amplio rango de pH desde 7 hasta 10,2 y solo un pH muy alcalino o muy ácido la destruyen (Hubalek y Halouzka, 1991). El pH ácido no induce una activación directa de la neurotoxina vía un cambio estructural (Bittner *et al.*, 1989), sino que es necesario para la traslocación de la cadena L desde el lumen vesicular hacia el citosol (Schiavo *et al.*, 2000). El bajo pH provoca que la neurotoxina botulínica cambie su conformación desde una forma "neutral" hacia una forma "ácida", con segmentos hidrofóbicos expuestos en la superficie, que permiten la penetración de las cadenas H y L en la membrana del endosoma (Montecucco *et al.*, 1988). Luego de esta inserción en la membrana inducida por el bajo pH, la neurotoxina botulínica forma canales iónicos en bicapas lipídicas planas (Hoch *et al.*, 1985). Se cree que la región H<sub>N</sub> media la traslocación de la cadena L a través de la membrana endosomal hacia el citoplasma (Niemann, 1991). La cadena H en el medio ácido vesicular formaría una hendidura que presenta el pasadizo para la cadena L parcialmente desdoblada (Schiavo *et al.*, 2000). Posteriormente se produce la reducción del puente disulfuro que une a las cadenas H y L, y se eliminan las fuerzas no covalentes existentes entre ellas, con la subsecuente separación de las cadenas. Finalmente, el pH neutral del citosol hace que la cadena L retome su conformación neutral (Simpson, 2004).

#### 2.6.4.- Acción Intracelular.

El paso final en la intoxicación de las células involucra la hidrólisis catalítica de las proteínas del aparato de neuroexocitosis, lo que previene la liberación del neurotransmisor desde la célula, resultando en parálisis neuromuscular.

Existen 3 proteínas, las llamadas proteínas SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment protein receptor) que han sido propuestas como participantes de todos los eventos celulares de acoplamiento y fusión vesicular con una membrana blanco (Montecucco y Schiavo, 1994). Las proteínas SNARE son: VAMP (sinaptic-vesicle-associated-membrane protein), inserta en la membrana de las vesículas sinápticas, pero mayoritariamente expuesta al citosol (v-SNARE) (Bennett y Scheller, 1994); SNAP 25 (synaptosomal-associated protein de 25 kDa) y syntaxina, (ambas t-SNARE) localizadas en la superficie citosólica de la membrana plasmática neuronal (Montecucco y Schiavo, 1994). Para la fusión de las vesículas con la membrana celular, es necesario el acoplamiento de estas tres proteínas y generar el complejo SNARE funcional. El acoplamiento requiere tanto de receptores vesiculares (v-SNARE) como de receptores en la membrana blanco (t-SNARE) (Montecucco y Schiavo, 1994).

La cadena L de la neurotoxina botulínica es una endoproteasa zinc dependiente (Schiavo *et al.*, 1992b) que inactiva estas proteínas SNARE, impidiendo el ensamble del complejo SNARE o su correcta conexión funcional, con lo cual la fusión mediada por  $Ca^{++}$  de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática es interrumpida (Montecucco y Schiavo, 1994). Las cadenas L, aplicadas por si solas intracelularmente, son suficientes para la inactivación (DePaiva *et al.*, 1990). Se espera que una cadena L corte todos los sustratos presentes dentro de un terminal sináptico uno tras otro (Schiavo *et al.*, 2000). A diferencia de las demás neurotoxinas botulínicas, las preparaciones altamente purificadas de neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub> contienen 2 átomos de zinc, siendo el segundo átomo no intercambiable sino que posee un rol estructural (Schiavo *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que los tipos B, D, F y G rompen la VAMP, en un único y distinto enlace peptídico (Schiavo *et al.*, 1992a); los tipos A, C<sub>1</sub> y E rompen la proteína SNAP - 25 también en un único y diferente enlace peptídico (Schiavo *et al.*, 1993a). Además, la neurotoxina tipo C<sub>1</sub> es la única que rompe la syntaxina (Blasi *et al.*, 1993), la cual debe estar inserta en una bicapa lipídica para ser reconocida y cortada (Schiavo *et al.*, 1995). Tanto la VAMP, la SNAP-25 y la syntaxina recombinadas, son cortadas en las mismas uniones peptídicas, y a la misma tasa que las correspondientes proteínas celulares, indicando que no se necesitan otros factores endógenos para la actividad proteolítica de las neurotoxinas clostridiales (Pellizzari *et al.*, 1999).

No se conoce aún el mecanismo que lleva a término la acción de la toxina. No existe evidencia que la cadena L sea transportada a través de la membrana plasmática para alcanzar el espacio extracelular. Esto sugiere que la difusión, la proteólisis, o una combinación de ambas contribuya a la pérdida de actividad (Simpson, 2004).

#### 2.6.5.- Toxina C<sub>2</sub>.

La toxina C<sub>2</sub>, la otra toxina proteica asociada con las cepas de *Clostridium botulinum* tipos C y D, no es una neurotoxina y no bloquea la liberación del neurotransmisor ni la función neuromuscular (Simpson, 1982). En cambio, sus efectos en los animales de laboratorio se caracterizan por el aumento del movimiento de fluidos a través de las membranas, incluyendo permeabilidad vascular incrementada, secreciones en las vías aéreas, edema pulmonar, sangramiento, fluidos en la cavidad torácica y extrema hipotensión (Rocke y Bollinger, 2007). La presencia de la toxina C<sub>2</sub> en aves silvestres nunca ha sido demostrada, sin embargo, los organismos que producen la toxina son bastante prevalentes en el sedimento de los humedales que las aves acuáticas frecuentan y en los cuales el botulismo es común (Sandler *et al.*, 1993).

#### 2.7.- PATOLOGIA

Los animales muertos por botulismo no presentan lesiones obvias características. Lesiones asociadas con la muerte por inmersión pueden estar presentes (Rocke y Friend, 1999). La congestión o hiperemia de varios órganos ha sido descrita pero no es un hallazgo específico. El buche, el proventrículo y la molleja frecuentemente están vacíos (Rocke y Bollinger, 2007). Esporádicamente, la ingesta que contiene la toxina botulínica está presente en el tracto digestivo. Wobeser y Galmut (1984a) reportaron que las larvas consumidas por los patos de collar (*Anas platyrhynchos*) ya no se encuentran en el tracto digestivo en las necropsias realizadas 15 minutos posteriores a la ingesta, por lo que es poco probable encontrar larvas durante una necropsia de campo, pudiendo éstas ser fuente de la toxina aun cuando no hayan sido detectadas en el tracto digestivo superior. Los cadáveres pueden estar deshidratados y pueden encontrarse sanguijuelas en la cavidad nasal y oral (Rocke y Bollinger, 2007).

#### 2.8.- DIAGNOSTICO

Un diagnóstico presuntivo de botulismo se basa frecuentemente en una combinación de signos clínicos observados en las aves enfermas (parálisis bilateral de alas y patas, parálisis de la membrana nictitante y cuello flácido) y la ausencia de lesiones características durante la necropsia. Sin embargo, esta presunción debe ser confirmada por pruebas de laboratorio que demuestren la presencia de la toxina botulínica en la sangre o en el tejido, con el objetivo de diferenciar el

botulismo aviar de las toxicosis por algas y otros procesos toxicológicos (Rocke y Friend, 1999) como la intoxicación con semilla de ricino (Rocke y Bollinger, 2007). Durante un cuadro de mortalidad, cuando se sospecha de botulismo, es importante coleccionar sangre desde las aves enfermas y recientemente muertas para realizar las pruebas, porque puede ocurrir formación post-mortem de la toxina botulínica en cuerpos más antiguos, haciendo que la interpretación de los resultados sean puestos en duda. Las aves afectadas individualmente con botulismo pueden tener bajas cantidades de la toxina en su sangre, quizás no detectables por los métodos actuales. Por lo tanto, en un evento de mortalidad, es recomendable realizar la prueba en un número de aves con variados grados de afección (Rocke y Bollinger, 2007).

La prueba más ampliamente usada para el diagnóstico del botulismo aviar es la Prueba de Protección del Ratón (PPR) (Quortrup y Sudheimer, 1943a), capaz de detectar 0,12 ng de toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> por ml de sangre (Rocke *et al.*, 1998). Las muestras de sangre son coleccionadas desde aves enfermas por venipuntura, o desde el corazón de las aves recientemente fallecidas. La fracción sérica de cada ave muestreada es inoculada en 2 ratones de laboratorio, uno de los cuales ha sido protegido previamente con la antitoxina específica de una toxina botulínica (Rocke y Friend, 1999). La muestra es considerada positiva para la toxina botulínica si el ratón protegido sobrevive y el ratón no protegido muere mostrando signología característica (parálisis de los miembros posteriores, abdomen contraído, típicamente llamado cintura de avispa, y respiración dificultosa). Las muestras que producen signos clínicos de botulismo en ratones no protegidos, pero que sobreviven, se consideran positivas débiles. Una muestra es negativa si ambos ratones sobreviven, y, si ambos ratones mueren, la muestra es considerada no concluyente (Rocke *et al.*, 1998). A pesar que la prueba en ratones aún es considerada la más sensible para todos los tipos de toxina botulínica, los falsos negativos son posibles (Rocke *et al.*, 2004). La mortalidad en la prueba del ratón por bacterias u otros contaminantes pueden alterar los resultados (Rocke y Bollinger, 2007).

Varios ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) han sido descritos y usados con variable éxito para la detección de la neurotoxina botulínica, incluyendo la toxina tipo C<sub>1</sub> (Thomas, 1991). Rocke *et al.* (1998) recientemente describieron un ELISA para el diagnóstico de botulismo tipo C, el cual puede ser más sensible que la PPR si se utiliza volúmenes de muestra mayores que los necesarios en ésta, aunque puede detectar toxina tanto activa como inactiva. Sin embargo, como no involucra animales vivos, no está sujeta a la interferencia de otros patógenos no específicos como en el caso de la PPR.

## 2.9.- TRATAMIENTO Y CONTROL

Aproximadamente el 10 – 20% de las aves recolectadas durante los brotes de botulismo están vivas. El tratamiento de los patos afectados por botulismo es generalmente muy exitoso; las tasas de sobrevivencia van entre 75 – 90% (Locke y Friend, 1989). En contraste con las anseriformes, pocas charadriiformes, tagüas (*Fulica sp.*) y gaviotas (*Larus sp.*) sobreviven a la intoxicación por *Clostridium botulinum* tipo C. Las aves medianamente afectadas pueden ser tratadas entregando fácil acceso al agua, comida y sombra, y protección del clima y de los depredadores (Wobeser, 1987). Las aves con signos clínicos más severos, como dificultad para caminar o que están recostadas completamente, debería administrárseles agua oralmente (Rocke y Bollinger, 2007). La inyección con la antitoxina tipo C mejora las tasas de sobrevivencia de los patos con signos clínicos moderados (Rocke y Friend, 1999) y, si es aplicada a las aves en los estados iniciales de la enfermedad, puede prevenir su progresión (Rocke y Bollinger, 2007). Las aves recuperadas permanecen susceptibles a la toxina botulínica y por lo tanto deben ser llevadas a lugares libres de botulismo para asegurar que no sean nuevamente expuestas (Rocke y Bollinger, 2007).

La vacunación, tanto individual como con refuerzo, puede ser benéfica junto con el tratamiento. Una inmunización simple de los patos intoxicados con el toxoide botulínico puede proteger contra la exposición subsecuente a la toxina tan pronto como a los 10 días luego de la vacunación; no interfiere en el tratamiento con antitoxina ni en la recuperación, además disminuye los signos clínicos y la mortalidad en caso de una reexposición a la toxina botulínica (Martinez y Wobeser, 1999).

El método de manejo más común para los brotes de botulismo tipo C en las aves acuáticas es remover los cadáveres antes del desarrollo de las larvas, en un intento por prevenir la transmisión de toxina a otras aves. Desafortunadamente, la remoción de cadáveres es bastante dificultosa en algunos humedales debido a su gran vegetación y la poca visibilidad de las aves muertas (Rocke y Bollinger, 2007). Cliplef y Wobeser (1993) encontraron que durante un brote de botulismo, sólo un tercio de los cadáveres marcados eran detectados en las operaciones de limpieza, siendo los cadáveres más grandes y cercanos a la orilla los recuperados en mayor número. Sin embargo, el número de cuerpos toxigénicos puede ser variable durante los brotes que ocurren en distintos lugares. En un estudio, el porcentaje de cuerpos que producían larvas tóxicas era de 29-69% y no todos los cuerpos eran infectados por las larvas (Reed y Rocke, 1992).

