

ANÁLISIS DEL RIESGO DE INTOXICACIÓN POR BOTULISMO EN MALVASÍA CABECIBLANCA Y OTRAS ESPECIES DE AVES ACUÁTICAS EN LAS TABLAS DE DAIMIEL Y HUMEDALES CERCANOS

DOLORS VIDAL¹, MARK. A. TAGGART¹, ÚRSULA HOFLE¹, RAMÓN GONZÁLEZ², ALEJANDRO CIFUENTES², LAURA SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ², JOSÉ BARCENILLA², BEGOÑA JIMÉNEZ³, ANDY J. GREEN⁴ Y RAFAEL MATEO¹, *

RESUMEN

El botulismo es una intoxicación frecuente en las aves de los humedales castellanos-manchegos. Desde 1978, se han registrado 13 brotes de botulismo repartidos en cuatro zonas: lagunas manchegas de Toledo, Ciudad Real y Cuenca, las Tablas de Daimiel, y las colas de los embalses del Vicario y de la Vega del Jabalón. El número de aves encontradas muertas en estos brotes oscila alrededor de 20.000 individuos de más de 50 especies. La aparición de los brotes y la mortalidad de aves se asocian con elevadas temperaturas medias durante el mes de julio (>26°C).

Con el fin de estudiar la presencia de *Clostridium botulinum* como indicador del riesgo de aparición de brotes de botulismo en aves acuáticas, hemos desarrollado una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). Esta RT-PCR ha sido validada con DNA de las cepas 96-SAC de la Universidad de Wisconsin y CIP104.983 del Instituto Pasteur. Además los resultados de esta RT-PCR han sido comparados con los obtenidos con una PCR anidada y otra convencional, observándose una mayor sensibilidad con la RT-PCR descrita por nuestro grupo.

La presencia de *C. botulinum* C1-toxigénico ha sido observada en 12 de 207 (5,8%) sedimentos de los humedales castellano-manchegos analizados tras ser cultivados en medio líquido de carne cocida. Las muestras positivas son de los meses de julio y agosto, y principalmente proceden de humedales en los que existía un brote de botulismo en el momento del muestreo y de zonas en que los niveles en sedimento de Cl⁻ son bajos. Los puntos en que se ha detectado la bacteria con más frecuencia han sido El Morenillo y la Laguna Permanente en las Tablas de Daimiel, las lagunas de la Veguilla y el Camino de Villafranca en Alcázar de San Juan y la cola del Embalse de la Vega del Jabalón.

En muestras de cadáveres de aves acuáticas recogidos en mortalidades masivas ocurridas en humedales castellano-manchegos se ha detectado *C. botulinum* en el 41% de las aves (n=70). En las 4 malvasías cabeciblancas (*Oxyura leucocephala*) analizadas de humedales castellano-manchegos no se ha detectado la presencia de *C. botulinum*. No se ha detectado *C. botulinum* en aves utilizadas como controles (de zonas sin brotes de botulismo). La especie en que aparece con más frecuencia *C. botulinum* es la gaviota reidora (*Larus ridibundus*). Se ha detectado la presencia de *C. botulinum* en moscas del género *Lucilia*, ade-

¹Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM, Ciudad Real).

²Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC, Madrid).

³Instituto de Química Orgánica General (CSIC, Madrid).

⁴Estación Biológica de Doñana (CSIC, Sevilla).

*E-mail: rafael.mateo@uclm.es

más de en sus larvas y pupas, por lo que además de tener un papel en la intoxicación de aves que se alimentan de las larvas con toxina, las formas adultas pueden favorecer la dispersión de la bacteria a otros cadáveres. Por otra parte, también se detecta la presencia de *C. botulinum* en invertebrados acuáticos como quironómidos y coríxidos, y de hecho especies de patos que se alimentan de invertebrados pequeños como son la cerceta común (*Anas crecca*) y el pato cuchara (*Anas clypeata*) resultan muy afectadas por los brotes de botulismo registrados en Castilla-la-Mancha.

Entre las medidas que se pueden adoptar sugerimos la creación de un protocolo de actuación en mortalidades masivas de aves acuáticas, dotación de personal y equipamiento especializado, la monitorización de puntos críticos del sedimento y el control de especies portadoras de la bacteria cuando la temperatura media es superior a los 26 °C. Asimismo, sugerimos la monitorización activa de moscas de la familia *Calliphoridae* para estudiar su papel en la dispersión de *C. botulinum* y para un posible control de los brotes.

Palabras clave: Botulismo aviar, *C. botulinum* tipo C, sedimento, humedal, aves acuáticas, RT-PCR.

SUMMARY

Botulism outbreaks and their resultant toxic effects are a common risk for birds within the Spanish wetlands of Castilla-la-Mancha. Since 1978, there have been 13 outbreaks of botulism within four different areas, i.e. in lagoons of the provinces of Ciudad Real, Toledo and Cuenca, in Tablas Daimiel, and in the reservoirs of Vicario and Vega del Jabalón. The number of dead birds found during these outbreaks is about 20,000 individuals, from more than 50 species. The initiation of these outbreaks, with associated avian mortality, is linked to high average temperatures during the month of July (>26 °C).

In order to investigate the factors that trigger and maintain a botulism outbreak, that then affects waterbirds, we have monitored for the presence of *Clostridium botulinum* in a variety of media using a new real time quantitative PCR technique (RT-PCR). This RT-PCR has been validated using DNA from strains 96-SAC (from the University of Wisconsin) and CIP 104983 (from the Pasteur Institute). Results derived using our RT-PCR technique have also been compared with those obtained from a nested and conventional PCR, and our RT-PCR has been shown to provide greater sensitivity.

The presence of C1-toxigenic *C. botulinum* has been identified in 12 of 207 (5.8%) sediment samples taken from wetlands in Castilla-la-Mancha, that were analyzed after cultivation in a cooked meat medium. Positive samples were all from sediments taken during the months of July and August, and predominantly, from wetlands where an outbreak of botulism was known to have occurred around the sampling period. Also, positive results were more common in samples from sediments that were lower in water soluble chloride. The areas in which the bacteria have been detected with more frequency were El Morenillo and the Permanent Lagoon in Tablas Daimiel, the lagoons of Veguilla and Camino de Villafranca in Alcázar de San Juan, and in the reservoir at Vega del Jabalón.

In samples from dead waterbirds taken during periods of high mortality (related to apparent botulism outbreaks) in wetlands in Castilla-la-Mancha, we have detected *C. botulinum* in 41% of birds (n = 70). In 4 white-headed duck (*Oxyura leucocephala*) samples analyzed, none were found to be positive for *C. botulinum*. We did not however, detect *C. botulinum* in birds used as controls: hunted ducks from the Ebro Delta, cloacal samples from live ducks from the Tablas Daimiel and from live gulls in three areas of Catalonia. The species in which we detected *C. botulinum* with greater frequency was black-headed gull (*Larus ridibundus*). The presence of *C. botulinum* has also been detected in flies (*Lucilia caesar*), lar-

vae and pupa. Birds may feed on fly larvae and this is known to play a role in intoxication and spread/outbreak of botulism, but likewise, adult flies may also play a significant role in the dispersion and spread of bacteria to other avian corpses. Also, *C. botulinum* was detected in aquatic invertebrates (chironomids and corixids), and species of duck that feed on small invertebrates such as common teal (*Anas crecca*) and shoveler (*Anas clypeata*) are often severely affected in a botulism outbreak.

Among other measures that could be adopted to reduce the risk of botulism outbreaks to birds, we propose the creation of a protocol of action that should be used during large incidences of waterbird mortality, and dedicated personnel should be trained and provided with specialized equipment. Critical points of botulism development (i.e. sediments) should be monitored, especially when the average temperature is over 26 °C. A monitoring program directed at flies as vectors of transfer, specifically Calliphoridae, would also help enhance our understanding of its role in the dispersion *C. botulinum*, and may provide information that could be used to subsequently control or reduce the risks of outbreaks.

Key words: Avian botulism, *C. botulinum* type C, sediment, wetland, waterfowl, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

El botulismo es una intoxicación causada por una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum* (WOBESER 1997). Existen varios tipos de toxina, siendo el tipo C el que está mayoritariamente implicado en los casos de botulismo aviar (MITCHELL & ROSENDAL, 1987). La toxigenicidad de la bacteria depende exclusivamente de un fago que contiene el gen que codifica para la toxina (EKLUND 1971). Esta intoxicación produce brotes de mortalidades aviarias en zonas húmedas de todo el mundo, exceptuando el antártico (ROCKE 2006). Estos episodios suelen ser estacionales entre los meses de julio y septiembre, pero esporádicamente se dan casos en otras épocas (ROCKE 2006).