Debido a que las larvas pueden desarrollarse en los cadáveres dentro de 3 a 5 días (Rocke y Reed, 1992; Cliplef y Wobeser, 1993), los humedales deben ser revisados frecuentemente para reducir la disponibilidad de éstas. Un estudio reciente en humedales extensos (400 a 6.680 ha) encontró que la tasa de sobrevivencia de los patos de collar (*Anas platyrhynchos*) adultos, en

muda y con radio collar, no era significativamente diferente entre los sitios donde se realizaba limpieza y en los lugares donde no (Evelsizer, 2002), cuestionando seriamente el costo de la efectividad de esta actividad para el control de los brotes. Sin embargo, se cree que la limpieza de los cadáveres es efectiva en reducir las pérdidas en los humedales que son considerablemente más pequeños (< 400 ha), y donde el monitoreo de los cuerpos para la detección temprana de los brotes ocurre en una base regular durante el verano y el otoño, pero no se ha probado formalmente (Rocke y Bollinger, 2007). De cualquier forma, la eficacia de las labores de limpieza variará según muchos factores, incluyendo la intensidad del procedimiento, densidad y tipo de cadáveres y las características del humedal (Ciplef y Wobeser, 1993).

## 2.11.- INMUNIDAD

En la mayoría de los animales, las defensas inmunes naturales probablemente no juegan un rol significativo en la patogénesis del botulismo, como tampoco en la prevención de la enfermedad. Se cree que las aves que se recuperan del botulismo no desarrollan inmunidad protectora (Haagsma, 1987) y continúan siendo susceptibles a la toxina (Wobeser, 1997b). La neurotoxina es tan venenosa que la cantidad requerida para generar anticuerpos en los animales es mucho más alta que la dosis letal (Ohishi *et al.*, 1979). Sin embargo, Ohishi *et al.* (1979) encontraron anticuerpos naturales contra las neurotoxinas botulínicas (tipos A - F) en varias especies que se alimentan de carroña, incluyendo 18 de 20 jotes de cabeza colorada (*Cathartes aura*), 5 de 12 cuervos americanos (*Corvus brachyrhynchos*) y 25 de 110 coyotes (*Canis latrans*), mediante un ensayo de hemoaglutinación pasiva (PHA). No se sabe si estos anticuerpos eran protectivos para el huésped, porque ninguno de los animales fue desafiado; sin embargo, las pruebas de seroneutralización confirmaron los resultados del PHA. El botulismo nunca ha sido reportado en ninguna de estas especies, y es posible que estén protegidos por anticuerpos circulantes naturales. Otra posibilidad es que los animales seropositivos desarrollen anticuerpos contra la toxina en respuesta a una toxiinfección no letal en el intestino (Ohishi, *et al.*, 1979), o a través de la ingestión repetida de dosis sub letales de toxina (Rocke y Bollinger, 2007). El botulismo tipo C fue confirmado en un Cóndor de California (*Gymnogyps californianus*) criado en cautiverio con signos de parálisis progresiva aguda. Esta ave era alimentada con terneros y conejos atropellados. Se especuló que la falta de exposición a la toxina botulínica durante su vida temprana mediante la ingestión de carroña natural, podría haber generado la falta de resistencia a la toxina (Rocke y Bollinger, 2007).

La resistencia de las especies carroñeras a la neurotoxina botulínica podría ser explicada por una falla de la toxina para unirse a los terminales nerviosos presinápticos (Cohen, 1970). Así mismo, recientemente se han identificado numerosas isoformas de las proteínas SNARE en diferentes especies y tejidos, pero sólo algunas de ellas son susceptibles a la actividad proteolítica de las neurotoxinas botulínicas (Rocke y Bollinger, 2007). En general las proteínas SNARE son



resistentes a una neurotoxina debido a las mutaciones en el sitio de corte o en las regiones involucradas en la unión de la neurotoxina (Patarnello *et al.*, 1993), lo cual podría tener relación con la insensibilidad de ciertas especies a determinados tipos de toxina (Humeau *et al.*, 2000).

## 2.10.- PREVENCIÓN

La toxina botulínica puede ser inactivada con formaldehído para producir un toxoide que es inmunogénico una vez administrado en los animales. Estos toxoides han sido utilizados para prevenir el botulismo en los animales domésticos y exóticos en cautiverio. Los toxoides tipo C han sido utilizados para vacunar faisanes (Kurazono *et al.*, 1985), patos domésticos (Schwartz y Smart, 1963), y aves acuáticas de la colección de un zoológico (Cambre y Kenny, 1993). A pesar que en estos estudios ninguno de los animales fue desafiado con la toxina botulínica de forma experimental, las mayores tasas de sobrevivencia de las aves vacunadas comparadas con las no vacunadas al enfrentar mortalidades naturales por botulismo, provee alguna evidencia empírica que la inmunización fue exitosa en estos casos.

Estudios experimentales posteriores en aves cautivas realizados por Martínez y Wobeser (1999) demostraron que una sola dosis de toxoide tipo C administrado de forma subcutánea podía proteger a los patos de collar (*Anas platyrhynchos*) y al pato rabudo (*Anas acuta*) frente a dosis de  $2,25 - 4,5 \times 10^4$  LD50 en ratón de toxina botulínica tipo C<sub>1</sub>. A pesar que no se buscó anticuerpos, la protección continuó por 90 días, lo que parece ser suficiente para proteger a las aves tratadas hasta el clima más frío cuando los brotes cesan. Kiyatkin *et al.* (1997), probaron en ratas una vacuna oral para la toxina botulínica C<sub>1</sub>, generada a partir de una neurotoxina mutante que no presentaba la molécula de zinc. Esta proteína estimulaba la generación de anticuerpos por un tiempo limitado y luego de 3 dosis. Recientemente, una vacuna derivada de fragmentos recombinados de la cadena H completa de la toxina tipo C<sub>1</sub> ha sido utilizada para inmunizar patos de forma segura y efectiva. La vacuna aumentó significativamente los títulos de anticuerpos séricos luego de dos inmunizaciones (Arimitsu *et al.*, 2004).

Debido a que los métodos actuales de inmunización que requieren inoculación de animales individuales son impracticables para proteger a las poblaciones de aves de vida libre, Rocke *et al.*, (2000) probaron la eficacia de una sola dosis de toxoide en la cerceta común (*Anas crecca*) demostrando que no entrega suficiente protección y que no generaba anticuerpos.

El manejo o la manipulación de los factores del humedal relacionados con la germinación de las esporas botulínicas, el crecimiento celular vegetativo y la disponibilidad de toxina para las aves, parecen ser la alternativa más factible para el manejo de la enfermedad en las aves acuáticas silvestres. Una estrategia es reducir el sustrato disponible para el crecimiento de la

bacteria. Ya que en un humedal propenso al botulismo cualquier cadáver de vertebrado puede contener esporas botulínicas, los esfuerzos para reducir la mortalidad de los vertebrados probablemente serían beneficiosos (Rocke y Bollinger, 2007).

Como los cadáveres apoyan la producción de toxina y pueden estar involucrados en la iniciación de los brotes de botulismo, el manejo del hábitat para reducir las densidades de las aves en estas colonias y así disminuir la mortalidad, podría ser beneficioso (Rocke y Bollinger, 2007).

Se debería minimizar la introducción de materia orgánica a los humedales. Se cree que las inundaciones y desecaciones de éstos durante el verano matan invertebrados que podrían proveer sustrato para la producción de toxina (Rocke y Friend, 1999). En adición al proceso natural de muerte y descomposición en los humedales, la actividad humana puede incrementar el sustrato disponible para la producción de toxina. Por ejemplo, las inundaciones, las desecaciones, los pesticidas, y otras introducciones de químicos a los humedales por actividades agrícolas pueden eliminar vida acuática, de tal modo se provee de más sustrato para la producción de toxina. La descarga de aguas servidas a los humedales también puede ser otro potencial sustrato. Numerosos brotes han estado asociados a estas descargas, sin embargo, la relación aún no es entendida (Rocke y Friend, 1999).

Otra estrategia potencial para considerar es la manipulación de las condiciones del humedal que han sido asociadas anteriormente con un alto riesgo de brotes de botulismo. Los modelos de evaluación de riesgo podrían ser útiles para la identificación de los humedales con alto riesgo y así evaluar las acciones apropiadas para prevenir los brotes de botulismo cuando es más probable que ocurran (Rocke y Samuel, 1999).

Sin un mejor entendimiento de los factores ambientales que influyen los brotes de botulismo, las prácticas de manejo en los humedales pueden, de hecho, realzar la ocurrencia de la enfermedad en algunos lugares, anulando cualquier beneficio. A pesar que se ha progresado en la comprensión de la ecología del botulismo aviar en las aves acuáticas, desafortunadamente nuestra habilidad para prevenir y controlar los brotes catastróficos no ha mejorado desde que la enfermedad fue reconocida por primera vez hace un siglo atrás (Rocke y Bollinger, 2007).

## 2.12.- IMPACTO EN LAS POBLACIONES SILVESTRES

En una base mundial, el botulismo aviar es la enfermedad más importante de las aves acuáticas (Rocke, 2006), de hecho, su relevancia no ha disminuido y en 1997 se desencadenó en Norteamérica uno de los peores brotes registrados que provocó pérdidas cercanas a un millón y medio de aves (Friend *et al.*, 2001). Sin embargo, su impacto en las poblaciones está pobremente entendido. Lamentablemente, la información requerida del efecto poblacional, de la variación espacial y temporal de la ocurrencia del botulismo y las estimaciones de poblaciones en riesgo, son difíciles de obtener para la mayoría de la especies de aves acuáticas (Rocke, 2006), además se debe tomar en cuenta la influencia de la depredación, descomposición y la presencia de animales carroñeros (Rocke *et al.*, 2000).

Las investigaciones han mostrado que las estimaciones de mortalidad total, basadas sólo en el retiro de cadáveres, subestima la mortalidad de 3 (Ciplef, 1993) a 10 veces (Stutzenbaker *et al.*, 1986). Debido a su menor tamaño, es probable que la mortalidad de las aves costeras por botulismo sea enormemente subestimada mediante la recolección de cadáveres, incluso en mayor grado que en los ánades (Adams *et al.*, 2003). La tasa de sobrevivencia estimada en patos de collar marcados con radio collar han mostrado que un brote severo de botulismo puede reducir en 30 días la tasa de sobrevivencia a valores tan bajos como 5% (Evelsizer, 2002).

Rocke y Brand (1994), utilizaron patos de collar (*Anas platyrhynchos*) centinelas que permitieron mantener una población en riesgo definida, y estimaron que la tasa de mortalidad diaria en estas aves durante un brote de botulismo fue de 0.020, lo que significa 20 por cada 1.000 en riesgo. Rocke *et al.* (1999) determinaron una tasa de mortalidad de 1.0 a 8.8 aves/100 en riesgo, lo que para una población típica de patos de collar (> 25.000) en Estados Unidos, puede resultar en la muerte de 250 a 2.200 aves por semana.

Los brotes de botulismo generalmente involucran varias especies. Las especies numerosas, ampliamente distribuidas geográficamente y que poseen un alto potencial reproductivo, podrían ser capaces de resistir grandes pérdidas esporádicas por botulismo. Otras especies menos comunes y en peligro cuyas poblaciones están desproporcionadamente expuestas al botulismo, podrían ser impactadas más severamente por la enfermedad (Rocke, 2006). Las especies en peligro son especialmente vulnerables a una enfermedad como el botulismo que no es dependiente de la densidad. Las especies de aves acuáticas con una distribución limitada o que crían o pasan el invierno en solo unos pocos humedales son los que presentan mayor riesgo (Rocke, 2006). Ball *et al.* (1998), establecieron que la disminución de las poblaciones de pato rabudo (*Anas acuta*) en Norteamérica no era sorprendente, debido a que esta especie es una de las más comúnmente afectadas durante los brotes de botulismo aviar.

Virtualmente no se conoce nada respecto al impacto del botulismo aviar en las poblaciones de las aves costeras, las cuales están frecuentemente involucradas en los brotes del tipo C (Rocke y Bollinger, 2007), sin embargo, es probable que el botulismo sea un factor significativo en la sobrevivencia de algunas especies de aves costeras que permanecen en regiones donde los brotes son comunes (Adams *et al.*, 2003). Durante 1996, un evento único de botulismo fue responsable de la pérdida del 15 a 20% de la población occidental del pelícano blanco (*Pelecanus erythrorhynchos*) (Friend *et al.*, 2001).

A pesar que el énfasis en las aves migratorias está usualmente centrado en las poblaciones continentales o las de reproducción total, los efectos del botulismo en las poblaciones locales o regionales también pueden ser importantes, porque muchas especies de aves acuáticas demuestran reproducción, muda y filopatría de su sitio invernal (Anderson *et al.*, 1992). Los brotes que afectan a una gran proporción de aves con fuerte filopatría a estas áreas, pueden derivar en disminuciones locales. Similarmente, si los lagos propensos al botulismo atraen aves desde amplias áreas geográficas durante las etapas críticas de la vida, como muda y migración, los efectos en la población podrían ser a escala regional (Rocke y Bollinger, 2007).