El diagnóstico del botulismo aviar se basa inicialmente en una sospecha de la presentación del cuadro clínico: elevadas mortalidades en aves de zonas húmedas y signos neurológicos de parálisis flácida en animales afectados. Pero lo que confirma la intoxicación, es la detección de la toxina en muestras de animales con técnicas basadas en bioensayos (ZECHMEISTER *et al.* 2005) o ELISA (GREGORY *et al.* 1996; ROCKE *et al.* 1998; ZECHMEISTER *et al.* 2005). En estos últimos años, se han desarrollado varias técnicas moleculares que se basan en la detección del gen que codifica para la toxina, tanto en muestras de sedimentos como muestras de origen animal (FRANCIOSA *et al.*

1996; WILLIAMSON *et al.* 1999; PRÉVOT *et al.* 2007).

Existen varios factores predisponentes en la aparición de brotes de botulismo, con una enorme complejidad entre sus asociaciones (ROCKE 2006). Entre estos factores se cita a la temperatura elevada (que favorece la descomposición de los cadáveres donde el bacilo se multiplica en condiciones obligadas de anaerobiosis), presencia de las esporas del bacilo en el medio ambiente (principalmente en sedimentos), interrelación entre cadáveres y larvas necrófagas (que son resistentes a la toxina y magnifican la dispersión de toxina hacia otras aves) y comportamiento trófico de las especies afectadas.

Los objetivos del presente trabajo han sido:

1. Recopilar los brotes de botulismo diagnosticados en humedales manchegos en los últimos 20 años.
2. Desarrollar una técnica de detección por PCR en tiempo real (RT-PCR) que permita identificar y cuantificar la presencia de *Clostridium botulinum* en muestras de campo.
3. Utilizar la RT-PCR para determinar la abundancia de *Clostridium botulinum* en muestras de sedimentos de humedales y buscar la relación con características físico-químicas del se-

dimento, variaciones estacionales y climatológicas y la existencia de brotes de botulismo aviar en las zonas estudiadas.

4. Valorar el uso de la RT-PCR como técnica de diagnóstico de brotes de botulismo en aves acuáticas.
5. Estudiar la implicación en la epidemiología del botulismo de invertebrados acuáticos e insectos necrófagos en sus diferentes fases del ciclo vital.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recopilación de datos

Se han recopilado los datos oficiales de mortalidades asociadas a botulismo en aves acuáticas desde 1978 hasta 2008 en los humedales manchegos (fuente: Junta de Comunidades de Castilla-la Mancha) y varios datos meteorológicos entre 1997 y 2006 del Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t43/a012/a1998&file=pcaxis>).

Zona de estudio. Muestreo

La zona de estudio se ha centrado en los humedales manchegos, principalmente en las Tablas de Daimiel, pero también en otros humedales cercanos con brotes de botulismo registrados en los últimos 20 años. Se hizo un muestreo de 207 sedimentos entre los años 2005 y 2008 (Tabla 1), de 70 especies de aves procedentes en su mayoría de cinco brotes de botulismo (Tabla 2) y de 42 *pooles* de invertebrados recolectados en cadáveres y en el ambiente (agua y sedimento) en momentos de brote de botulismo (Tabla 3). Asimismo se muestreó un total de 74 animales como controles para el botulismo, en concreto 24 ciegos de patos cazados en el Delta del Ebro en la temporada 2007-2008, 45 hisopos cloacales de gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) procedentes de diversos puntos de Cataluña y Valencia proporcionados por la Dra. Martí Cerdà del CReSA y 20 hisopos cloacales de *A. platyrhynchos* procedentes del PN de las Tablas de Daimiel recolectados en julio del 2005 en un momento en que no existía un brote de botulismo.

Diagnóstico de *C. botulinum* toxigénico

Detección del gen que codifica para la toxina C1 de C. botulinum tipo C: Para determinar la presencia de *C. botulinum* tipo C toxigénico, se diseñó una PCR a tiempo real (RT-PCR) con el objetivo de disponer de una técnica sensible, altamente específica y que permitiera analizar un elevado número de muestras. Dicha PCR amplifica una región que codifica para el gen C1 de *C. botulinum* neurotoxigénico (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.* 2008). Esta RT-PCR se ha utilizado para todas las muestras que se han procesado (207 sedimentos enriquecidos por cultivo, 46 sedimentos extraídos directamente, 42 *pooles* de invertebrados enriquecidos por cultivo, 330 muestras de animales enriquecidas por cultivo y 43 muestras de animales extraídas directamente). En el caso de los sedimentos, se ha analizado además con dos diluciones de la extracción: a 1:10 y a 1:100, para evaluar problemas de inhibiciones intrínsecas de la muestra.

Calibrado de las cepas de referencia: Se procedió al calibrado usando dos cepas de referencia: DNA de la cepa de Madison (96-SAC) y cepa de referencia liofilizada del Instituto Pasteur (CIP 104983). La cuantificación se realizó por conteo de microorganismos con cámara de Petroff (sólo para la cepa francesa) y por cuantificación de ADN por espectrofotometría (Nanodrop®).

Comparación de la técnica de RT-PCR con otras técnicas de PCR descritas para detectar C. botulinum C1 toxigénico: Se utilizaron otras dos técnicas de PCR, en concreto una PCR anidada (WILLIAMSON *et al.* 1999) y otra PCR convencional (PRÉVOT *et al.* 2007). Estas técnicas se han utilizado en un total de 179 sedimentos y 95 muestras de animales. En el caso de los sedimentos, éstos se han analizado también para las diluciones 1:10 del extracto de ADN.

Métodos de cultivo microbiológico para el enriquecimiento de las muestras: Se han utilizado cultivos en medio líquido y sólido.

Medio líquido: Se utilizó inicialmente un medio de cultivo líquido comercial, diseñado para *C. botulinum*, con una base de carne cocida y suple-

Año	Zona húmeda							TOTAL
	Tablas	Navaseca	Jabalón	Alcázar	Manjavacas	Pedro	Vicario	
2005	14	–	10 (2)	24	9	15	8	80 (2)
2006	11	–	9	1	–	–	10	31
2007	68	–	–	1	–	–	–	69
2008	–	14 (1)	2 (2)	11 (3)	–	–	–	27 (6)
TOTAL	93	14 (1)	21 (4)	37 (3)	9	15	18	207 (8)

Tabla 1. Sedimentos muestreados por año y zona húmeda. Entre paréntesis: muestras de agua.

Table 1. Sediment sampling by year and wetland. In brackets: water samples.

Año	Embalse del Jabalón (9)	Tablas de Daimiel (13)	Laguna de Navaseca (24)	Alcázar de San Juan (29)	Otros CLM (1)
2005	<i>A plathyrhynchos</i> (4) <i>G chloropus</i> (1) <i>A purpurea</i> (1) ^a <i>B ibis</i> (1)	<i>A plathyrhynchos</i> (2)		<i>O leucocephala</i> (3) ^a	<i>H himantopus</i> (1)
2006	<i>B ibis</i> (1) ^a			<i>A plathyrhynchos</i> (4) <i>F atra</i> (2) <i>H himantopus</i> (3) <i>L ridibundus</i> (1)	
2007	<i>H himantopus</i> (1) ^a	<i>A ferina</i> (3) <i>A fuligula</i> (3) <i>M angustirostris</i> (1) <i>A acuta</i> (1) <i>A crecca</i> (1) <i>N rufina</i> (1) <i>O leucocephala</i> (1)			
2008			<i>A plathyrhynchos</i> (12) <i>F atra</i> (5) <i>A crecca</i> (3) <i>A clypeata</i> (1) <i>A strepera</i> (1) <i>A acuta</i> (1) <i>G gallinago</i> (1)	<i>L ridibundus</i> (10) <i>H himantopus</i> (3) <i>F atra</i> (1) <i>T tadorna</i> (1) <i>A strepera</i> (1)	

Tabla 2. Aves muestreadas por año y zona húmeda. ^a Aves muestreadas no sospechosas de botulismo.

Table 2. Bird samples by year and wetland ^a Birds no suspected to have botulism.

Localización	Tipo de invertebrado	Nº de pools
Sedimento	Pools mixtos en sedimentos (quironómidos principalmente)	11
	Quironómidos de sedimentos	5
Cadáver	Larvas necrófagas de cadáveres	10
	Moscas spp	2
	Moscas verdes (<i>Lucilia caesar</i>)	3
	Huevos de mosca	3
	Pupas de mosca	1
Agua	Corixidos (adultos y larvas)	2
	Invertebrados sin identificar	5
Total pools		42

Tabla 3. Pools de invertebrados investigados según su localización.

Table 3. Pools of invertebrates investigated according to location.

mentado con vitamina K1 y hemina (BD BBL Cooked meat medium with Glu, Hemin & Vit K). Posteriormente se procedió a utilizar un caldo con la misma formulación, preparado en nuestro laboratorio (caldo CBOT). Los dos caldos se testaron con la cepa de referencia *C. botulinum* C (CIP 104983) y se observó que ambos producían crecimiento satisfactorio a 40 °C.

Medios sólidos: Se probaron cuatro medios sólidos para intentar aislar la cepa de referencia a 40 °C y tener un stock de dicha cepa, así como sobre algunas muestras clínicas (de animales) que resultaron positivas a la RT-PCR para tener aislamientos de campo. Estos medios han sido:

- Difco™ Reinforced clostridial medium (BD, Francia, Ref: 218081), añadiendo 14 gr de agar (BD Difco™ Bacto™ Agar, Ref: 214010).
- BD BBL™ CDC Anaerobe Blood Agar Plates (BD, Francia, Ref: 256506)
- Bacto™ McClung Toabe agar base (BD, Ref: 294110), suplementado con huevo (BD Difco™ Egg Yolk Enrichment 50%, Ref: 233741) y sin suplementar.
- Agar “Cooked meat” (Agar CBOT): con la misma formulación que el caldo CBOT, con agar añadido (BD Difco™ Bacto™ Agar, Ref: 214010) a razón de 15 gramos de agar por litro de medio.

Enriquecimiento de las muestras por cultivo: Se han realizado cultivos de muestras de aves del ciego, contenido gástrico, intestino e hisopo cloacal. El cultivo sobre invertebrados se ha realizado sobre mezclas (*pooles*) de varios individuos. El cultivo sobre sedimentos se ha realizado de dos maneras: con el sedimento cultivado directamente y tras un lavado del sedimento en solución salina fisiológica estéril.

Extracciones de ADN de muestras de sedimento: Se ha utilizado un kit comercial para muestras de suelo (PowerSoil™ DNA isolation kit, MoBio, Canadá). Las extracciones se realizaron sobre muestras de sedimento directamente (N=46) y sobre muestras de sedimento cultivado (N=207).

Extracciones de ADN de muestras de origen animal (aves e invertebrados): Las muestras de origen animal se procesaron mediante cultivo en medio líquido con el mismo procedimiento que para sedimentos cultivados. El total de muestras investigadas mediante cultivo previo fue de N=330 para muestras de aves y de N=42 para muestras de invertebrados. Para extracciones directas se utilizó otro kit de extracción (DNAeasy blood and tissues kit, Qiagen, Alemania), para un total de 43 muestras (todas de aves), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Mayoritariamente eran muestras positivas con cultivo previo, tanto de contenidos gástricos (N=7), como de intestinos (N=13), ciegos (N=8) y larvas necrófagas (N=2) para evaluar la sensibilidad del cultivo frente a la extracción directa. Se seleccionaron además otras muestras negativas de animales que habían resultado positivos en otros tejidos (N=13).

Inhibiciones de la PCR: Se comparó varias técnicas de extracción de ADN de sedimentos, así como de varias diluciones del ADN extraído para evaluar posibles inhibiciones de la PCR. También se comparó entre extracciones de ADN directas y con pre-enriquecimiento por cultivo en caldo CBOT, tanto para sedimentos (N=176) como para muestras de animales (N=43).

Relación entre presencia de *Clostridium botulinum* en humedales y las características físico-químicas del sedimento

Para la determinación de las características físico-químicas del sedimento, se tomaron 10 g de sedimento que había sido conservado congelado y se mezclaron con 30 ml de agua Milli-Q durante 30 minutos en un agitador. Posteriormente se dejaron reposar 2 minutos y se midió el pH de la solución. Dicha solución se filtró bajo vacío a través de papel de filtro de 0,45 µm. El líquido filtrado se usó para determinar PO_4^- , NO_3^- , NO_2^- y Cl^- solubles en agua mediante pruebas basadas en espectrofotometría UV/Vis y kits de Merck (Spectroquant®). La humedad y la pérdida de materia por combustión fueron determinadas secuencialmente, primero secando la muestra a 120 °C en una estufa para calcular la cantidad de agua presente en la muestra y después calentando la muestra en un horno mufla a 450 °C para calcular el contenido total de carbono

combustible y de esta forma estimar la cantidad de materia orgánica.

RESULTADOS

Brotos de botulismo registrados en Castilla la Mancha durante los últimos 20 años

El botulismo es una intoxicación frecuente en las aves de los humedales castellano-manchegos. Desde 1978 se han registrado 13 brotes de botulismo repartidos en varias zonas: lagunas manchegas de Toledo, Ciudad Real y Cuenca, las Tablas de

Daimiel, y las colas de los embalses del Vicario y de la Vega del Jabalón (Fig. 1). El número de aves encontradas muertas en estos brotes ronda los 20.000 individuos de más de 50 especies (Tabla 4).

Cabe destacar la gran diversidad de especies encontradas muertas. Entre las que se han encontrado afectadas con mayor frecuencia están *Egretta garzetta*, *Anas clypeata*, *Anas crecca*, *Anas platyrhynchos*, *Anas strepera*, *Fulica atra*, *Himantopus himantopus*, *Recurvirostra avosetta*, *Vanellus vanellus*, *Calidris minuta*, *Larus ridibundus* y *Philomachus pugnax* (Tabla 4). Entre estas especies podemos encontrar a aves con dietas herbívoras (*Anas strepera*, *Fulica atra*), piscívoro-

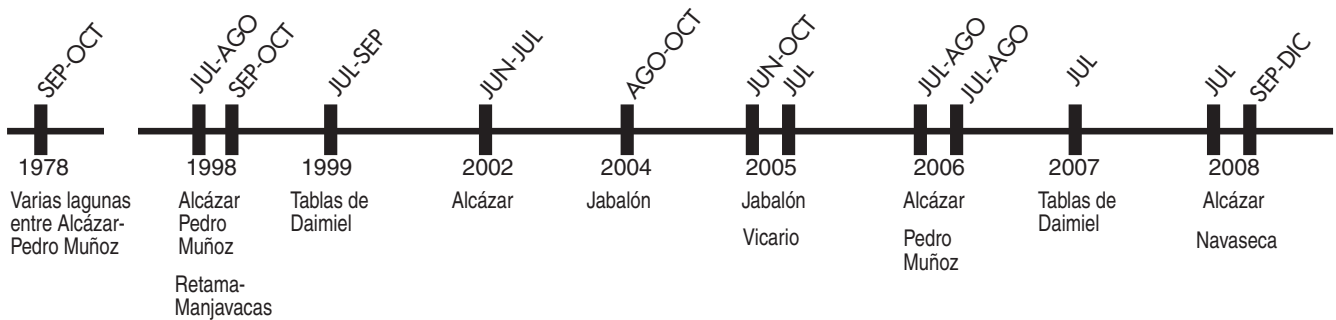


Figura 1. Brotos de botulismo registrados en los humedales manchegos desde 1978 hasta 2008.

Figure 1. Botulism outbreaks in wetlands of Castilla-La Mancha from 1978 to 2008.

ras (*somormujos* y *ardeidos*), insectívoras o con dietas basadas en invertebrados (limícolas) y otras más omnívoras (diversas especies de patos).

En la mortalidad registrada en la laguna de Navaseca a finales de septiembre de 2008, se censaron las aves presentes el 29 de septiembre y se anotaron las aves encontradas muertas de las mismas especies al día siguiente (Figura 2). Se puede destacar la mayor presencia relativa entre las aves muertas de *Anas crecca*, *Anas clypeata* y *Anas platyrhynchos*, y por el contrario la ausencia de *Oxyura leucocephala* muertas ese día, y en general del bajo número de animales encontrados muertos en todo el brote (<10 ejemplares) a pesar de estar entre las tres especies más abundantes en la laguna en esas fechas.

Como es sabido, los brotes de botulismo se han producido en los meses de más calor, aunque en ocasiones se llegan a producir al principio del otoño,

cuando las temperaturas empiezan a disminuir, como por ejemplo en el último brote de la laguna de Navaseca en 2008. No obstante, se observa que los años en que han aparecido los principales brotes de botulismo se han registrado temperaturas medias elevadas en el mes de julio (Fig. 3).

Desarrollo de la técnica de detección de *Clostridium botulinum* por RT-PCR

La técnica de RT-PCR desarrollada se describe con detalle en SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.* (2008).