### 2.13.- BOTULISMO EN CHILE

En Chile las sospechas de botulismo aviar comenzaron durante mediados de marzo del año 2005, cuando se denuncia a la Oficina Metropolitana del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) un brote de alta mortalidad de aves silvestres en la Planta de Tratamiento de Aguas La Cadellada, en la Comuna de Lampa, Región Metropolitana. Transcurrida una semana desde esta denuncia, hubo un segundo aviso de mortalidad de aves en el humedal Laguna de Batuco, el cual recibía la descarga de las aguas provenientes de La Cadellada (a 2 kilómetros de distancia) a través de 2 cursos de agua. Este lugar se ubica en la comuna de Lampa, Región Metropolitana, y abarca una superficie de 14.788 hectáreas. Todo el sitio está definido como una zona prohibida de caza, es el humedal natural más importante de la Región Metropolitana y se caracteriza por una alta concentración de avifauna acuática residente y migratoria.

Los funcionarios de la Oficina de Fauna de la Unidad de Recursos Naturales Renovables de la Oficina Metropolitana del SAG observaron en La Cadellada aproximadamente 1.200 aves vivas. Encontraron 40 ejemplares muertos y aproximadamente 20% de las aves vivas enfermas, las cuales presentaban distintos grados de afección. En Batuco encontraron alrededor de 400 aves muertas (Gallardo *et al.*, 2007). Las aves enfermas mostraron al examen clínico: decaimiento, baja respuesta a estímulos externos, falta de apoyo de las extremidades posteriores, postración, movimiento oscilante dorso ventral del cuello, flacidez muscular y diarrea. En algunos ejemplares se observó la caída de la membrana nictitante (Hidalgo *et al.*, 2008b).

Con el objeto de descartar Influenza Aviar (IA) y la Enfermedad de New Castle (ENC), durante el transcurso del brote se enviaron varias aves enfermas al Subdepartamento de Laboratorio y Estación Cuarentenaria Pecuaria Lo Aguirre del SAG (Lo Aguirre). Los sueros y muestras cloacales de todas estas aves resultaron negativos para ambas. Las necropsias revelaron ausencia de lesiones.

Sin aún conocer la causa, se instruyó el retiro diario de los cadáveres con la finalidad de proceder a enterrarlos y agregar cal, en un sector aislado en altura, y de esta manera evitar la propagación del posible agente a través de los cadáveres (Gallardo *et al.*, 2007). Descartadas las posibles etiologías infecciosas se comenzó a trabajar en la hipótesis de botulismo aviar, pues numerosos brotes han estado asociados a descargas de aguas servidas (Rocke y Friend, 1999).

Fue así entonces que se enviaron a la sección de Microbiología de Alimentos del Subdepartamento de Laboratorios Ambientales del Instituto de Salud Pública (ISP) 5 muestras de contenido intestinal y 2 muestras de heces, extraídas de 6 patos silvestres muertos en el humedal. Los resultados establecieron la presencia de la toxina botulínica tipo D (Gallardo *et al.*, 2007) en las 7 muestras. En la literatura internacional, esta toxina D ha sido descrita solo una vez como causa de mortalidad en aves acuáticas, en Senegal en el año 1979 (Doutre, 1979). Jensen (1981) en una evaluación del coproexamen como prueba diagnóstica para el botulismo aviar no utilizó heces para buscar *Clostridium botulinum*, como si se hace en el diagnóstico de botulismo humano, porque la presencia de la bacteria en el tracto digestivo de la aves tiene poca significancia diagnóstica. Sus resultados indicaron que el diagnóstico de botulismo aviar mediante la prueba de toxina fecal también presenta pequeño valor diagnóstico.

Como consecuencia del brote mencionado, en La Cadellada se produjo la muerte de aproximadamente 850 aves acuáticas (Gallardo *et al.*, 2007). Las aves muertas extraídas desde el humedal Laguna de Batuco alcanzaron las 1.300 aproximadamente. En consecuencia, ambos eventos causaron la muerte de aproximadamente 2.150 aves (Gallardo *et al.*, 2007), correspondiendo en un 80% a individuos de la familia Anatidae (*Anas georgica*, *Anas flavirostris*, *Anas platalea*, *Heteronetta atricapilla*, *Netta peposaca*), 15% de la familia Podicipedidae (*Podiceps occipitalis*) y 5% de la familia Rallidae (*Fulica sp.*). Además, se rescataron 74 aves que se encontraban enfermas, principalmente pato jergón grande (*Anas georgica*), que fueron enviadas a determinados Centros de Rehabilitación con el objetivo de recuperarlas y liberarlas en otro humedal (Hidalgo *et al.*, 2008a).

Durante la inspección al humedal Laguna de Batuco a comienzos de enero del 2006 se encontró en la laguna poniente una gran cantidad de aves muertas, alcanzando las 172 en el sector norte. Tanto con las aves afectadas como con los cadáveres encontrados se repitió el

mismo procedimiento del brote anterior. Para descartar enfermedades como ENC e IA, nuevamente se tomaron muestras cloacales a 7 de estas aves, cuyos resultados fueron negativos para ambas enfermedades. Las necropsias realizadas a las aves durante este periodo demostraron la ausencia de lesiones patológicas (Hidalgo *et al.*, 2008b). Este nuevo brote se caracterizó por la localización disímil de las aves muertas en relación al brote anterior. La mortalidad de aves durante este nuevo episodio fue significativamente inferior a la registrada anteriormente, no obstante, el número de aves muertas alcanzó las 577 (varias sin identificar), siendo la familia Anatidae la más perjudicada (85%). Las aves identificadas como afectadas fueron 94, con mayoría de individuos de la familia Anatidae (Hidalgo *et al.*, 2008a).

Tanto en el humedal Laguna de Batuco como en La Cadellada, se recolectaron 299 aves muertas entre octubre del año 2006 y febrero del 2007. La mayor parte de estos individuos pertenecían a la familia Anatidae, Laridae y Charadriidae con 180, 50 y 25 ejemplares muertos respectivamente (Hidalgo *et al.*, 2008a). Las aves encontradas afectadas fueron 75, en su mayoría individuos de la familia Laridae y Anatidae, con 29 y 23 ejemplares presentes (Hidalgo *et al.*, 2008a). Las aves enfermas presentaban como signos clínicos: apatía frente a estímulos externos, parálisis progresiva de patas y alas, dificultad de desplazamiento y vuelo, protrusión del tercer párpado y cuello flácido y caído. Se realizaron las pruebas para descartar IA y ENC además de necropsia a cada una de las aves. Los resultados fueron negativos para ambas patologías y las necropsias indicaron ausencia de lesiones macroscópicas atribuibles a patología específica (Hidalgo *et al.*, 2008b).

La Laguna Ambiental de la Planta de Tratamiento de Aguas La Farfana se ubica en la comuna de Pudahuel, Región Metropolitana. El agua que contiene esta laguna proviene principalmente de la que es procesada por la planta. Durante el mes de Abril del año 2006 se registró una mortandad masiva de aves acuáticas como también la presencia de aves acuáticas enfermas. La sintomatología clínica de las aves enfermas se caracterizaba por debilidad general, incapacidad para volar realizando aleteos sin despegar, y resistencia nula al intentar su captura.

Como primera medida se construyó una fosa donde se depositaba la fauna encontrada muerta y se la tapaba con cal. Además, se tomaron muestras de las aves afectadas para enviarlas a Lo Aguirre, al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario (Vetlab) y al Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad de Chile. Las muestras enviadas a Lo Aguirre fueron 10 aves, moribundas y muertas. Las pruebas realizadas para determinar enfermedades como: IA, ENC, *Salmonella pullorum* y *Chlamydia psittaci* resultaron negativas. Los perfiles revelaron alteraciones electrolíticas (relaciones Ca/P, Na/K), con tendencias a la hiperfosfatemia e hiperkalemia. De aparición constante fue la elevación de la enzima AST. En el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile se realizaron pruebas de

microbiología, necropsia y toxicología. Los exámenes microbiológicos realizados fueron negativos para bacterias y hongos. Para la necropsia se analizó una tagua común (*Fulica armillata*) viva enferma y una tagua (*Fulica sp.*) muerta. La tagua viva presentaba órganos internos de aspecto normal. La tagua muerta presentaba signos de septicemia. Para el examen toxicológico, se obtuvo suero de la tagua viva enferma y se realizó un diagnóstico confirmativo mediante un bioensayo que concluyó que en dicho suero existía un elemento termosensible que provocó la muerte de 2 ratones (*Mus musculus*) inoculados por vía IP, con la presentación previa de signología neurológica (parálisis posterior, depresión y muerte por parálisis respiratoria) similar a la provocada por una toxina botulínica (Hidalgo *et al.*, 2008b).

Durante el transcurso del evento se registró un total de 52 ejemplares muertos y 8 afectados. De las especies de aves muertas, el mayor número correspondió a la familia Rallidae con 40 individuos muertos, seguida por la familia Anatidae con 10 y en menor proporción la familia Podicipedidae con 2 individuos muertos (Hidalgo *et al.*, 2008a). Una vez que se contó con estos antecedentes, sumado a la información bibliográfica recopilada y analizada, más el registro del evento ocurrido en el humedal de Batuco en el año 2005 y 2006, se estableció que la muerte de las aves se explicaría por un evento de botulismo aviar.

A mediados de diciembre del año 2006 nuevamente se detectaron al interior de la Laguna Ambiental de La Fafana aves muertas o afectadas con la misma signología del episodio anterior, lo que desencadenó la puesta en acción de las medidas que habían quedado establecidas en el evento anterior.

Durante el episodio nuevamente se enviaron aves al Laboratorio de Patología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Chile. Las muestras fueron 2 patos jergón grande (*Anas georgica*), 2 taguas vivas (*Fulica sp.*), un pato sin identificar (*Anas sp.*) y un blanquillo (*Podiceps occipitalis*). Al examen clínico todas presentaron depresión y parálisis flácida de las piernas y buena condición corporal. Algunas mostraban parálisis de alas, cuello y párpados en forma intermitente; otras mantenían respiración dificultosa con movimiento rítmico de la pared blanda de la pelvis y de la cola. Se extrajo sangre de estas aves con el fin de obtener suero y realizar la prueba toxicológica. Los ratones inoculados por vía IP con el suero de estas aves murieron entre las 24 a 36 horas post inoculación, presentando previamente signos nerviosos como parálisis posterior, depresión severa y dificultad respiratoria con muerte por parálisis respiratoria compatible con un cuadro de botulismo (Hidalgo *et al.*, 2008b).

De forma similar, 4 individuos de la familia Anatidae: un pato real (*Anas sibilatrix*), 2 patos jergón grande (*Anas georgica*) y un pato rinconero (*Heteronetta atricapilla*) fueron enviados a Lo Aguirre para realizar pruebas de IA y ENC. Estas pruebas resultaron negativas (Hidalgo *et al.*,

2008b)

Durante el transcurso de este segundo evento se registró un total de 93 ejemplares de aves muertas, siendo más afectadas las familias Anatidae, Podicipedidae y Rallidae con 64, 17 y 10 individuos muertos respectivamente (Hidalgo *et al.*, 2008a). Las primeras aves afectadas correspondieron exclusivamente al grupo de los patos y posteriormente se registraron taguas y zambullidores muertos.

A pesar de la importante mortalidad atribuida a esta enfermedad, y que el único diagnóstico en nuestro país fue realizado a partir de una muestra no recomendable, entregando un resultado discutible, hasta hace poco, en Chile no se contaba con una prueba toxicológica objetiva y estandarizada que permitiese confirmar o descartar la responsabilidad de la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> en los brotes que han ocurrido y que continuaran presentándose. Es así como el SAG y la ONG AvesChile debieron basar el reconocimiento de esta enfermedad sólo en diagnósticos presuntivos; por los signos clínicos y el descarte de otras patologías.



### **3. OBJETIVO GENERAL**

Implementar un método de diagnóstico para el botulismo aviar.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.- Implementar un método de diagnóstico biotxicológico en ratones (Mouse Protection Test o Prueba de Protección en Ratón) para el botulismo aviar tipo C.

2.- Aplicación del método de diagnóstico biotxicológico en ratones (Mouse Protection Test o Prueba de Protección en Ratón) con sueros obtenidos desde aves acuáticas silvestres extraídas del medio natural que presenten signos clínicos sugerentes de botulismo.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1.- ANIMALES

La manipulación de las aves experimentales y silvestres tuvo como propósito obtener los sueros necesarios para el desarrollo de esta investigación. La manipulación de los ratones que se realizó para: a) validar la PPR y b) llevar a cabo esta prueba biotóxica con los sueros silvestres sospechosos, se efectuó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

#### 5.1.1.- Aves anseriformes clínicamente sanas.

Estas aves fueron empleadas para la obtención de: a) los sueros controles de aves sanas (sin neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub>), y b) los sueros controles de aves enfermas (con neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub>). Se obtuvieron 10 patos portugueses (*Anas platyrhynchos domestica*) (también conocidos como pato Pekín o pato doméstico), clínicamente sanos, de entre 1.868 a 2.255 gramos de peso, desde el criadero del Dr. Jurgén Rotmann y desde Mundo Granja (Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile). Estas aves permanecieron aisladas por 10 días y, posteriormente, se les realizó un examen clínico, un perfil bioquímico y un hemograma, los cuales permitieron comprobar que el estado de salud de estos ánades era compatible con los requerimientos experimentales. Los resultados de estos exámenes se muestran en el Anexo 1.