Calibrado/límite de detección de la RT-PCR con cepas de referencia: El límite de detección en la RT-PCR ha sido de entre 9 pg y 500 pg en función de la muestra analizada, con tiempos de CT hasta 46,74. Tras realizar la extracción de las cepas de referencia con muestras de sedimento y/o ani-

Familia	Especie	1978	1998	1999	2002	2004	2005	2006	2008	Total
Podicipedidae	<i>Podiceps cristatus</i>			7						7
	<i>Podiceps nigricollis</i>	61	2							63
	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	22		3		1				26
	<i>Podiceps sp</i>							3		3
Ardeidae	<i>Ardea cinerea</i>	2		37		2	1	1		43
	<i>Ardea purpurea</i>			18			1			19
	<i>Ardeola ralloides</i>			3						3
	<i>Bubulcus ibis</i>					8	39	1		48
	<i>Egretta alba</i>			1						1
	<i>Egretta garzetta</i>	14		271		1		1		287
	<i>Ixobrychus minutus</i>			6						6
	<i>Nycticorax nycticorax</i>	2		8		1				11
Ciconiidae	<i>Ciconia ciconia</i>	1		3	1	4	4	9		22
Phoenicopteridae	<i>Phoenicopus ruber</i>				3	2				5
Anatidae	<i>Anas acuta</i>	67							1	68
	<i>Anas clypeata</i>	888	7	347		31			31	1.004
	<i>Anas crecca</i>	637		37		13	107		41	835
	<i>Anas penelope</i>	3								3
	<i>Anas platyrhynchos</i>	933	168	8.127		46	339	478	79	10.170
	<i>Anas querquedula</i>	11								11
	<i>Anas strepera</i>	34		1.361		1	8	5	18	1.427
	<i>Aythya ferina</i>	98	71			2		2		173
	<i>Aythya nyroca</i>	1								1
	<i>Netta rufina</i>	82						3		85
	<i>Oxyura leucocephala</i>	1	5						2	8
	<i>Tadorna tadorna</i>				1			1		2
Accipitridae	<i>Buteo buteo</i>							1		1
	<i>Circus aeruginosus</i>	4						1		5
Phasianidae	<i>Alectoris rufa</i>	1								1
Rallidae	<i>Fulica atra</i>	345	587	750	3	32	35	112	16	1.880
	<i>Gallinula chloropus</i>	2	16	75		2	6		3	104
	<i>Rallus rallus</i>	1		25						26
Recurvirostridae	<i>Himantopus himantopus</i>	307	191	38	11	15	6	16	2	586
	<i>Recurvirostra avossetta</i>	206						13		219
Charadriidae	<i>Charadrius alexandrinus</i>	66								66
	<i>Charadrius dubius</i>	95								95
	<i>Charadrius hiaticula</i>	40							1	41
	<i>Vanellus vanellus</i>	376		7	6	1	1	2		393
Scolopaciae	<i>Actitis hypoleucos</i>	7				1				8
	<i>Calidris alpina</i>	51								51
	<i>Calidris canutus</i>	6								6
	<i>Calidris ferruginea</i>	163								163
	<i>Calidris minuta</i>	296								296
	<i>Gallinago gallinago</i>	75		2		1			6	84
	<i>Limosa limosa</i>	75								75
	<i>Philomachus pugnax</i>	275		19					2	296
	<i>Tringa glareola</i>	2								2
	<i>Tringa nebularia</i>	12				1				13
	<i>Tringa ochropus</i>	4				1			2	7
	<i>Tringa totanus</i>	115								115

Familia	Especie	1978	1998	1999	2002	2004	2005	2006	2008	Total
Glareolidae	<i>Glareola pratincola</i>							1		1
Limícolas ND								1		1
Laridae	<i>Larus michahellis</i>				1					1
	<i>Larus ridibundus</i>	316	343	117	15	4			2	797
	<i>Larus spp</i>							65		65
Sternidae	<i>Chlidonias hybridus</i>	19		18						37
	<i>Chlidonias niger</i>	7								7
	<i>Gelochelidon nilotica</i>	34			1		1			36
	<i>Sterna nilotica</i>							60		60
	<i>Sterna albifrons</i>	1								1
	<i>Sterna hirundo</i>	3								3
Tytonidae	<i>Tyto alba</i>	1								1
Laniidae	<i>Lanius senator</i>	1								1
Passeriformes	<i>Calandrella brachydactyla</i>							4		4
Columbidae	<i>Columba libia</i>							1		1
Total		5.763	1.390	10.980	42	170	548	781	206	19.880

Tabla 4. Recopilación de los datos de mortalidades de aves acuáticas registrados en humedales castellano-manchegos en el periodo 1978-2008.

Tabla 4. Mortality data compiled from the different outbreaks of botulism occurred in wetlands from Castilla-La Mancha in the period 1978-2008.

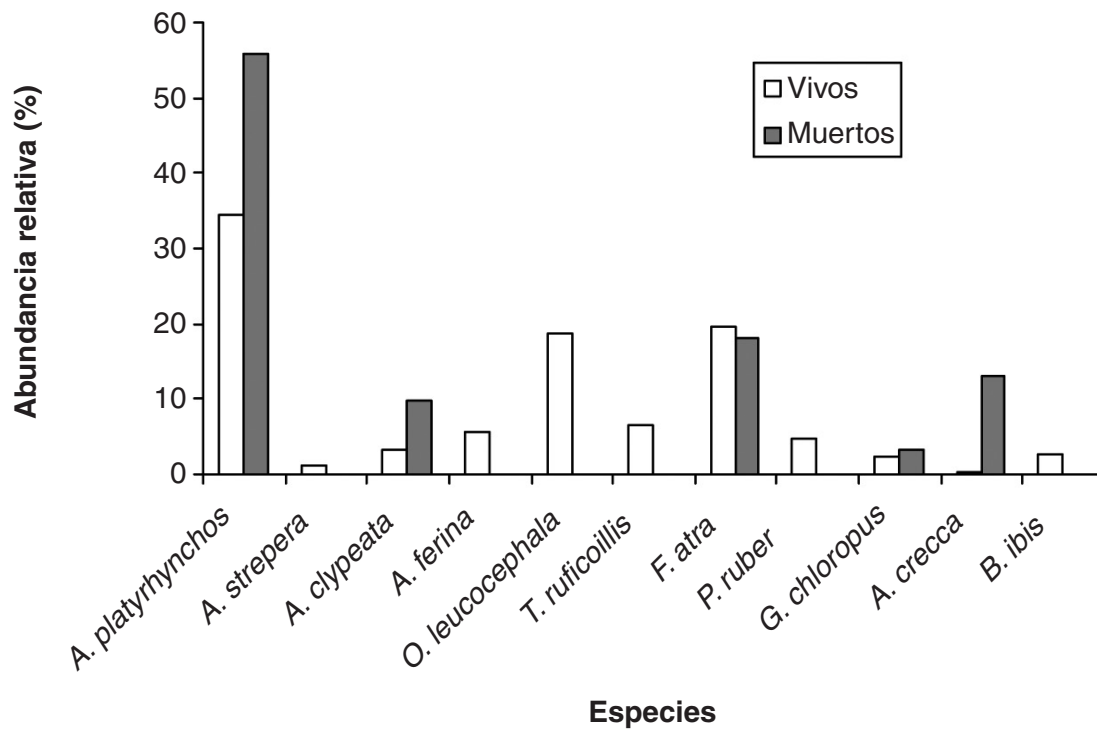


Figura 2. Relación entre la abundancia relativa de diferentes especies de aves acuáticas en las aves censadas vivas y las encontradas muertas durante el brote registrado en la laguna de Navaseca (Daimiel).

Figure 2. Relationship between relative abundance of different wetland species in counted alive and found dead birds during the outbreak recorded in the Navaseca lagoon (Daimiel).

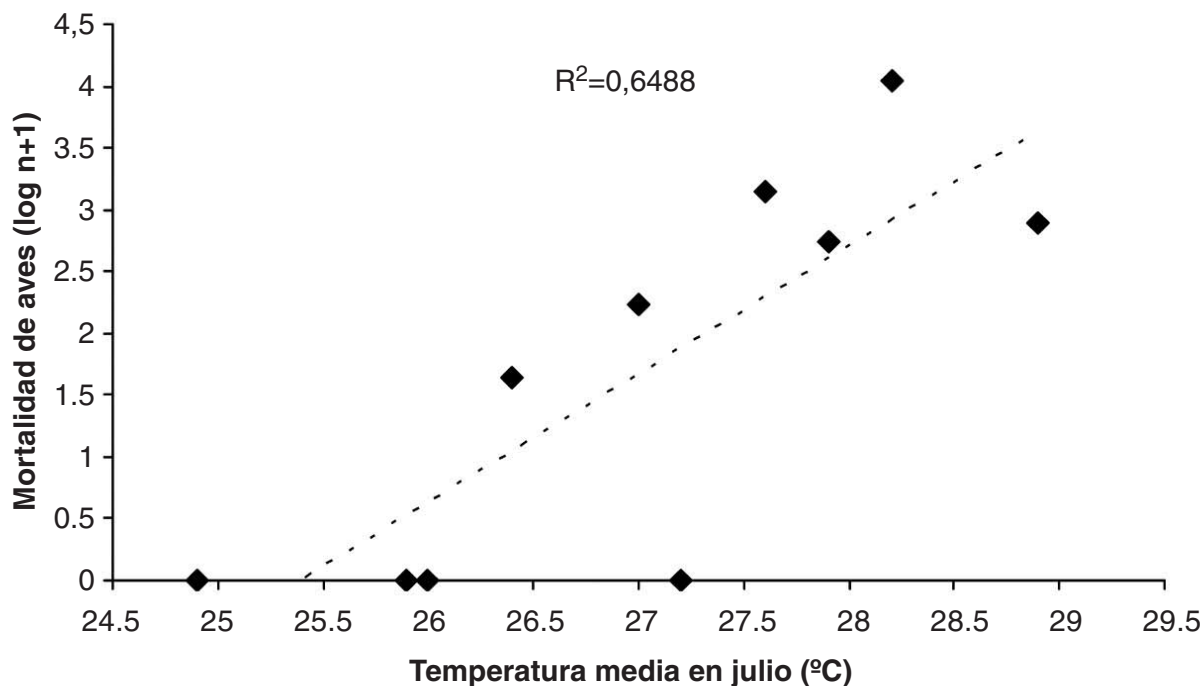


Figura 3. Relación entre la mortalidad de aves en brotes de botulismo y la temperatura media registrada en el mes de julio.