#### 5.1.2.- Ratones.

Se obtuvieron desde el Instituto de Salud Pública (ISP) ratones de la cepa CF-1 (*Mus musculus*) clínicamente sanos, de 15 – 18 gramos de peso, y de aproximadamente 6 semanas de edad, para efectuar: a) la implementación y validación de la Prueba de Protección en Ratón y b) aplicar esta prueba en sueros silvestres sospechosos. La especie, el peso y la edad de los roedores corresponden a los parámetros recomendados por la NWHC y la CDC para la realización de la prueba toxicológica (CDC, 1998).

#### 5.1.3.- Aves acuáticas con signos compatibles con botulismo extraídas del medio natural.

Estas aves extraídas del ambiente natural permitieron obtener los sueros silvestres sospechosos de botulismo aviar. Se capturaron a aquellos individuos que presentaron síntomas y signos compatibles con botulismo, y que de acuerdo a Hunter *et al.*, (1970) pueden dividirse en 3 grupos: Grupo I: aves que estén alertas y puedan caminar pero no volar. Grupo II: aves que presenten

dificultad para caminar y para mantener la cabeza en altura; y Grupo III: aves que estén postradas y casi totalmente paralizadas.

Los 6 individuos capturados correspondieron a miembros de los órdenes anseriforme, ciconiiforme, charadriiforme y podicipediforme. Presentaron signología correspondiente a los grupos I a III, y fueron extraídos desde cuerpos de agua localizados en la Provincia de Chacabuco, Región Metropolitana. El procedimiento de captura no requirió de ningún dispositivo especial ya que la condición clínica de las aves permitía su fácil sujeción. La información detallada de las aves capturadas se entrega en la Tabla 3.

Tabla 3. Aves acuáticas silvestres con signos compatibles con botulismo aviar capturadas entre diciembre del año 2007 y diciembre del año 2008.

Especie	Grupo	Lugar de Captura	Fecha Captura
Garza Chica ( <i>Egretta thula</i> )	II	Humedal Laguna de Batuco	1/12/2007
Jergón Grande ( <i>Anas geórgica</i> )	III	Tranque de Relave las Tórtolas	1/2/2008
Jergón Grande ( <i>Anas geórgica</i> )	III	Tranque de Relave las Tórtolas	1/2/2008
Garza Chica ( <i>Egretta thula</i> )	I	Humedal Laguna de Batuco	18/2/2008
Queltehue ( <i>Vanellus Chilensis</i> )	II	Humedal Laguna de Batuco	27/12/2008
Blanquillo ( <i>Podiceps occipitalis</i> )	III	Tranque de Relave las Tórtolas	12/12/2008

Grupo: clasificación de las aves de acuerdo a lo señalado por Hunter *et al.* (1970).

La recolección de estas aves se realizó durante las inspecciones regulares que efectuaba la Unidad de Fauna de la Oficina de Recursos Naturales Renovables del SAG Metropolitano en los lugares mencionados en la Tabla 3. Posteriormente a la obtención de los sueros, estas aves fueron trasladadas a un Centro de Rehabilitación determinado por el SAG.

Además de estas aves, se obtuvo sueros a partir de dos patos portugueses (*Anas platyrhynchos domestica*), un pato corredor de india, y otro pato de tipo doméstico (*Anas sp.*) recibidos, con signología clase III, que ingresaron al Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, el día 30 de enero del año 2008, provenientes del Fundo Pangalillo, Santa Victoria, Malla Rauco, Melipilla, Región Metropolitana.

## 5.2.- REACTIVOS

### 5.2.1.- Neurotoxina botulínica tipo C, compleja ®.

La neurotoxina botulínica tipo C, compleja ® (Metabiologics Inc. Madison, Wisconsin, Estados Unidos) fue adquirida como 1 mg/ml de solución estéril en buffer de 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 150mM NaCl (pH 7.0). Toxicidad de 2,5 x 10<sup>6</sup> LD50 en ratones por ml. Consistía de toxina C 16S, la cual contiene neurotoxina botulínica C<sub>1</sub>, un componente no tóxico sin actividad HA, y un componente no tóxico con actividad HA (Sakaguchi *et al.*, 1984). La preparación fue empleada para la obtención de los sueros controles de aves enfermas (con neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub>).

### 5.2.2. - Antitoxina tipo C.

La antitoxina botulínica tipo C de aproximadamente 100 UI/ml, de origen equino, serie 86-7, pH: 7.0 – 8.2, fue obtenida desde la National Wildlife Health Center (NWHC), Madison, Wisconsin, Estados Unidos, organismo de la División de Recursos Biológicos del Servicio de Geología (USGS) de ese país (atención Dra. Tonie Rocke), y se utilizó para: a) la implementación y validación de la PPR y b) para aplicar esta prueba en sueros silvestres sospechosos.

### 5.2.3.- Sueros controles de aves sanas (sin neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub>).

El suero de aves sanas (sin neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub>) fueron los **sueros controles negativos** a botulismo tipo C, que permitieron la implementación y validación de la PPR. Estos sueros fueron obtenidos a partir de 5 aves anseriformes clínicamente sanas, a las cuales se les extrajo, desde la vena braquial, 5 ml de sangre de cada una aproximadamente, mediante una jeringa de 5 ml y aguja de 21G x 11/2". Posteriormente, luego de la coagulación, se extrajeron los sueros y se centrifugaron a 3000 G por 15 minutos. Finalmente, estos sueros se congelaron a -30°C hasta el momento de su uso.

### 5.2.4.- Sueros controles de aves enfermas (con neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub>).

El suero de aves enfermas de botulismo aviar (con neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub>) fueron los **sueros controles positivos** a botulismo tipo C, que permitieron la implementación y validación de la PPR. Estos sueros fueron obtenidos mediante la intoxicación experimental de 5 de las aves anseriformes clínicamente sanas. Los ánades fueron desafiados por vía endovenosa (vena braquial), a diferentes cantidades de la neurotoxina botulínica tipo C, compleja (NBC). Un pato fue inoculado con 5 µg, 2 fueron inoculados con 2,5 µg, y otros 2 fueron inoculados con 1,5 µg. Las dosis utilizadas fueron escogidas en base al estudio de Arimitsu *et al.* (2004), quienes

determinaron que 10 DLM intravenosas de toxina C 16S, en patos cruza de Mallard Japonés y Khaki Campbell de 3 semanas de edad, era de 3,2 µg. Estas cantidades eran extraídas desde la solución inicial (1 microgramo/microlitro) y posteriormente eran diluidas en buffer estéril 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 150mM NaCl, (pH 7.0) hasta completar 0,5 ml de volumen, para luego ser inyectadas con una jeringa de 1 ml y aguja de 25G x 5/8" a través de un catéter de 24G. Posteriormente las aves eran observadas hasta la presentación de signología evidente de botulismo aviar (Clase III). En ese momento se obtuvo la sangre de estos patos por vía intracardiaca, mediante una jeringa de 20 ml y aguja de 25G x 11/2". Posteriormente, luego de la coagulación, se extrajeron los sueros y se centrifugaron a 3000 G por 15 minutos. Finalmente, estos sueros se congelaron a -30°C hasta el momento de su uso. Las aves fueron sacrificadas luego de la obtención de su sangre.

5.2.5.- Sueros de las aves acuáticas extraídas del medio natural que presentaron signos compatibles con botulismo.

Los sueros de las aves acuáticas extraídas del medio natural que presentaban signos compatibles con botulismo permitieron realizar el diagnóstico confirmativo de esta enfermedad mediante la PPR. Para la obtención de estos sueros, a las aves mencionadas se les extrajo desde la vena braquial, 3 ml de sangre de cada una aproximadamente, mediante una jeringa de 3 ml y aguja de 21G x 11/2". Posteriormente, luego de la coagulación, se extrajeron los sueros y se centrifugaron a 3000 G por 15 minutos. Finalmente, estos sueros se congelaron a -30°C hasta el momento de su uso.

### 5.3.- EQUIPAMIENTO

5.3.1.- Campana y cámara de bioseguridad para la manipulación de la toxina.

5.3.2.- Sala para la observación de las aves intoxicadas experimentalmente.

5.3.3.- Alimento y agua para anseriformes.

5.2.4.- Jaulas para ratones.

5.2.5.- Sala climatizada para la mantención y observación de ratones.

5.3.6.- Alimento y agua para ratones.

5.3.7.- Centrífuga Eppendorf.

5.3.8.- Congelador para mantener los sueros de las aves, la neurotoxina botulínica tipo C compleja, y la antitoxina tipo C.

#### 5.4.- MATERIAL FUNGIBLE

5.4.1.- Jeringas de 3 mililitros (ml) con aguja de 21G x 11/2”.

5.4.2.- Jeringas de 1 ml con aguja de 25G x 5/8”.

5.4.3.- Jeringas de 5 ml con aguja de 21G x 11/2”.

5.4.4.- Jeringas de 20 ml con aguja de 21G x 11/2”.

5.4.5.- Catéter endovenoso de 24G.

5.4.6.- Tubos de centrifuga de 1,5 ml (Eppendorf).

5.4.7.- Micropipeta 2 - 20 microlitros.

5.4.8.- Micropipeta 20 - 200 microlitros.

#### 5.5.- IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE PRUEBA DE PROTECCIÓN EN RATÓN

Para la validación de la PPR (NWHC y CDC) se llevó a cabo el siguiente protocolo experimental: se emplearon 4 grupos de ratones: A, B, C y D. Los grupos A y B (controles positivos) utilizaron sueros controles positivos a botulismo tipo C, y los grupos C y D (controles negativos) utilizaron los sueros controles negativos a botulismo tipo C.

1.- Inoculación de ratones con suero control positivo, previa inoculación de suero fisiológico.

El grupo A consistía de 5 ratones los cuales fueron desafiados con 0,5 ml de suero control positivo por vía IP. Uno de los ratones fue inoculado con el suero positivo obtenido del pato desafiado con 5 µg de NBC. Dos de los ratones fueron inoculados con los sueros positivos obtenidos de los patos desafiados con 2,5 µg de NBC. Finalmente, 2 de los ratones fueron inoculados con los sueros positivos obtenidos de los patos desafiados con 1,5 µg de NBC. Treinta minutos antes de este desafío, los 5 ratones fueron inoculados con 0,2 ml de suero fisiológico vía IP.

2.- Inoculación de ratones con suero positivo, previamente protegidos con antitoxina C.

El grupo B consistía de 5 ratones los cuales fueron desafiados con 0,5 ml de suero control positivo por vía IP. Uno de los ratones fue inoculado con el suero positivo obtenido del pato desafiado a 5 µg de NBC. Dos de los ratones fueron inoculados con los sueros positivos obtenidos de los patos desafiados a 2,5 µg de NBC. Finalmente, 2 de los ratones fueron inoculados con los sueros positivos obtenidos de los patos desafiados a 1,5 µg de NBC. Treinta minutos antes de este desafío, los ratones fueron protegidos mediante la inoculación de 0,2 ml de antitoxina tipo C vía IP.

3.- Inoculación de ratones con suero negativo, previa inoculación con suero fisiológico.

El grupo C consistía de 5 ratones, los cuales fueron desafiados con 0,5 ml de suero control negativo por vía IP. Como los sueros negativos provenían de 5 patos, cada ratón fue inoculado con uno de estos sueros. Treinta minutos antes de este desafío, los ratones fueron inoculados con 0,2 ml de suero fisiológico vía IP.

4.- Inoculación de ratones con suero negativo, previamente protegidos con antitoxina C.

El grupo D consistía de 5 ratones, los cuales fueron desafiados con 0,5 ml de suero control negativo por vía IP. Como los sueros negativos provenían de 5 patos, cada ratón fue inoculado con uno de estos sueros. Treinta minutos antes de este desafío, los ratones fueron protegidos mediante la inoculación de 0,2 ml de antitoxina tipo C vía IP.

Se utilizaron 20 ratones en total (Tabla 4). Todas las inoculaciones fueron realizadas con jeringa de 1 ml y aguja de 25G x 5/8", previa depilación y desinfección de la zona abdominal de los ratones con alcohol yodado. Las observaciones se realizaron a los 15 minutos postinoculación (pi), a los 30 minutos, a la hora, a las 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas y 48 horas pi.

		RATONES				
		1	2	3	4	5
GRUPOS						
GRUPO A	SUERO CON TOXINA	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	SUERO FISIOLÓGICO	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GRUPO B	SUERO CON TOXINA	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	ANTITOXINA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GRUPO C	SUERO SIN TOXINA	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	SUERO FISIOLÓGICO	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
GRUPO D	SUERO SIN TOXINA	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	ANTITOXINA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Tabla 4. Reactivos a utilizar en los 4 grupos de Ratones. Unidades en mililitros (ml)

De acuerdo a estos 4 grupos experimentales, se esperaba que: los ratones del grupo A presentaran la signología descrita en el punto 2.4 y posteriormente murieran. Los ratones que reprodujeran los signos clínicos de botulismo, y sin embargo sobrevivieran, serían considerados como positivos débiles. Los ratones del grupo B debían permanecer sanos, pues fueron protegidos con la antitoxina tipo C. En los grupos C y D se esperaba que los ratones no presentaran ningún tipo de signología y todos sobrevivieran, pues no había exposición a suero control positivo, y el suero fisiológico y la antitoxina debían ser inocuos.



## 5.6.- DESARROLLO DE LA PRUEBA DE PROTECCIÓN EN RATÓN CON SUEROS DE AVES SILVESTRES CON SOSPECHAS DE BOTULISMO

Una vez que la Prueba de Protección en Ratón (Mouse – Protection Test) fuese validada a través el desarrollo del protocolo anterior, se desarrollaría la prueba recomendada por la NWHC con los sueros silvestres sospechosos para: a) determinar la presencia de toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> en éstos y b) dar un diagnóstico definitivo respecto al botulismo aviar tipo C.

Cada muestra de suero silvestre consistía de aproximadamente 1 ml, el cual fue dividido en 2 dosis de 0,5 ml. Cada una de las dosis (0,5 ml) del suero a probar se inoculó en un ratón mediante una jeringa de 1 ml y aguja de 25G x 5/8” por vía IP, por lo tanto para realizar la prueba se utilizaron 2 ratones por cada muestra de suero silvestre. Uno de los ratones, 30 minutos antes de la inoculación con el suero a probar, fue protegido con 0,2 ml de antitoxina, la cual era inyectada con una jeringa de 1 ml y aguja de 25G x 5/8” por vía IP. Posteriormente, los ratones fueron observados durante los 2 días posteriores a la administración del suero silvestre para detectar signos de botulismo, como parálisis de los miembros posteriores, abdomen contraído (típicamente llamado cintura de avispa), respiración dificultosa y muerte. El procedimiento se repitió con cada uno de los sueros.

Las muestras de suero se considerarían positivas si los ratones no protegidos morían, o mostraban signos de botulismo, y los ratones protegidos permanecían sanos. Las muestras que produjesen signos clínicos de botulismo en ratones no protegidos, pero que sobreviviesen, se considerarían positivas débiles. Las muestras se señalarían como negativas si ambos ratones sobrevivían, y, si ambos ratones morían, las muestras se considerarían como no concluyentes (Rocke *et al.*, 1998).

## 6. RESULTADOS

### 6.1.- GENERACIÓN DE SUEROS CONTROLES POSITIVOS (CON NEUROTOXINA BOTULÍNICA TIPO C<sub>1</sub>)

Las 5 aves anseriformes clínicamente sanas que fueron desafiadas experimentalmente por vía endovenosa a la NBC, presentaron signos clínicos evidentes de botulismo aviar. Todas las aves llegaron a mostrar signos clínicos correspondientes a la clase III: aves postradas y casi totalmente paralizadas (Hunter *et al.*, 1970). El pato desafiado a 5 µg mostró signos evidentes de la enfermedad, es decir clase II, a las 4 horas pi, presentando signos clase III a las 6 horas pi. Los patos desafiados a 2,5 µg mostraron signología correspondiente a la clase II a las 10 y 13 horas pi, y a la clase III, a las 13 y 20 horas pi, respectivamente. Finalmente, los patos desafiados a 1,5 µg presentaron signos clínicos clase II a las 17 horas pi, alcanzando la clase III a las 25 horas pi. Se obtuvo suero positivo a neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub> a partir de todos ellos.

### 6.2.- IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE PRUEBA DE PROTECCIÓN EN RATÓN

En la implementación y validación de la PPR, se obtuvo los resultados que se esperaban de acuerdo a los motivos señalados en el punto 5.5. Es decir, los ratones del grupo A, expuestos a los sueros controles positivos y no protegidos con antitoxina, murieron presentando previamente signología característica en el siguiente orden de aparición: respiración dificultosa, abdomen contraído y parálisis de los miembros posteriores.

El detalle de los tiempos de aparición de signos y muerte de los ratones del grupo A, de acuerdo al origen de los sueros controles positivos inoculados, se muestran en la Tabla 5.

		RATONES				
		1	2	3	4	5
	DOSIS NBC PATO ( $\mu\text{g}$ )	5	2,5	2,5	1,5	1,5
SIGNOLOGÍA	DIFICULTAD RESPIRACIÓN (horas post inoculación)	4	6	6	8	8
	ABDOMEN CONTRAÍDO (horas post inoculación)	4	8	10	12	12
	PARALISIS MIEMBROS POST. (horas post inoculación)	5	10	12	13	13
	MUERTE (horas post inoculación)	5	10	12	13	13

Tabla 5. Aparición de signos en el tiempo (horas), en los ratones 1 – 5 de acuerdo a la dosis en nanogramos ( $\mu\text{g}$ ) de NBC recibida por los patos domésticos desde los cuales se obtuvieron los sueros inyectados.

Los ratones del grupo B permanecieron sanos y no presentaron cambios en su comportamiento durante todo el período de observación, incluyendo el ratón inoculado con el suero control positivo generado a partir del pato clínicamente sano desafiado con 5  $\mu\text{g}$  de NBC.

Los ratones del grupo C permanecieron sanos y no presentaron cambios en su comportamiento durante todo el período de observación.

Los ratones del grupo D permanecieron sanos y no presentaron cambios en su comportamiento durante todo el período de observación.

### 6.3.- DESARROLLO DE LA PRUEBA DE PROTECCIÓN EN RATÓN CON SUEROS DE AVES SILVESTRES.

La PPR se realizó con los sueros de las aves silvestres capturadas mencionadas anteriormente: dos garzas chicas (*Egretta thula*), dos patos jergón grande (*Anas geórgica*), un queltehue (*Vanellus chilensis*) y un blanquillo (*Podiceps occipitalis*). Luego de 5 días de observación, ningún individuo del par de ratones inyectados con el suero de cada ave (ni el ratón protegido con antitoxina, ni el ratón sin protección), presentó signología neurológica ni de otro tipo.

Por otra parte, también se realizaron Pruebas de Protección en Ratón con los sueros obtenidos a partir de 2 patos portugueses (*Anas platyrhynchos domestica*), un pato corredor de india, y otro pato de tipo doméstico (*Anas sp.*) procedentes del Fundo Pangalillo, Melipilla. Luego de 5 días de observación, los sueros provenientes de los 2 patos portugueses (*Anas platyrhynchos domestica*) y del otro pato de tipo doméstico (*Anas sp.*), generaron signología neurológica (respiración dificultosa, abdomen contraído y parálisis de los miembros posteriores) y muerte en los ratones no protegidos, mientras que los protegidos con antitoxina C permanecieron sanos. El suero restante del pato corredor de india, no generó signología en ninguno de los 2 ratones inoculados (ni en el ratón protegido con antitoxina C, ni en el ratón no protegido) luego de los 5 días de observación.

## 7. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, para obtener los sueros controles positivos, optamos por administrar la NBC a 5 patos portugueses mediante la vía endovenosa, debido a la menor dosis necesaria para generar la enfermedad experimental en comparación con la exposición oral (Arimitsu *et al.* 2004). Las dosis utilizadas fueron estimadas a partir del estudio de Arimitsu *et al.* (2004), sin embargo, debido a que los patos utilizados por estos autores eran de menor edad y de menor peso en comparación a las aves experimentales de nuestro estudio, se hizo una estimación de la dosis requerida para efectivamente generar la enfermedad en los ánades manipulados por nosotros. Inicialmente se utilizó 5 µg en un pato, posteriormente se redujo esta dosis a la mitad (2,5 µg) en dos de ellos. Finalmente se volvió a reducir a un poco más del cuarto de la dosis inicial (1,5 µg) en los últimos dos. Así, se pudo establecer la dosis de NBC que aún genera la enfermedad con signología clase III en patos portugueses (*Anas platyrhynchos domestica*), entre 1.868 a 2.255 gramos es 1,5 µg de NBC. No fue el objetivo de este estudio determinar la DLM ni la DL50 en estos patos.

Existe una fase de prepatencia, siempre presente entre el momento de la inyección y la aparición de los síntomas, que va desde varias horas a días (Schiavo *et al.*, 2000). En nuestro estudio, la duración de esta fase en los patos inoculados con NBC, fue inversamente proporcional a la dosis recibida, es decir, mientras mayor fue la dosis, menor duración tuvo la fase lag. Así mismo, la velocidad de la progresión de los signos hasta clase III fue directamente proporcional a la dosis de NBC recibida por los patos, vale decir, mientras mayor fue la dosis de NBC recibida, más rápida fue la progresión de la signología. Estos hallazgos concuerdan con lo señalado por Roche y Bollinger (2007).

Schiavo *et al.* (2000) establecieron que no se puede excluir que parte del complejo tóxico es absorbido en el sistema digestivo, y que la disociación de la neurotoxina botulínica de las proteínas no tóxicas ocurra en los fluidos circulantes, y Simpson (2004) demostró que en las soluciones de pH fisiológico y con cargas iónicas, el complejo se disocia espontáneamente, lo que significa que debería existir una disociación sustancial en la circulación general. Debido a que en nuestro estudio la inoculación endovenosa de la NBC, es decir, la toxina C 16S (neurotoxina + proteínas no tóxicas, una de ella con actividad hemaglutinina), fue exitosa para generar la enfermedad experimentalmente, apoyamos la factibilidad de que el complejo tóxico se desintegre en el torrente sanguíneo.

El protocolo experimental propuesto para la implementación y validación de la PPR, y que incluía a los grupos de ratones A, B, C y D, fue desarrollado con el objetivo de a) demostrar la inoculación correcta de los reactivos b) corroborar la efectividad e inocuidad de la antitoxina botulínica tipo C, c) probar la capacidad de detectar los sueros positivos a neurotoxina botulínica

tipo C<sub>1</sub> y d) probar la capacidad de no detectar los sueros negativos a neurotoxina botulínica tipo C<sub>1</sub>. Los resultados obtenidos luego del desarrollo de este protocolo son exactamente los que se esperaban para cumplir dichos objetivos, y así poder establecer que la PPR es realizada de forma correcta y con los reactivos adecuados. No fue objetivo de este estudio determinar la DL50 en ratones para la NBC, ni tampoco determinar la dosis mínima de toxina que es capaz de detectar la PPR, pues ambos datos ya se conocen (Schiavo *et al.*, 2000; Rocke *et al.*, 1998).

Cabe mencionar que los resultados obtenidos luego del desarrollo de este protocolo señalan que la rapidez en la aparición de la signología, y la muerte de los ratones del grupo A (expuestos a suero control positivo y no protegidos con antitoxina C) fue directamente proporcional a la dosis de NBC que recibieron los patos clínicamente sanos a partir de los cuales se obtuvo los sueros controles positivos. Por lo tanto, el ratón inoculado con el suero control positivo obtenido desde el pato que recibió una dosis de NBC de 5 µg, mostró signología característica y murió más rápido que los ratones inoculados con sueros controles positivos obtenidos a partir de los patos desafiados a 2,5 µg de NBC. A su vez, estos últimos mostraron la signología característica y murieron más rápido que los ratones inoculados con sueros controles positivos obtenidos desde los patos desafiados a solo 1,5 µg de NBC.

Los resultados de las PPR realizadas con los sueros obtenidos a partir de las aves silvestres capturadas en el humedal Laguna de Batuco y en el tranque de relave Las Tórtolas, fueron negativos a la toxina botulínica tipo C<sub>1</sub>. En las 6 pruebas, ninguno de los 2 ratones falleció luego de los 5 días de observación. Estos resultados son esperados si se considera que las aves capturadas eran casos aislados de individuos que presentaban signología compatible con botulismo. En cada una de las inspecciones realizadas con el SAG, durante las épocas de verano 2007- 2008 y 2008-2009, nunca se encontró a más de 2 aves con dichas características. Esto se contrapone con el hecho de que el botulismo aviar se presenta en forma de brotes que involucra a centenares de aves (Rocke y Friend, 1999), como sí ocurrió en el humedal Laguna de Batuco en el año 2005 y en la laguna ambiental de la Planta de Tratamiento de Aguas La Farfana (Hidalgo *et al.*, 2008). La signología de las aves capturadas estaría entonces relacionada con una etiología que genera alteraciones motoras en pocos individuos respecto al total de la población de aves silvestres de un determinado lugar. El almacenamiento de los sueros de aves silvestres a -30° C asegura que la toxina botulínica, en caso de haber estado presente en los sueros, hubiese sido detectada por la PPR, pues la persistencia de la toxina botulínica bajo esta temperatura es de 5 años (Hubalez y Halouzka, 1988).

Los dos patos jergones (*Anas geórgica*) y el blanquillo (*Podiceps occipitalis*), capturados en el tranque de relave Las Tórtolas, presentaban signología compatible con botulismo, pero además mostraban una marcada depresión. Este signo, sumado al sitio de captura de estas aves, hace

pensar en la posibilidad que estos individuos hayan estado intoxicados por algún metal pesado. La garza chica (*Egretta thula*) capturada en el humedal Laguna de Batuco con signología clase I, presentaba una notoria disminución de sus músculos pectorales y el raquis muy marcado, por lo que su dificultad para volar pudo deberse a una nutrición deficiente.