Figure 3. Relationship between the mortality of birds in botulism outbreaks and the average temperature in July.

males, esta RT-PCR bajó su detección entre 1 y 2 factores de dilución. El calibrado mediante conteo en cámara de Petroff dio resultados muy bajos en comparación al calibrado de ADN de referencia, indicando que el recuento puede incluir microorganismos sin el fago.

Comparación entre técnicas de PCR: en sedimentos, ninguno resultó positivo a la PCR convencional y sólo 3/11 positivos a RT lo fueron para la PCR anidada. En muestras de animales, también la técnica de RT-PCR ha obtenido la mejor sensibilidad, aunque cabe destacar que una muestra negativa para RT-PCR fue positiva para la PCR anidada.

Comparación en el procesado de los sedimentos (extracción directa, cultivo sin lavado con SSF y cultivo con lavado): Después de tener la mayoría de los sedimentos muestreados, se procedió a realizar un estudio comparativo en el procesado de los mismos, para determinar cuál de estos procesos era más adecuado. Se seleccionaron un total de 8 sedimentos que habían resultado positivos en una primera fase de análisis, mediante el cultivo

sin lavado con SSF (Tabla 5). Seis de 8 sedimentos habían resultado positivos utilizando la extracción de ADN (dilución 1) y otros 2 sedimentos habían resultado positivos tras una dilución de la extracción 1:10 en agua libre de ADNasas/ARNasas. No se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos de cultivo con y sin lavado con SSF. En cambio, el cultivo aumenta la sensibilidad en la detección comparado con la extracción directa (Tabla 5).

Comparación de la extracción directa versus cultivo previo para muestras de origen animal: La sensibilidad de la extracción directa frente al cultivo previo fue muy baja, con un valor del 36,6%. No obstante, de las 13 muestras inicialmente negativas con cultivo previo, 3 fueron positivas a la extracción directa (Tabla 6). Dichas muestras negativas procedían de animales que habían resultado positivos en otras muestras.

*Aislamiento de *C. botulinum* de las muestras de campo:* Sobre diversas muestras cultivadas en medio líquido que resultaron positivas a RT-PCR

Sedimento ¹	SSF + cultivo		Tratamiento ³ Cultivo		SSF + directo	
	1	1:10	1	1:10	1	1:10
9	+	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-
60	+	+	+	+	-	-
169	+	+	-	-	-	-
95	+	-	+	-	+	-
127	-	-	+	-	-	+
1 ²	-	-	-	-	-	-
2 ²	+	-	+	-	+	-
Total positivos	5/8		4/8		3/8	

Tabla 5. Resultados de la RT-PCR sobre tres tratamientos de los sedimentos. SSF: Solución salina fisiológica.

Table 5. Results of RT-PCR with sediments processed with three different treatments. SSF: Saline solution.

¹Referencia del sedimento positivo (por cultivo).

²Estos sedimentos habían resultado positivos previamente sólo a la dilución 1:10 del extracto de ADN.

³SSF y cultivo: lavado con SSF y cultivo; Cultivo: cultivo sin lavado; SSF y directo: lavado con SSF y extracción directa; positivo: positivo en algún caso en este estudio comparativo. 1:1 RT-PCR sobre ADN tal cual; 1:10 RT-PCR sobre una dilución 1:10 de la extracción tras el tratamiento.

	+ directo/ + cultivo	+ directo/-cultivo
Contenidos gástricos	4/7	2/8
Ciegos	0/8	1/3
Intestinos	5/13	0/2
Larvas necrófagas	2/2	
Total	11/30	3/13

Tabla 6. Comparación de las extracciones directas versus cultivo previo.

Table 6. Comparison between direct extraction and pre-enrichment culture.

se intentó el aislamiento en medio sólido. En tinciones de esporas, tras un mes en caldo a 4 °C, se podían ver las formas esporuladas típicas de *C. botulinum* y a los tres meses, un incremento en el número de esporas libres. No obstante, tras varios intentos de aislamiento de colonias sospechosas en medios sólidos, no pudimos aislar ninguna cepa de campo principalmente por la abundante presencia de diversas bacterias en las muestras, en muchos casos invasivas o por una pérdida de multiplicación del fago que vehicula el gen en los diferentes pases en medio de cultivo líquido y sólido.

Relación entre presencia de *Clostridium botulinum* y las características físico-químicas del sedimento

Prevalencia de C. botulinum toxigénico en sedimentos: La prevalencia total ha sido del 5,8%. Si se se-

para por zonas húmedas, la que ha obtenido mayor prevalencia ha sido Alcázar de San Juan, seguida del pantano de la Vega del Jabalón y de las Tablas de Daimiel, con prevalencias del 10,8%, 9,5% y 6,5%, respectivamente (Tabla 7). Si tenemos en cuenta el muestreo sólo en momentos donde se registra un brote de botulismo, la prevalencia que se obtiene es del 66,8% (3/11 muestras) en el brote de Alcázar en julio de 2008, seguido del 20% (2/10 muestras) para el brote del Jabalón en julio del 2005 y finalmente 7,4% (5/68) para el brote en las Tablas de Daimiel en julio de 2007. Curiosamente, no se obtiene ningún sedimento positivo en el brote registrado en la laguna de Navaseca de Daimiel en septiembre de 2008 sobre un total de 14 sedimentos analizados (Tabla 7). Todas las muestras de sedimento positivas a *C. botulinum* fueron tomadas en verano, y no se detectó la bacteria en ninguna de las muestras tomadas en invierno (N=30).

Año	Tablas	Navaseca	Jabalón	Alcázar	Manjavacas	Pedro	Vicario	Total
2005	1/14	-	2/10	1/24	0/9	0/15	0/8	4/80
2006	0/11	-	0/9	0/1	-	-	0/10	0/31
2007	5/68	-	-	0/1	-	-	-	5/69
2008	-	0/14	0/2	3/11	-	-	-	3/27
Total	6/93	0/14	2/21	4/37	0/9	0/15	0/18	12/207

Tabla 7. Distribución de los sedimentos positivos muestreados por años y por zonas húmedas (sedimentos positivos/total sedimentos muestreados).

Table 7. Distribution of positive sediments by year and wetland (positive sediment/total sediments sampled).

Ninguna de las 8 muestras de agua recolectada en humedales en un brote de botulismo obtiene un resultado positivo. Todos los sedimentos y aguas se analizaron en la RT-PCR con el ADN extraído según el protocolo, y a diluciones de 1:10 y 1:100. Hay que destacar que 5 de los 12 sedimentos positivos lo fueron sólo a una dilución 1:10 de la extracción de ADN. Sólo 2 de los 5 sedimentos positivos a la dilución 1:10 lo fueron también a 1:100.

Características fisicoquímicas del sedimento: Las características fisicoquímicas de los sedimentos analizados no evidencian ningún patrón claro entre la presencia de *Clostridium botulinum* toxi-

génico tipo C en los sedimentos con el pH, humedad, cantidad de materia orgánica, PO_4^- , NO_3^- , NO_2^- . Únicamente cabe destacar que sólo se ha detectado *C. botulinum* tipo C en muestras con unos niveles más bajos de Cl^- , lo que puede indicar la menor presencia de la bacteria en humedales más salinos (Figura 4).