A pesar que las PPR realizadas con los sueros obtenidos a partir de las aves silvestres acuáticas capturadas entregaron resultados negativos, su realización permitió descartar al botulismo aviar como la responsable de la signología mostrada por éstas al momento de su captura.

Los resultados de las PPR realizadas con los sueros obtenidos a partir de los patos provenientes del Fundo Pangalillo fueron positivos, lo que permite reportar el primer diagnóstico de botulismo aviar tipo C en Chile. Estas aves estaban en un tranque de regadío con agua que fluía de forma constante. En el tranque había otro tipo de aves como gallinas, gansos y pavos, pero solo murieron los patos de diferente raza. Al momento de la aparición de la enfermedad el tranque estaba verdoso por algas. En junio y julio del año 2007 murieron 15 aves que presentaron la misma signología. El resultado positivo en 3 de los 4 sueros obtenidos de estos patos (75%), concuerda con los hallazgos de Rocke *et al.*, (1998), quienes señalaron que la PPR detectaba la toxina en el 79% de los sueros obtenidos desde los casos clínicos de botulismo aviar. Además, resultados falsos negativos en la PPR pueden ocurrir si la mayor parte de la toxina está acoplada a la unión neuromuscular, y no en el torrente sanguíneo (Swerczek, 1980).

Es necesario que ante nuevos casos sospechosos de botulismo aviar, se realice un examen clínico detallado de las aves capturadas, así como necropsias de los individuos que se encuentren más afectados, y otros exámenes complementarios como histopatología, cultivos bacteriológicos y virales. Es primordial llevar un registro detallado del tratamiento aplicado a las aves trasladadas a centros de rehabilitación, así como también de los resultados de éste. Esta información permitiría llegar a una conclusión en caso que la o las PPR resultaran negativas.

## 8. CONCLUSIONES

- Tras este estudio, se ha podido implementar el método de diagnóstico utilizado a nivel mundial para determinar la presencia de toxina botulínica tipo C<sub>1</sub>, el cual queda disponible en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, para su aplicación durante futuros brotes de alta mortalidad en aves acuáticas silvestres en los cuales se sospeche de botulismo aviar.
- La ausencia de toxina botulínica tipo C<sub>1</sub> en los 6 sueros analizados, obtenidos a partir de las aves acuáticas silvestres capturadas en el humedal Laguna de Batuco y en el tranque de relave Las Tórtolas, no constituye un indicador de ausencia de la enfermedad en las aves acuáticas presentes en estos lugares durante el período en estudio, debido al limitado número de aves capturadas y la baja frecuencia de inspecciones. Recomendamos un mayor número de pesquisas para poder determinar el problema que presentan estos casos esporádicos de individuos con alteraciones motoras.
- La PPR ha permitido confirmar por primera vez el diagnóstico de botulismo en patos en Chile, en los ánades enfermos provenientes de la comuna de Melipilla.
- Es necesario que las instituciones y personas ligadas a la conservación de la avifauna nacional estén al tanto de que esta enfermedad está presente en el país, lo que permitirá establecer una vigilancia adecuada de los lugares en riesgo y reaccionar de manera rápida y eficiente frente a nuevos brotes. De esta forma, el número de aves que resulten perjudicadas en el futuro será menor.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- **ADAMS, S. G.; CONLY, F. M.; GRATTO-TREVOR, C.L.; KEVIN, C. J.; BOLLINGER, T.** 2003. Shorebird use and mortality at a Large Canadian Prairie Lake impacted by Botulism. *Waterbirds* 26: 13-25.
- **ANDERSON, M.G.; RHYMER, J.M.; ROHWER, F.C.** 1992. Philopatry, dispersal, and the genetic structure of waterfowl populations. *In:* Batt, B.D.J.; Afton, A.D.; Anderson, M.G.; Ankney, C.D.; Johnson, D.H.; Kadlec, J.A.; Krapu, G.L. (Eds.). *Ecology and Management of Breeding Waterfowl*. University of Minnesota Pres. Minneapolis, MN, Estados Unidos, pp. 365- 395.
- **ARIMITSU, H.; LEE, J.; SAKAGUCHI, Y.; HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, M.; NAKAURA, M.; TAKAI, H.; LIN, S.; MUKAMOTO, M.; MURPHY, T.; OGUMA, K.** 2004. Vaccination with recombinant whole heavy chain fragments of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 11: 496-502.
- **AURELLI, P.; FENICIA, L.; PASOLINI, B.; GIANFRANCESCHI, M.; McCROSKEY I.M.; HATHEWAY, C.L.** 1986. Two cases of type E infant botulism caused by a neurotoxicogenic *Clostridium butiryicum* in Italy. *J. Infect. Dis.* 154: 207-211.
- **AZUMA, R.; ITOH, T.** 1987. Botulism in waterfowl and distribution of *C. botulinum* type C in Japan. *In:* Eklund, M.W.; Dowell, V.R. (Eds.). *Avian Botulism*. Charles C. Thomas, Springfield, IL, Estados Unidos, pp. 167-190.
- **BALL, G.; BOLLINGER, T.; CONLY, M.; KADLEC, J.; MACFARLANE, B.; MURKIN, H.; MURPHY, T.; PYBUS, M.; ROCKE, T.E.; SAMUEL, M.; SHARP, D.; WOBESER, G.** 1998. Report to the prairie habitat joint venture by the working group on avian botulism. Canadian Cooperative Wildlife Health Centre, Saskatoon, Saskatchewan.
- **BANDYOPADHYAY, S.; CLARK, A.; DASGUPTA, B.; SATHYAMOORTHY, V.** 1987. Role of the heavy and light chain of botulinum neurotoxin in neuromuscular paralysis. *The J. Biol. Chem.* 262: 2660- 2663.
- **BELL, J.F.; SCIPLE, G.W.; HUBERT, A.A.** 1955. A microenvironment concept of the epizootiology of avian botulism. *J. Wildlife Manage.:* 19: 352-357.
- **BENNETT, M.K.; SCHELLER, R.H.** 1994. A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Annu. Rev. Biochem* 63: 63-100.
- **BITTNER, M; DASGUPTA, B.; HOLZ, R.** 1989. Isolated light chains of botulinum neurotoxins inhibit exocytosis. *The J. Biol. Chem.* 264: 10354-10360.

- **BLACK, J.D.; DOLLY, J.O.** 1986a. Interaction of <sup>125</sup>I- labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J. Cell Biol.* 103: 521-534.
- **BLACK, J.D.; DOLLY, J.O.** 1986b. Interaction of <sup>125</sup>I- labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *J. Cell. Biol.* 103: 535-544.
- **BLAKER, D.** 1967. An outbreak of botulism among waterbirds. *Ostrich* 32: 144-147.
- **BLASI, J.E.; CHAPMAN, R.; YAMASAKI, S.; BINZ, T.; NIEMANN, H.; JAHN, R.** 1993. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *Embo J.* 12: 4821-4828.
- **BRUNGUER, A.; RUMMEL, A.** 2009. Receptor and substrate interactions of clostridial neurotoxins. *Toxicon* 54: 550-560.
- **CAMBRE, R.C.; KENNY, D.** 1993. Vaccination of zoo birds against avian botulism with mink botulism vaccine. *Proc. Am. Assoc. Zoo Vet.* 1993: 383-385.
- **CATO, E.P.; GEROGE, W.L.; FINEGOLD, S.M.** 1986. Genus *Clostridium*. **In:** Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams And Wilkins, Baltimore, Estados Unidos, pp. 1141-1200.
- **CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 1998. Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA., Estados Unidos.
- **CHEN, F.; KUZIAMKO, G.; STEVENS, R.** 1998. Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxin component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species. *Infect. Immun.* 66: 2420-2425.
- **CLIPLEF, D.J.; WOBESER, G.** 1993. Observations on waterfowl carcasses during a botulism epizootic. *J. Wildlife Dis.* 29: 8-14.
- **COHEN, G.M.** 1970. Studies on the resistance of roosters and vultures to type A botulinal toxin. Ph.D. thesis. Florida State University, Tallahassee, FL., Estados Unidos, 94 pp.
- **COOCH, F.G.** 1964. A preliminary study of the survival value of a functional salt gland in prairie anatidae. *The Auk* 81: 380-393.
- **DASGUPTA, B.R.; SUGIYAMA, H.** 1972a. Role of protease in natural activation of *Clostridium botulinum* neurotoxin. *Infect. Immun.* 6: 587-590.

- **DASGUPTA, B.R.; SUGIYAMA, H.** 1972b. A common subunit structure in *Clostridium botulinum* type A, B and E toxins. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 48: 108-112.
- **DE PAIVA, A.; POULAIN, B.; LAWRENCE, G.W.; SHONE, C.C.; TAUC, L.; DOLLY, J.** 1993. A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin a revealed by a toxin derivate that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly. *The J. Biol. Chem.* 268: 20838-20844.
- **DOLLY, J.O.; BLACK, J.; WILLIAMS, R.S.; BLACK, J.D.; MELLING, J.** 1984. Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature* 307, 457-460.
- **DOUTRE, M.P.** 1979. Un foyer de botulisme de type D, lie a des modifications du mileu naturel, observe chez des pelicans (*Pelicanus rufescens*) du Senegal (Petite Cote). *Rev. Elev. Med. Vet. Pay.* 32: 131-134.
- **DUNCAN, R.M.; JENSEN, W.I.** 1976. A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism. *J. Wildlife Dis.* 12: 116-126.
- **EKLUND, M.W.; POYSKY, F.T.** 1970. Distribution of *Clostridium botulinum* on the Pacific Coast of the United States. **In:** Herzberg, M. (Ed.). *Toxic Microorganisms*. U.S. Department of Interior, Washington, D.C., Estados Unidos pp. 304-308.
- **EKLUND, M.W.; POYSKY, F.T.** 1972. Activation of a toxic component of *Clostridium botulinum* types C and D by trypsin. *Appl. Microbiol.* 24: 108-113.
- **EKLUND, M.W.; POYSKY, F.T.** 1974. Interconversion of type C and D strains of *Clostridium botulinum* by specific bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 27: 251-258.
- **EKLUND, M.W.; POYSKY, F.T.; REED, M.; SMITH, C.A.** 1971. Bacteriophage and toxigenicity of *Clostridium botulinum* type C. *Science* 172: 480-482.
- **EKLUND, M.W.; POYSKY, F.T.; REED, M.** 1972. Bacteriophage and toxigenicity of *Clostridium botulinum* type D. *Nature N. Biol.* 235: 16-18.
- **EKLUND, M.W.; POYSKY, F. T.; OGUMA, E.; IIDA, H.; INOUE, K.** 1987. Relationship of bacteriophages to toxin and hemagglutinin production by *Clostridium botulinum* types C and D and its significance in avian botulism outbreaks. **In:** Eklund, M. W.; Dowell V.R. (Eds.). *Avian Botulism: An International Perspective*. Charles C Thomas, Springfield, IL, Estados Unidos pp. 191-122.
- **EKLUND, M.W.; POYSKY, F.T.; HABIG, W.H.** 1989. Bacteriophages and plasmids in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* and their relationship to production of toxins. **In:** Simpson, L.L. (ed.). *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. Academic Press, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos, pp. 25-51.

- **ESTADES, C.** 2004. Estrategia Nacional para la Conservación de Aves. [en línea] <<http://www.aveschile.cl/documentos/Estrategia-Texto.pdf>> [consulta: 07-01-2008]
- **EVELSIZER, D.D.** 2002. Management of avian botulism and survival of molting mallards. MSc thesis. University of Saskatchewan, Saskatoon, Sask, CA, 59 leaves.
- **FIGUEROLA, J.; SORIGUER, R. JIMENEZ-CLAVERO, M.A.; RUIZ, S.** 2006. Enfermedades infecciosas emergentes ¿una nueva amenaza para la biodiversidad? *La Garcilla* 127: 126-132.
- **FRIEND, M.; MCLEAN, R.G.; DEIN, F.J.** 2001. Disease emergence in birds: challenges for the twenty-first century. *The Auk* 118: 290-303.
- **FUJII, N.; OGUMA, K.; KIMURA, K.; TSUZUKI, K.** 1988. Characterization of bacteriophage nucleic acids obtained from *Clostridium botulinum* types C and D. *Appl. Environ. Microb.* 54: 69-73.
- **FUJINAGA, Y.; INOUE, K.; WATANABE, S.; YOKOTA, K.; HIRAI, Y. NAGAMACHI, E.; OGUMA, K.** 1997. The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology* 143: 3481-3487.
- **GALLARDO, M.; ROSSI, P.; ALVAREZ, L.; CARDENAS, C.; ANDRADE, B.** 2007. Investigación epidemiológica de la mortandad de aves acuáticas, y de las actividades de rescate y limpieza efectuados en la laguna de Batuco y en la planta La Cadellada, de la Comuna de Lampa, Región Metropolitana de Santiago. **In:** *Il Coloquio sobre Herencia Natural de Chile: Fauna Silvestre - Sociedad, ¿Conflicto o Convivencia?* Santiago, Chile. 12 diciembre 2007. U. de Chile, Casa Central - Programa de Magister en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile.
- **GALVIN, J.W.; HOLLIER, J.; BODINNAR, D.; BUNN, C.M.** 1985. An outbreak of botulism in wild waterbirds in southern Australia. *J. Wildlife Dis.* 21: 347-350.
- **GOPHEN, M.; COHEN, A.; GRINBERG, K.; POKAMUNSKI, S; NILI, E.; WYNNE, D.; YAWETZ, A.; DOTAN, A.; ZOOKRIMON, A.; BEN-SCHLOMO, M.; ORTENBERG, Z.** 1991. Implication of botulism outbreaks in gulls (*Larus ridibundus*) on the watershed management of Lake Kinneret (Israel) *Environ. Toxic. Water.* 6: 77-84.
- **GRAHAM, J.M.; SMITH, G.R.; BORLAND, E.D.; MACDONALD, J.W.** 1978. Botulism in winter and spring and the stability of *Clostridium botulinum* type C toxin. *Vet. Rec.* 102: 40-41.
- **HAAGSMA, J.; OVER, H.J.; SMIT, T.; HOEKSTRA, J.** 1972. Botulism in waterfowl in the Netherlands in 1970. *Neth. J. Vet. Sci.* 5: 12-33.