Valorar el uso de la RT-PCR como técnica de diagnóstico de brotes de botulismo en aves acuáticas

Prevalencias animales procedentes de humedales de Castilla-la-Mancha: En total se han analizado 70 animales de humedales de Castilla-la-Mancha

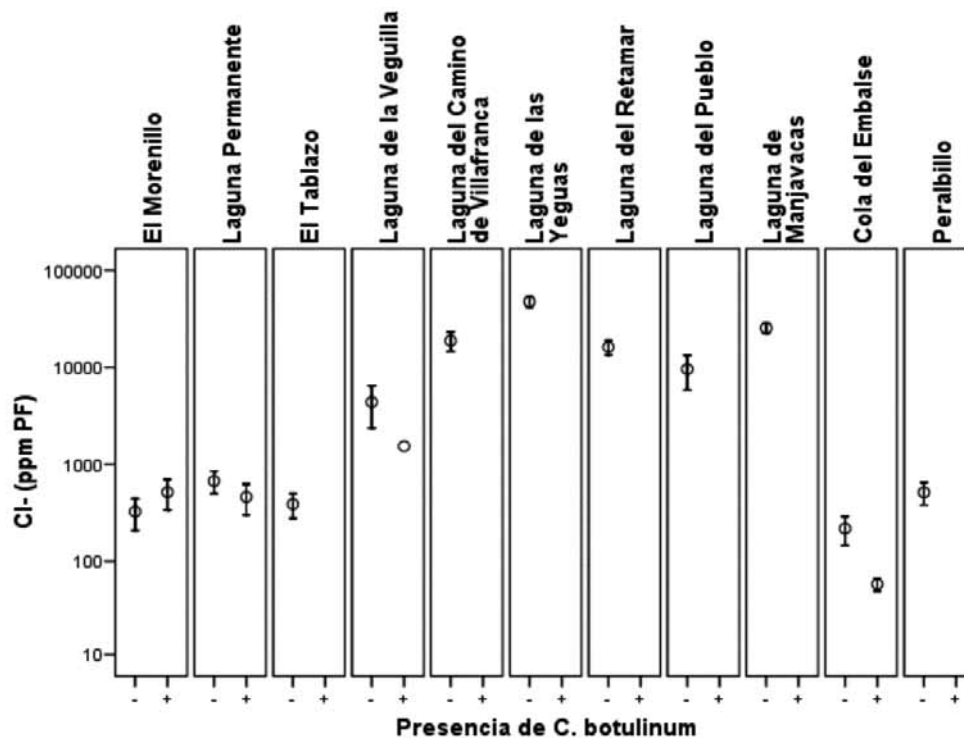


Figura 4. Concentración de Cl^- en sedimentos y relación con la detección de *Clostridium botulinum* tipo C.
 Figure 4. Sediment Cl^- concentration and its relationship with detection of *Clostridium botulinum* type C.

con sospecha de botulismo, con un total de 194 muestras. Ninguna de las 12 muestras de los 6 animales sin sospecha de botulismo ha resultado positiva a la RT-PCR. La prevalencia total por animal ha sido del 41% (29 de 70 aves). La prevalencia en animales por zonas ha sido de 83,3% en el pantano del Jabalón para el brote de julio de 2005, 38,5% en el PN de las Tablas de Daimiel en los dos años analizados, 29,2% en la laguna de Navaseca de Daimiel en el brote de septiembre de 2008 y del 42,3% entre los dos brotes de Alcázar de San Juan.

La prevalencia por muestras analizadas de animales sospechosos de botulismo ha sido del 23,2% (45 muestras positivas de 194 muestras de animales sospechosos). Dada la heterogeneidad del

muestreo, se ha construido una tabla de la distribución de la positividad en los animales que han resultado positivos para alguna de las muestras, para indicar cual es muestra más probable de contener la presencia de *C. botulinum* toxigénico (Tabla 8). El ciego ha resultado la muestra en que se detecta la bacteria con mayor frecuencia con un 72,3% del total analizado, seguido del hisopo cloacal (57,1%) y del intestino (53,8%).

Prevalencia sobre animales controles: Ninguna de las 74 muestras utilizadas como controles ha resultado positiva a la RT-PCR.

Prevalencias por especies analizadas de todas las procedencias (Castilla-La Mancha y Valencia): además de los animales muestreados de los humedales man-

Año	Lugar	Referencia animal	Larvas	Contenido gástrico	Intestino delgado	Ciego	Hisopo cloacal
2005	Jabalón	BOT32		-	-	+	
		BOT33		-	-	+	
		BOT34		+	+		
		BOT35		+	+		
		BOT38		-		+	
		BOT39		-		+	
	Tablas	BOT40		+		-	
2006	Alcázar	A66/07		+	+		
		A117/07		+	-	+	
2007	Tablas	A244/07		-	-	+	
		A235/07		-	-	+	
		A238/07		-	+		
		A237/07		+	-		
2008	Alcázar	A 136/08		+	-		
		A144/08		-	+		
		A145/08		+	-	+	
		A146/08		+	-	-	
		Cig 16		-	+	-	
		Focha 13	+	-	+	+	
		Reidora 6	-	-	+	+	
		Reidora 7	-	+	+		
	Navaseca	Reidora 8	+	-	+	+	
		A08 188		-	-	+	+
		A08 196		+	-	-	-
		A08 201		-	+	+	+
		A08 211		-	-	+	+
		A09 001		-	+	-	-
		A09 003		-	+	+	+
A09 006				-	+	-	

Tabla 8. Distribución del resultado de la RT-PCR sobre las muestras por animal que ha resultado positivo en alguna de las muestras (-: negativo, +: positivo, celda vacía: no analizado).

Table 8. Distribution of the RT-PCR results from samples in the animals where some sample was positive (-: negative, +: positive, empty: not tested).

chegos, se analizaron un total de 35 aves procedentes de brotes de mortalidades de la comunidad valenciana, con sospecha de intoxicación por botulismo o por toxinas de cianobacterias. A pesar de que en muchas especies se disponga de pocos ejemplares, cabe destacar las elevadas prevalencias

(>50%) de las especies con tamaño muestral de más de 10 individuos. Además, más de la mitad de los ejemplares de malvasía cabeciblanca (*O. leucocephala*) han resultado positivos. Si agrupamos las especies por familias, las especies de gaviotas son las que tienen una mayor prevalencia (Tabla 9).

Familias	Especie	Prevalencia (%)	Prevalencia por familia (%)
Anatinae	<i>A platyrhynchos</i>	11/22 (50)	18/41 (43,9)
	<i>A crecca</i>	1/4 (25)	
	<i>A clypeata</i>	1/1 (100)	
	<i>A strepera</i>	0/2 (0)	
	<i>A acuta</i>	0/2 (0)	
	<i>A ferina</i>	2/3 (66,7)	
	<i>A fuligula</i>	1/3 (33,3)	
	<i>N rufina</i>	0/1 (0)	
	<i>T tadorna</i>	0/1 (0)	
	<i>M angustirostris</i>	2/11 (18,2)	
	Oxyurinae	<i>O leucocephala</i>	
Rallidae	<i>G chloropus</i>	0/1 (0)	2/9 (22,2)
	<i>F atra</i>	2/8 (25)	
Ardeidae	<i>B ibis</i>	1/2 (50)	1/2 (50)
Laridae	<i>L ridibundus</i>	10/19 (52,6)	12/26 (70,1)
	<i>L michaellis</i>	1/5 (20)	
	<i>L fuscus</i>	0/1 (0)	
	<i>L audouinii</i>	1/1 (100)	
Charadriidae	<i>R avosetta</i>	2/2 (100)	4/11 (36,4)
	<i>H himantopus</i>	2/8 (25)	
	<i>G gallinago</i>	0/1 (0)	

Tabla 9. Prevalencia de botulismo a RT-PCR por especies muestreadas.

Table 9. Botulism prevalence to RT-PCR by species sampled.

Estudiar la implicación en la epidemiología del botulismo de invertebrados acuáticos e insectos necrófagos en sus diferentes fases del ciclo vital

Sobre el total de 42 *pooles* de invertebrados analizados, la prevalencia ha sido del 26,2%. Si lo agrupamos por tipo de invertebrado, la mayor prevalencia reside en los invertebrados procedentes de los cadáveres, principalmente en las moscas verdes *Lucilia caesar* (Tabla 10). De los 10 animales en los que se ha analizado el contenido digestivo y a su vez larvas de mosca, 6 han sido positivos en contenido digestivo, y 3 de ellos también lo fueron en sus larvas. A pesar de tener una muestra muy baja, cabe resaltar que un animal fue positivo en la muestra de larva necrófaga y negativo en muestras de contenido gástrico y ciego.

DISCUSIÓN

Desde 1978 se han registrado 13 brotes de botulismo en diversos humedales y lagunas manchegas, principalmente en la provincia de Ciudad Real. El número oficial de aves encontradas muertas en todos estos brotes oscila alrededor de 20.000 individuos de más de 50 especies que conviven en estas zonas húmedas, siendo el grupo de las anátidas las más afectadas en valores absolutos (sólo *A. platyrhynchos* alcanza el 50% del total de aves muertas registradas).