- **HAAGSMA, J.** 1987. Laboratory investigation of botulism in wild birds. In: Eklund, M. W.; Dowell V.R. (Eds.). Avian Botulism: An International Perspective. Charles C Thomas, Springfield, IL, Estados Unidos pp. 283-293.
- **HALL, J.D.; McCROSKEY, L.M.; PINCOMB, B.J.; HATHEWAY, C.L.** 1985. Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. J. Clin. Microbiol. 21: 654-655.
- **HATHEWAY, C.L.** 1995. Botulism: the present status of the disease. Curr. Top. Microbiol. 195: 221-241.
- **HERREROS, J.; LALLI, G.; MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G.** 1999. Pathophysiological properties of clostridial neurotoxins. In: Alouf, J.E.; Freer, J.H. (Eds.). The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Academic Press, London, U.K., pp. 292-328.
- **HIDALGO, H.; MONTECINO, D.; ALVAREZ, J.; JURI, J.** 2008a. Tipo de aves de humedales afectadas por alta mortalidad atribuible a Botulismo en diferentes focos en la Región Metropolitana (2005 – 2007). In: Encuentro Universitario sobre Manejo y Conservación de Flora y Fauna Silvestre. Santiago, Chile. 11 -13 agosto 2008. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias – Ecovet.
- **HIDALGO, H.; MONTECINO, D.; ALVAREZ, L.; GOMEZ, J.I.** 2008b. Signos clínicos, postmortem, histopatología y biotoxicología asociada a botulismo en aves de humedales en la región metropolitana (2005 – 2007). In: IX Congreso Chileno de Ornitología. El Tabo, Chile. 27 – 30 agosto 2008. AvesChile.
- **HOFER, J.W.; DAVIS, J.** 1972. Survival and dormancy. Tex. Med. 68: 80-81.
- **HOCH, D.H.; ROMERO-MIRA, M.; EHRLICH, B.E.; FINKELSTEIN, A.; DASGUPTA, B.R.; SIMPSON, L.L.** 1985. Channels formed by botulinum, tetanus and diphtheria toxins in planar bilipid layers: relevance to traslocation of proteins across membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1692-1696.
- **HUBALEK, Z.; HALOUZKA, J.** 1988. Thermal sensitivity of clostridium botulinum type C toxin. Epidemiol. Infect. 101: 321-325.
- **HUBALEK, Z.; HALOUZKA, J.** 1991. Persistence of Clostridium botulinum type C toxin in blow fly (Calliphoridae) larvae as a possible cause of avian botulism in spring. J. Wildlife Dis. 27: 81-85.
- **HUMEAU, Y.; DOUSSAU, F.; GRANT, N.J.; POULAIN, B.** 2000. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. Biochimie 82: 427-446.

- **HUNTER, B.F.; CLARK, W.E.; PERKINS, P.J.; COLEMAN, P.R.** 1970. Applied botulism research including management recommendations – A progress report. California Department of Fish and Game, Sacramento, CA, Estados Unidos, 87 pp.
- **INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM.** 2002. Reference for physiological values in captive wildlife, CD-ROM. International Species Inventory System, Apple Valley, MN, Estados Unidos.
- **JENSEN, W.I.** 1981. Evaluation of a coproexamination as a diagnostic test for avian botulism. *J. Wildlife Dis.* 17: 171-176.
- **JENSEN, W.I.; PRICE, J.I.** 1987. The global importance of type C botulism in wild birds. **In:** Eklund, M. W.; Dowell V.R. (Eds.). *Avian Botulism: An International Perspective.* Charles C Thomas, Springfield, IL, Estados Unidos pp. 33-54.
- **JIN, Y.; TAKEGAHARA, Y.; SUGAWARA, Y.; MATSUMURA, T.; FUJINAGA, Y.** 2009. Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins – differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C. *Microbiology* 155: 35-45.
- **JUBILO, K.; LAMARQUE, F.** 1998. Botulism in waterfowl: situation in France in 1996. *Gibier Faune Sauvage* 15: 507-512.
- **KALMBACH, E.R.** 1968. Type C botulism among wild birds – a historical sketch. Bureau of Sports fisheries and Wildlife Special Scientific Report: 110, 8 pp.
- **KIYATKIN, N.; MAKSYMOWYCH, A.B.; SIMPSON, L.L.** 1997. Induction of an immune response by oral administration of recombinant botulinum toxin. *Infect. Immun.* 65: 4586-4591.
- **KURAZONO, H.K.; SHIMOZAWA, G.; SAKAGUCHI, G.; TAKAHASHI, M.; SHIMIZU, T.; KONDO, H.** 1985. Botulism among penned pheasants and protection by vaccination with C<sub>1</sub> toxoid. *Res. Vet. Sci.* 38: 104-108.
- **KUZNETZOV, E. A.** 1992. Botulism in wild waterfowl in the USSR. **In:** *Diseases and Parasites of Wild Animals.* Ministry of Ecology and Natural Resources of Russia, Moscow, Russia, pp. 112-122.
- **LEON, L.; MIRANDA, A.; CARRANZA, J.; PEREA, A.** 1979. Intoxicación botulínica en aves acuáticas silvestres en la marisma del Guadalquivir (Coto Doñana). *Doñana- Acta Vertebrata* 1:120-123.
- **LEON, A.J.; INFANTE, D.M.; De NOGUERA, C.; PULGAR, E.; QUIROZ, G.C.; HERRERA, A.J.; VALDILLO, P.** 1989. Brotes de botulismo tipo c en aves. *Vet. Trop.* 14: 37-42.

- **LEYER, G.J.; JONHSON, E.A.** 1990. Repression of toxin production by triptophan in *Clostridium botulinum* type C. Arch. Microbiol.154: 443-447.
- **LI, Z.J.** 1990. Study on animal botulism in Anxi-Dunhuang grassland of China. J. Toxicol. 9: 113.
- **LOCKE, L.; FRIEND M.** 1989. Avian Botulism: Geographic expansion of a historic disease. [en línea]  
<<http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1002&context=icwdmwfm>>  
[consulta: 15-07-2008]
- **MALCOLM, J.M.** 1982. Bird collisions with a power transmission line and their relation to botulism at a Montana wetland. Wildlife Soc. Bull., 10: 297-304.
- **MAKSYMOWYCH, A.B.; SIMPSON, L.L.** 1998. Binding and transcytosis of botulinum toxin by polarized human colon carcinomacells. J. Biol. Chem. 273: 21950-21957.
- **MAKSYMOWYCH, A.B.; REINHARD, M.; MALIZIO, C.J.; GOODNOUGH, M.C.; JOHNSON, E.A.** 1999. Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. Infect. Immun. 67: 4708- 4712.
- **MARTINEZ, R.; WOBESER, G.** 1999. Immunization of ducks for type C botulism. J. Wildlife Dis. 35: 710-715.
- **MATVEEV, K.I.; KONSTANTINOVA, N.D.** 1974. The role played by migrating birds in the distribution of the botulism agent. Hyg. Sanit. 12: 91-92.
- **MAY, A.J.; WHALER, B.C.** 1958. The absorption of *Clostridium botulinum* type A toxin from the alimentary canal. Br. J. Exp. Pathol. 39: 307-316.
- **MIKUSKA, J.; MIKUSKA, T.; PELLE, J.; PELLE, Z.** 1986. The dying of birds at Slano Kopovo near Novi Becej in the summer of 1982. Larus 36: 331-315.
- **MONTECUCCO, C.** 1986. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? Trends Biochem. Sci.11: 315-317.
- **MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G.; GAO, Z.; BAUERLEIN, E.; BOQUET, P.; DASGUPTA, E.R.** 1988. Interaction of botulinum and tetanus toxins with the lipid bilayer surface. Biochem. J. 251: 379-383.
- **MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G.** 1994. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. Mol. Microbiol.13: 1-8.

- **MURPHY, T.; LAWSON, A.; NALEWAJKO, C.; MURKIN, H.; ROSS, L.; OGUMA, K.; MCINTYRE, T.** 2000. Algal toxins – Initiators of avian botulism? *Environ. Toxicol.* 15: 558-567.
- **NEUBAUER, M.; HUDEC, K.; PELLANTOVA, J.** 1988. The occurrence of *Clostridium botulinum* type C bacterium and botulotoxin in an aquatic environment in southern Moravia. *Folia Zool.* 37: 255-262.
- **NIEMANN, H.** 1991. Molecular biology of clostridial neurotoxins. **In:** Alouf, J.E.; Freer, J.H. (Eds.). *A Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, London, U.K., pp. 303-348.
- **NISHIKAWA, A.; UOTSU, N.; ARIMITSU, H.; LEE, J-C.; MIURA, Y.; FUJINAGA, Y.; NAKADA, H.; WATANABA, T.; OHYAMA, T.; SASKANA, Y.; OGUMA, K.** 2004. The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 327-333.
- **OHISHI, I.G.** 1984. Oral toxicities of clostridium botulinum type A and B toxins from different strains. *Infect. Immun.* 43: 487-490.
- **OHISHI, I.G.; SAKAGUCHI, G.; RIEMANN, H. BEHYMER, D.; HURVELL, B.** 1979. Antibodies to clostridium botulinum toxins in free-living birds and mammals. *J. Wildlife Dis.* 15: 3-9.
- **OLAYEMI, F.; OYEWALE, J.; OMOLEWA, F.** 2002. Plasma chemistry values in the young and adult igerian duck (*Anas platyrhynchos*). *Israel J. Vet. Sci.* 57: 156-158.
- **PATARNELLO, T.; BARGELLONI, L.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C.** 1993. Neurotransmission and secretion. *Nature*: 364, 581-582.
- **PELLIZZARI, R.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C.** 1999. Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philos. Trans. Roy. Soc. B* 354: 259-268.
- **POLERO, B.J.; SMITSAART, T.E.; BEAUDOIN, J.; CARREIRA, J.** 1980. Botulismo en aves acuáticas en semi-cautiverio. *Rev. Invest. Agrop.* 14: 667-672.
- **QUORTRUP, E. R.; SUDHEIMER, R. L.** 1943a. Detection of botulinus toxin in the blood stream of wild ducks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 102: 264-266.
- **REED, T.; ROCKE, T. E.** 1992. The role of avian carcasses in botulism epizootics. *Wildlife Soc. Bull.* 20:175-182.



- **ROCKE, T.E.** 2006. The global importance of avian botulism. In: Boere, G.C.; Galbraith C.A.; Stroud, D.A. Waterbirds Around the World. The Stationery Office, Edinburgh, U.K. pp. 422-426.
- **ROCKE, T.E.; BRAND, C.J.** 1994. Use of sentinel mallards for epizootiologic studies of avian botulism. *J. Wildlife Dis.* 30: 514-522.
- **ROCKE, T. E.; SMITH, S. R.; NASHOLD, S. W..** 1998. Preliminary evaluation of a simple *in vitro* test for the diagnosis of type C botulism in wild birds. *J. Wildlife Dis.* 34: 744-755.
- **ROCKE, T.E.; EULISS, N.H.; SAMUEL, M.D.** 1999. Environmental characteristics associated with the occurrence of avian botulism in wetlands of a northern California refuge. *J. Wildlife Manage.* 63: 358-368.
- **ROCKE, T. E.; FRIEND, M.** 1999. Avian botulism. In: Friend, M.; Franson, J. C. (Eds.). Field Manual of Wildlife Diseases: General Procedures and Diseases of Birds. Biological Resources Division Information Technology Report 1999-001, U.S. Geological Survey, Washington, D.C., Estados Unidos pp. 217- 281.
- **ROCKE, T.E.; SAMUEL, M.D.** 1999. Water and sediments characteristics associated with avian botulism outbreaks in wetlands. *J. Wildlife Manage.* 63: 1249-1260.
- **ROCKE, T.E.; SAMUEL, M.D.; SWIFT, P.K.; YARRIS, G.S.** 2000. Efficacy of a type C botulism vaccine in green-winged teal. *J. Wildlife Dis.* 36: 489-493.
- **ROCKE, T.E.; NOL, P.; PELLIZA, C.; STURM, K.** 2004. Type C botulism in pelicans and other fish-eating birds at the Salton Sea. *Stud. Avian Biol.* 27: 136-140.
- **ROCKE, T.E.; BOLLINGER, T. K.** 2007. Avian botulism. In: Thomas, N.; Hunter, B.; Atkinson, C. (Eds.). *Infectious Diseases of Wildbirds.* Blackwell publishing. Ames, Iowa, U.S. pp. 377-416.
- **SAKAGUCHI, G.** 1983. Clostridium botulinum toxins. *Pharmacol. Therapeut.* 19: 165-194.
- **SAKAGUCHI, G.; KOSAKI, S.; OHISHI, I.** 1984. Structure and function of botulinum toxins. In: Alouf, J.E. (Ed.). *Bacterial Protein Toxins,* Academic press, London, pp. 435–443.
- **SAKAGUCHI, Y.; HAYASHI T.; KURAKAWA, K.; NAKAYAMA, K.; OSHIMA, K.; FUJINAGA, Y.; OHNISHI, M.; OHTSUBO, E.; HATORRI, M.; OGUMA, K.** 2005. The genome sequence of Clostridium botulinum type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 2005; 102:17472–17477.

- **SANDLER, R.J.; ROCKE, T.E.; SAMUEL, M.D.; YUILL, T.M.** 1993. Inhibition of Clostridium botulinum type C by other bacteria in wetland sediments. *J. Wildlife Dis.* 34: 803-833.
- **SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B.; ROSSETTO, O.; POLVERINO, P.; DE LAURETO, D.; DASGUPTA, B.R.; MONTECUCCO, C.** 1992a. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of sinaptobrevin. *Nature* 39: 832-835.
- **SCHIAVO, G.; ROSETTO, O.; SANTUCCI, A.; DASGUPTA, B.R.; MONTECUCCO, C.** 1992b. Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J. Biol. Chem.* 167: 23479-23483.
- **SCHIAVO, G.; POULAIN, B.; BENFENATI, F.; DASGUPTA, B.R.; MONTECUCCO, C.** 1993a. Novel targets and catalytic activities of bacterial protein toxins. *Trends Microbiol.* 1: 170-174.
- **SCHIAVO, G.; SHOE, C.C.; BENETT, M.K.; SCHELLERI, R.H.; MONTECUCCO, C.** 1995. Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxy-terminal region of syntaxins. *J. Biol. Chem.* 270: 10566-10570.
- **SCHIAVO, G.; MATEOLLI, M.; MONTECUCCO, C.** 2000. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80: 717-766.
- **SCHONHOFEN, C.S.; FERREIRA, R.G.** 1981. First outbreaks of botulism in wild ducks in Curitiba. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 24: 433-435.
- **SCHWARTZ, L.K.; SMART, G.** 1963. Control of botulism in wild fowl. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 143: 163.
- **SEGNER, W.P.; SCHMIDT, C.F.; BOLTZ, J.K.** 1971. Enrichment, isolation, and cultural characteristics of marine strains of Clostridium botulinum type C. *Appl. Microbiol.* 22: 1017-1024.
- **SIMPSON, L.L.** 1981. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol. Rev.* 33: 155-188.
- **SIMPSON, L.L.** 1982. A comparison of the pharmacological properties of Clostridium botulinum type C<sub>1</sub> and type C<sub>2</sub> toxins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223: 695-701.
- **SIMPSON, L.L.** 1989. Peripheral actions of the botulinum toxins. **In:** Simpson, L. L. (Ed.). *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin.* Academic Press, New York, NY, Estados Unidos, pp. 153-178.
- **SIMPSON, L.L.** 2004. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Anu. Rev. Pharmacol.* 44: 167-193.

- **SKULBERG, A.; HOLT, F.** 1987. Avian botulism in Scandinavia. **In:** Eklund, M. W.; Dowell V.R. (Eds.). Avian Botulism: An International Perspective. Charles C Thomas, Springfield, IL, Estados Unidos pp. 107-110.
- **SMITH, G.R.; HIME, J.M.; KEYMER, I.F.; GRAHAM, J.M.; OLNEY P.J.S.; BRAMBELL, M.R.** 1975. Botulism in captive birds fed commercially-bred maggots. Vet. Rec. 97: 204-205.
- **SMITH, G.R.** 1978. Botulism waterfowl and mud. Br. Vet. J.134: 407-411.
- **SMITH, M.V.; PIERSON, M.D.** 1979. Effect of reducing agents on oxidation-reduction potential and the outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores. Appl. Environ. Microb. 37: 978-984.
- **SMITH, G.R.; TURNER, A.** 1987. Factors affecting the toxicity of rotting carcasses containing *Clostridium botulinum* type C. Epidemiol. Infect. 98: 345-351.
- **SMITH, L.; SUGIYAMA, H.** 1988. Botulism: The Organism. Its Toxins, the Disease. Second Edition. Charles C. Tomas, Springfield. IL, Estados Unidos, 171 pp.
- **SOOS, C.** 2004. Links between avian botulism outbreaks in waterfowl, hatching asynchrony, and life history trade-offs of pre fledgling Franklin's gulls. PhD thesis. University of Saskatchewan, Saskatoon, Sask, Ca., 144 pp.
- **SOOS, C.; WOBESER, G.** 2004. Identification of primary substrate in the initiation of avian botulism outbreaks. J. Wildlife Manage. 70: 43-53.
- **STUTZENBAKER, C.D.; BROWN, K.; LOBPRIES, D.** 1986. Special report: an assessment of the accuracy of documenting waterfowl die-offs in a Texas coastal marsh. **In:** Feierabend, J.S.; Russel, A.B. (Eds.). Lead Poisoning in Wild Waterfowl. National Wildlife Federation, Washington, D.C., Estados Unidos, pp 88-95.
- **SUGIYAMA, H.** 1980. *Clostridium botulinum* neurotoxin. Microbiol. Rev. 44: 419-448.
- **SWERCZEK, T.W.** 1980. Toxicoinfections botulism in foals and adult horses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 176: 217-220.
- **TAKEDA, M.; TSUKAMOTO, K.; KOHDA, T.; MATSUI, M.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S.** 2005. Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. Avian Dis. 49: 376-381.
- **THOMAS, R.J.** 1991. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. Aust. Vet. J. 68: 111-113.

- **TSUKAMOTO, K.; KOHDA, T.; MUKAMOTO, M.; TAKEUCHI, K.; IHARA, H.; SAITO, M.; KOZAKI, S.** 2005. Binding of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. *J. Biol. Chem.* 280: 35164-35171.
  
- **WILLIAMSON, J.L.; ROCKE, T.E.; AIKEN, J.M.** 1999. In situ detection of the *Clostridium botulinum* type C<sub>1</sub> toxin gene in wetland sediments with a nested PCR assay. *Appl. Environ. Microb.* 65: 3240-3243.
  
- **WOBESER, G.; RAINNIE, D. J.; SMITH-WINDSOR, T. B.; BOGDAN, G.** 1983. Avian Botulism during late autumn and early spring in Saskatchewan. *J. Wildlife Dis.* 19: 90-94.
  
- **WOBESER, G.; GALMUT, E.A.** 1984a. Rate of digestion of blowfly maggots by ducks. *J. Wildlife Dis.* 20: 154-155.
  
- **WOBESER, G.; GALMUT, E.A.** 1984b. Internal Temperature of Decomposing duck carcasses in relation to botulism. *J. Wildlife Dis.* 20: 267-271.
  
- **WOBESER, G.** 1987. Control of botulism in wild birds. **In:** Eklund, M. W.; Dowell V.R. (Eds.). *Avian Botulism: An International Perspective.* Charles C Thomas, Springfield, IL, Estados Unidos pp. 339-348.
  
- **WOBESER, G.; MARSDEN, S.; MACFARLANE, R. J.** 1987. Occurrence of toxigenic *Clostridium botulinum* type C in the soil of wetlands in Saskatchewan. *J. Wildlife Dis.* 23: 67-76.
  
- **WOBESER, G.** 1997a. Avian botulism – another perspective. *J. Wildlife Dis.* 33: 181-186.
  
- **WOBESER, G.** 1997b. Botulism. **In:** Wobeser, G. (Ed.). *Diseases of Wild Waterfowl*, 2<sup>nd</sup> Ed., Plenum Press, New York. Pp. 149-162.
  
- **WOODALL, P.F.** 1982. Botulism outbreak in waterbirds at Seven-Mile lagoon in south-east Queensland. *Aust. Wildlife Res.* 9: 533-539.

ANEXO NÚMERO 1: Hemogramas y Perfiles Bioquímicos de los Patos Experimentales

PATO NUMERO 1 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl	13,2	11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %	43	39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl	31	32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul	6.625	13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul	46	
Segmentados/ ul	1.723	6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul	4.571	5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul	0	682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul	331	630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl	4,7	4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl	1,9	1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl	2,8	2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L	20	27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl	9,4	8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl	4,0	4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

PATO NUMERO 2 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl	14,0	11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %	44	39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl	32	32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul	1.675	13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul	0	
Segmentados/ ul	486	6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul	1.005	5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul	0	682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul	184	630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl	4,4	4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl	1,7	1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl	2,7	2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L	22	27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl	8,8	8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl	2,44	4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

#### PATO NUMERO 3 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl	13,3	11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %	42	39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl	32	32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul	4.504	13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul	46	
Segmentados/ ul	1.126	6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul	2.747	5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul	0	682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul	585	630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl	5,3	4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl	1,8	1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl	3,5	2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L	29	27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl	18	8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl	3,4	4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

PATO NUMERO 4 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl	12,4	11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %	44	39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl		32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul		13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul		
Segmentados/ ul		6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul		5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul		682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul		630 ± 695 <sup>a</sup>

No se puede realizar diferencial, ya que presenta un coagulo significativo.

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl	4,6	4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl	1,5	1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl	3,1	2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L	24	27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl	9,2	8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl	7,9	4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

PATO NUMERO 5 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl	14,8	11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %	46	39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl	32	32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul	8.246	13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul	82	
Segmentados/ ul	1.979	6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul	5.607	5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul	0	682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul	578	630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl	4,1	4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl	1,5	1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl	2,6	2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L	27	27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl	9,3	8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl	2,22	4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

#### PATO NUMERO 6 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl		11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %		39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl		32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul		13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul		
Segmentados/ ul		6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul		5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul		682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul		630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl		4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl		1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl		2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L		27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl		8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl		4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>



PATO NUMERO 7 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl		11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %		39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl		32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul		13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul		
Segmentados/ ul		6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul		5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul		682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul		630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl		4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl		1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl		2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L		27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl		8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl		4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

PATO NUMERO 8 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl		11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %		39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl		32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul		13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul		
Segmentados/ ul		6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul		5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul		682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul		630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl		4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl		1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl		2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L		27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl		8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl		4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

PATO NUMERO 9 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl		11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %		39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl		32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul		13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul		
Segmentados/ ul		6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul		5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul		682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul		630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl		4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl		1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl		2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L		27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl		8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl		4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

PATO NUMERO 10 RAZA PORTUGUES

HEMOGRAMA		
	Resultado	Valor de Referencia
Hemoglobina g/dl		11,7 ± 2,4 <sup>a</sup>
V.G.A. %		39,3 ± 6,5 <sup>a</sup>
C.H.C.M. g/dl		32,1 ± 11,8 <sup>a</sup>
Leucocitos Totales/ ul		13.080 ± 8.278 <sup>a</sup>
Baciliformes/ ul		
Segmentados/ ul		6.544 ± 6.112 <sup>a</sup>
Linfocitos/ ul		5.254 ± 3.048 <sup>a</sup>
Monocitos/ ul		682 ± 1.060 <sup>a</sup>
Eosinófilos/ ul		630 ± 695 <sup>a</sup>

PERFIL BIOQUIMICO		
Proteína Sérica g/dl		4,6 ± 1,1 <sup>a</sup>
Albúmina g/dl		1,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
Globulinas g/dl		2,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
AST (GOT) U/L		27 ± 22 <sup>a</sup>
Calcio mg/dl		8,56 ± 0,21 <sup>b</sup>
Fosforo mg/dl		4,41 ± 0,29 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Valores de referencia tomados desde Reference for physiological values in captive wildlife, CD – ROM. International Species Information System (I.S.I.S.)

<sup>b</sup> Valores de referencia tomados de Olayemi *et al.* (2002)