Los brotes se han producido en la estación de verano, principalmente en el mes de julio (7 de los 13 brotes, Fig. 1), como ocurre en otras partes del mundo (FRIEND & FRANSON 1999). De entre

Localización	Tipo de invertebrado	Positivos	Positivos por localización
Sedimento	Pooles mixtos en sedimentos (quironómidos principalmente)	2/11	3/16
	Quironómidos de sedimentos	1/5	
Cadáver	Larvas necrófagas de cadáveres	4/10	7/19
	Moscas spp	0/2	
	Moscas verdes	2/3	
	Huevos de mosca	0/3	
	Pupas de mosca	1/1	
Agua	Corixidos (adultos y larvas)	1/2	1/7
	Invertebrados sin identificar	0/5	
Total pooles		11/42	11/42

Tabla 10. Resultados de la RT-PCR sobre diversos tipos de pooles de invertebrados investigados y por localización (sedimento, cadáver y agua).

Tabla 10. Resultados de la RT-PCR sobre diversos tipos de pooles de invertebrados investigados y por localización (sedimento, cadáver y agua).

los factores climatológicos recopilados, sólo hemos observado una correlación entre la aparición de los brotes y las elevadas temperaturas medias de más de 26 °C en el mes de julio. De hecho, la temperatura elevada es un factor importante que incrementa la expansión de los brotes de botulismo, por el hecho de que favorecen la descomposición de los cadáveres afectados donde el bacilo se multiplica en condiciones favorables de anaerobiosis (WOBESER 1997; FRIEND & FRANSON, 1999; ROCKE 2006; SOOS & WOBESER, 2006). Sin embargo, existen brotes de botulismo en otras épocas del año, al final del invierno o principio de la primavera, pero éstos están asociados a episodios ocurridos en el verano anterior (FRIEND & FRANSON 1999). En otras muestras de aves analizadas de la comunidad valenciana, hemos observado un total de 11/35 intestinos positivos a *C. botulinum* toxigénico que fueron muestreados en diversas épocas del año, incluidos algunos individuos de finales de invierno y principio de primavera (9 de los 11 positivos), lo que puede indicar la existencia de brotes o animales portadores fuera de la época estival en estos humedales costeros.

Para detectar *C. botulinum* tipo C toxigénico se ha utilizado una técnica molecular que amplifica una región del gen que codifica para la toxina, diseñando una PCR a tiempo real (RT-PCR) con una sonda específica TAQMAN® (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.* 2008). Dicha RT-PCR se ha validado con dos cepas de referencia (96-SAC de

la Universidad de Wisconsin y CIP 104.983 del Instituto Pasteur). Esta RT-PCR permite analizar un elevado número de muestras y además ha resultado más sensible que otras técnicas de PCR convencionales descritas en la literatura (WILLIAMSON *et al.* 1999; PRÉVOT *et al.* 2007). Otras de las ventajas de una RT-PCR sobre las PCR convencionales es que se permite cuantificar el ADN de la muestra con un calibrado del ADN control. En nuestro caso, sólo ha sido posible mediante la cuantificación de ADN de la cepa de Madison, sin tener certeza de cuántos microorganismos contiene dicho control positivo. El límite de detección ha resultado ser más bajo que lo que se cita en otros trabajos publicados por conteo de microorganismos (WILLIAMSON *et al.* 1999). De todos modos, consideramos arriesgado realizar conteos de bacilos para cuantificar, pues el gen de *C. botulinum* C toxigénico es vehiculado a través de un fago específico, y por lo tanto debería realizarse un conteo de fagos, una técnica muy costosa en tiempo e infraestructura.

La prevalencia *C. botulinum* tipo C toxigénico en 207 muestras de sedimentos ha sido del 5,8% en el total de los sedimentos analizados. Esta baja prevalencia es comparable a la de otras zonas analizadas en España, como es el caso de las marismas del Guadalquivir, zona endémica de botulismo, con una prevalencia del 1,7% en 15 sedimentos analizados (CONTRERAS DE VERA *et al.* 1991) o del 18% en un total de 44 sedimentos analizados de tres zonas de la campiña de Se-

villa y Córdoba (CONTRERAS DE VERA *et al.* 1987). En otros lugares del mundo, se han encontrado elevadas prevalencias en sedimentos, tanto en zonas con elevado riesgo de botulismo como en zonas donde no se producen brotes (SANDLER *et al.* 1993). En nuestro estudio, sólo se ha detectado *C. botulinum* tipo C toxigénico en sedimentos recogidos durante los brotes de botulismo. Esto también ha sido observado por otros autores (ZECHMEISTER *et al.* 2005), aunque en este caso, la existencia de *C. botulinum* tipo C toxigénico existió tanto en zonas con elevado riesgo como en zonas con poco riesgo, pero con una probabilidad mucho menor para estas últimas. Curiosamente, ningún sedimento de la laguna de Navaseca recolectado en el momento de brote, ha resultado positivo. De hecho, la presentación de este episodio se originó justo después de unas fuertes lluvias que sobrepasaron la capacidad de carga de la depuradora que vierte las aguas a esta laguna. Dicho brote ocurrió a finales de septiembre de 2008, una fecha poco usual en los brotes de botulismo registrados en Castilla-La Mancha. De las características físico-químicas de los sedimentos, incluyendo pH, salinidad, presencia de materia orgánica y otros microelementos, hemos observado que los positivos a *C. botulinum* tipo C toxigénico han sido sólo aquellos que han presentado menores concentraciones de cloruros solubles en sedimento (Fig.4). Este déficit en salinidad en muestras ambientales es un factor predisponente en el riesgo de aparición de botulismo (FRIEND & FRANSON 1999).

Hemos detectado la presencia de *C. botulinum* en varios invertebrados, tanto de cadáveres como del entorno (de agua y de sedimentos), recolectados sólo en momentos de brotes de botulismo. Esta positividad se ha detectado sobretodo en *poles* de moscas que ponen huevos en cadáveres (*Lucilia caesar*), así como en sus larvas necrófagas y pupas, todas ellas procedentes de cadáveres. Esto tiene una implicación epidemiológica, pues las formas adultas pueden favorecer la dispersión del bacilo hacia otros cadáveres magnificando el brote. En realidad, es bien conocido el ciclo cadáver en descomposición-larvas necrófagas del cadáver acumulando toxina-ingestión de larvas por otras aves (WOBESER 1997; FRIEND & FRANSON 1999; ROCKE 2006), y de hecho la

mayoría de los estudios de invertebrados se centran en trabajos sobre larvas necrófagas, pero pocas veces se ha citado a la mosca adulta como portadora (bien en su digestivo o simplemente como vector mecánico). Este apartado de transmisión mecánica debiera estudiarse en profundidad mediante estudios experimentales. En un estudio de un brote ocurrido en Checoslovaquia, los autores observan una elevadísima proporción de invertebrados positivos (casi el 100%) recolectados en cadáveres (tanto en larvas necrófagas y pupas) pero no en otros invertebrados recolectados en sedimento o agua a más de 5 metros de distancia de los cadáveres (HÚBALEK & HALOUZKA 1991). En nuestro estudio también lo hemos detectado en invertebrados recolectados en el sedimento (quironómidos) y de aguas (coríxidos), todos ellos recolectados en el brote de Navaseca, donde ninguno de los 14 sedimentos analizados portaba el gen. El pato cuchara y la cerceta común son dos especies altamente afectadas en los brotes de botulismo (ver Fig. 2). Ambas especies se alimentan de coríxidos y otros invertebrados en la superficie y la columna de agua, por lo tanto, pueden intoxicarse adquiriendo esos invertebrados positivos a *C. botulinum* del agua y de los sedimentos en momentos de brote. Por otra parte, alrededor de los cadáveres de aves que flotan en la laguna es frecuente observar la presencia de larvas de mosca en la superficie del agua, por lo que estas especies de anátidas también podrían intoxicarse más frecuentemente por esta causa.

En cuanto a valorar la técnica de RT-PCR como técnica de diagnóstico de botulismo en animales sospechosos, hemos observado una sensibilidad baja, con un valor del 41% del total de 70 animales analizados. Si valoramos esta prevalencia por brotes registrados, las prevalencias por animal fueron de 100% y 56% para los brotes del Jabalón del 2005 y de Alcázar del 2008 (datos no mostrados), pero en cambio, para el brote de Navaseca, donde se analizaron 4 muestras por animal incluyendo el ciego, esta prevalencia no alcanzó el 30%. Sobre el total de muestras analizadas, la prevalencia fue todavía menor, con un valor que no llegó al 25% de 194 muestras analizadas. Si valoramos la positividad por muestras analizadas, la que alcanza mayor sensibilidad ha sido la mues-

tra de ciego, con una probabilidad del 72%. Con ello queremos destacar que la muestra de elección para detectar *C. botulinum* en cadáveres va a ser el ciego. Otra muestra menos invasiva, pero que parece ser válida, es la muestra de hisopo cloacal. Esto debiera estudiarse en profundidad también para animales sospechosos vivos. Si comparamos la técnica del bioensayo, que es la técnica considerada como "gold estándar", que garantiza la intoxicación por botulismo, tampoco alcanza una sensibilidad elevada. En casos clínicos sospechosos de botulismo sólo sale positiva en algunos de los animales con un cuadro clínico muy marcado (U. Höfle, datos no publicados). En datos publicados por el centro de referencia de botulismo del instituto Pasteur, estos valores oscilan entre el 22% y 56% de muestras de aves sospechosas de botulismo, testadas en diversos años (<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/anaer/anaer-rapport2006.pdf>, pp18). Es decir, ninguna de las técnicas va a asegurar al 100% que un animal sospechoso lo sea realmente.

Otro aspecto importante para explicar la presentación de los brotes de botulismo es la presencia de portadores sanos de *C. botulinum* toxigénico, que por cualquier causa de muerte empiecen los brotes de botulismo por el crecimiento del bacilo en condiciones favorables de temperatura y cadáver en putrefacción. De hecho, más de la mitad de patos sanos procedentes de humedales con brotes de botulismo pueden portar el bacilo (REED & ROCKE 1992). Asimismo existen cepas aisladas en muestras de faisanes sanos (HARIHARAN & MITCHELL 1976), e incluso de tilapias (NOL *et al.* 2004). En nuestro caso, hemos analizado un total de 74 animales como posibles portadores sanos o controles, siendo negativo para todos ellos. Esta muestra que hemos utilizado como controles ha sido muy sesgada, pues exceptuando 20 patos del PN de las Tablas de Daimiel muestreados en un año sin brote, el resto han sido muestras procedentes de zonas o momentos con muy baja casuística de botulismo, a pesar de ser especies de riesgo como las gaviotas. Este apartado debe ser estudiado en profundidad, ampliando la muestra de portadores en humedales manchegos donde regularmente se producen brotes, y pudiera realizarse en muestras de hisopos cloacales en patos capturados vivos.

CONCLUSIONES

A pesar de que en el brote de Navaseca en septiembre de 2008 la malvasía cabeciblanca no resultó ser una especie muy afectada por el botulismo, los datos existentes de brotes anteriores indican que se trata de una especie sensible, ya que hay 8 casos registrados de muerte por botulismo entre 1978 y 2008. Por otra parte, en cuatro de las seis malvasías cabeciblancas analizadas de la comunidad valenciana se ha podido detectar la presencia de *C. botulinum*. La experiencia en los centros de recuperación de fauna salvaje también indica que ingresan regularmente algunos ejemplares de esta especie cuando se dan brotes de botulismo. También resulta interesante la detección de *C. botulinum* en quironómidos, ya que son una parte importante de la dieta de la malvasía cabeciblanca (SÁNCHEZ *et al.* 2000).

En base a los datos que tenemos, podemos identificar zonas con mayor presencia de *C. botulinum* en sedimentos (Laguna Permanente, Morenillo, Cola del embalse de la Vega del Jabalón, Laguna de la Veguilla) que deberán ser especialmente monitorizadas en los veranos en que la temperatura media de julio sea elevada (>26 °C). Planteamos la posibilidad de monitorizar la presencia de cadáveres de *C. botulinum* mediante el muestreo activo de adultos de *Lucilia caesar*, ya que se ha visto que pueden ser portadoras de la bacteria y por lo tanto tener un papel importante en la ecología de la enfermedad. La RT-PCR puede ser utilizada como técnica rápida y poco costosa para valorar la existencia de brotes de botulismo a partir de ciegos de las aves muertas. Por último, sugerimos la creación de un protocolo de actuación en mortalidades masivas de aves acuáticas coordinado entre las diferentes administraciones que gestionan los humedales castellano-manchegos. Dada la importancia de la retirada de cadáveres para evitar la amplificación de los brotes por las larvas de mosca acumuladoras de toxina, se debería contemplar la posibilidad de incrementar el personal dedicado a la retirada y eliminación de cadáveres durante la aparición de brotes y dotar a estos trabajadores de equipamiento especializado para llevar a cabo estos trabajos de forma segura y efectiva.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer la colaboración del personal del Parque Nacional de las Tablas de Daimiel y los Agentes de Medio Ambiente de la Junta de Castilla-La Mancha (JCCM), en especial a su director Carlos Ruiz, por la logística en los muestreos de campo, a Elisa Pérez por la ayuda en las necropsias de aves (IREC), a Elena Crespo –veterinaria

del centro de recuperación del Chaparrillo de Ciudad Real (JCCM)– por su ayuda y empeño en el tema del botulismo, a Víctor Díez (JCCM) por la obtención de datos brotes de botulismo antiguos, a la Dra. Marta Cerdà del CReSA por la proporción de muestras como controles negativos, al Dr. Ignacio Badiola –responsable de Microbiología del CReSA– por su ayuda en los cultivos microbiológicos y a Pablo Camarero (IREC).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONTRERAS DE VERA A, LEÓN-VIZCAÍNO L, CARRANZA J, HERMOSO DE MENDOZA M, GARRIDO F. 1987. Botulismo aviar en zonas húmedas de la campiña de Sevilla y Córdoba. *Medicina Veterinaria* 4:173-179.
- CONTRERAS DE VERA A, GARCÍA A, CUBERO MJ, LEÓN-VIZCAÍNO L. 1991. Low prevalence of *C. botulinum* in Spanish wetlands with a tidal regime. *The Veterinary Record* 128:187-188.
- EKLUND MW, POYSKY FT, REED SM, SMITH CA. 1971. Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type C. *Science* 172:480-482.
- FRANCIOSA G, FENICIA L, CALDIANI C, AURELI P. 1996. PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology* 34:882-885.
- FRIEND M, FRANSON JC. 1999. Avian botulism. In: *Field manual of wildlife disease. General procedures and diseases of birds*. USGS National Wildlife Health Center, USA. pp: 271-281.
- GREGORY AR, ELLIS TM, JUBB TF, NICKELS RJ, COUSINS DV. 1996. Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. *Australian Veterinary Journal* 73:55-61.
- HARIHARAN H & MITCHELL WR. 1976. Observations on bacteriophages of *Clostridium botulinum* type C isolates from different sources and the role of certain phages in toxigenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 32:145-158.
- MITCHELL WR & ROSENDAL S. 1987. Type C botulism: the agent, host susceptibility, and predisposing factors,. In: *Avian botulism: an international perspective*. M. W. Eklund and V. R. Dowell, Jr. (ed.),. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. pp: 55-71.
- NOL P, ROCKE TE, GROSS K, YUILL TM. 2004. Prevalence of neurotoxic *Clostridium botulinum* type C in the gastrointestinal tracts of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in the Salton Sea. *Journal of Wildlife Diseases* 40: 414-419.
- PRÉVOT V, TWEPPENNINCKX F, VAN NEROM E, LINDEN A, CONTENT J, KIMPE A. 2007. Optimization of polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* type C and D in bovine samples. *Zoonoses Public Health* 54: 320-327.
- REED TM & ROCKE TE. 1992. The role of avian carcasses in botulism epizootics. *Wildlife Society Bulletin* 20: 175-182.
- ROCKE TE, SMITH SR, NASHOLD SW. 1998. Preliminary evaluation of a simple in vitro test for the diagnosis of type C botulism in wild birds. *Journal of Wildlife Diseases* 34:744-751.
- ROCKE TE. 2006. The global importance of avian botulism. In: *Waterbirds around the world*. GC Boere, Galbraith CA & Stroud DA (eds). Edinburg, UK. The Stationery Office pp: 422-426.
- SANCHEZ MI, GREEN AJ, DOLZ JC. 2000. The diets of the White-headed Duck *Oxyura leucocephala*, Ruddy Duck *O. jamaicensis* and their hybrids from Spain. *Bird Study* 47: 275-284
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ L, CIFUENTES A, JIMÉNEZ B, MATEO R, GONZALEZ R. 2008. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin coding genes: Analysis of PCR products by real time versus capillary gel electrophoresis methods. *European Food Research and Technology* 227: 495-502.

- SANDLER RJ, ROCKE TE, SAMUEL MD, YUILL TM. 1993. Seasonal prevalence of *Clostridium botulinum* type C in sediments of a northern California wetland. *Journal of Wildlife Diseases* 29: 533-9.
- SOOS C & WOBESER G. 2006. Identification of primary substrate in the initiation of avian botulism outbreaks. *Journal of Wildlife Management* 70: 43-53.
- WILLIAMSON JL, ROCKE TE, AIKEN JM. 1999. In situ detection of the *Clostridium botulinum* type C1 toxin gene in wetland sediments with a nested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3240-3243.
- WOBESER G. 1997. Avian botulism - Another perspective. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 181-186.
- ZECHMEISTER TC, KIRSCHNER AK, FUCHSBERGER M, GRUBER SG, SUESS B, ROSENGARTEN R, PITTNER F, MACH RL, HERZIG A, FARNLEITNER AH. 2005. Prevalence of botulinum neurotoxin C1 and its corresponding gene in environmental samples from low and high risk avian botulism areas. *ALTEX* 22: 185-195.

