

BOTULISMO EN AVES ACUATICAS SILVESTRES

Héctor Hidalgo Olate. MV; MSc. - Diego F. Montecino Latorre.



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son uno de los factores que regulan el tamaño de las poblaciones salvajes, sin embargo, las poblaciones de muchas especies de aves silvestres se han reducido de manera tan importante por las actividades humanas que la aparición de una enfermedad puede ser sencillamente el factor aleatorio que las lleve a su desaparición, tanto a nivel local como global.

El botulismo aviar es una enfermedad paralizante y usualmente fatal que se produce cuando las aves ingieren la neurotoxina producida por la bacteria *Clostridium botulinum*. Siete tipos distintos de toxina designadas con las letras A a G han sido identificadas en base a su antigenicidad (Smith, 1978). Los brotes de mortalidad en las aves debido a botulismo son usualmente causados por la toxina tipo C. Las aves acuáticas sufren la mayoría de las pérdidas, pero probablemente todas son susceptibles a la toxina botulínica tipo C con la excepción de los buitres. La neurotoxina afecta los nervios periféricos y resulta en una parálisis de los músculos voluntarios. Las aves usualmente se ahogan o mueren por falla respiratoria.

En algunos humedales de Norte-

américa, más de un millón de individuos muertos debido al botulismo tipo C han sido reportados en brotes localizados. En una base mundial, el botulismo aviar es la enfermedad más importante de las aves migratorias, especialmente en patos, cisnes, gansos (waterfowl), aves costeras (waterfowl), aves costeras, gaviotas y garzas;

debido a la magnitud de las pérdidas, la frecuencia anual de epizootias y el continuo aumento del área geográfica de ocurrencia.

ESPECIES AFECTADAS Y DISTRIBUCION

Muchas especies de aves y algunos mamíferos son afectados por el botulismo tipo C. En la naturaleza, las aves acuáticas sufren las mayores pérdidas, pero probablemente todas las aves son susceptibles a la toxina botulínica tipo C con la excepción de los buitres que son altamente resistentes. El botulismo tipo C ha sido reportado en aves silvestres en todos los continentes excepto en la Antártica. Desde principios del siglo pasado se han documentado brotes de botulismo en Estados Unidos y Canadá que han afectado con mayor frecuencia a patos, cisnes, gansos (waterfowl), aves costeras (shorebirds), gaviotas y garzas. Durante las siguientes décadas los brotes presentaron una importante expansión geográfica, siendo reportados en América Central y Sudamérica, Europa, Sudáfrica, Australia y Japón. La mayoría de estos reportes son recientes, usualmente dentro de los últimos 30 años.

ETIOLOGÍA

El *Clostridium botulinum* es una bacteria anaeróbica estricta, Gram positiva. Los siete serotipos de *C. botulinum* (A, B, C, D, E, F y G) no pueden ser distinguidos en base a sus características morfológicas; sin embargo, las neurotoxinas que producen son serológicamente diferentes. Como otros clostridios, las cepas de *C. botulinum* persisten en la forma de esporas cuando las condiciones ambientales son adversas. Las esporas son resistentes al calor y la sequedad y pueden permanecer viables por años. Las esporas de las cepas de botulismo tipo C están ampliamente distribuidas en los sedimentos de humedales de agua dulce; pueden ser encontradas en los tejidos de la mayoría de los habitantes de los humedales, incluyendo insectos acuáticos, moluscos y crustáceos y



Figura 1. Especies afectadas por Botulismo Aviar en Chile. Fotografías: Juan Tassara y Rocío Pozo.

muchos vertebrados incluyendo aves sanas. El *Clostridium botulinum* es inofensivo en estado de spora y la toxina es producida solamente luego de que germinan, cuando el organismo está activamente creciendo y multiplicándose. La toxina es liberada cuando las bacterias sufren autólisis y no tiene ningún rol conocido en el crecimiento ni en la fisiología de la bacteria y muchos aislados naturales de *C. botulinum* no la producen.

En el caso de las toxinas tipo C y D, a pesar de que la bacteria provee el mecanismo para su producción, el gen que las codifica es, en realidad, llevado por un virus (bacteriófago) que infecta la bacteria. Desafortunadamente, poco se conoce acerca de los factores naturales que controlan la infección por parte del virus y la replicación dentro de la bacteria.

EPIZOOTIOLOGÍA

Los brotes de botulismo aviar son impredecibles, a veces ocurren anualmente en ciertos humedales, pero no así en los adyacentes. Gracias a las investigaciones que se han realizado, se ha hecho más evidente que la epizootiología del botulismo aviar es más compleja de lo que se pensaba y a su vez bastante diversa, dependiendo del número de factores, que incluyen condiciones ambientales locales y los eventos climáticos, así como también la conducta alimenticia de las especies de aves involucradas.

Algunas generalidades existen. El *C. botulinum* requiere un ambiente carente de oxígeno, así como también otras condiciones ambientales adecuadas para la germinación de esporas, replicación celular, y producción de toxina. La temperatura juega un rol importante en la multiplicación, con un crecimiento óptimo entre 25 y 40°C para las cepas tipo C. La mayoría de los brotes de botulismo C en las aves ocurren durante el verano y el otoño, cuando las temperaturas ambientales son altas y las bacterias se están multiplicando, a pesar que en algunos humedales la evidencia sugiere que

la toxina preformada puede persistir de alguna forma durante el invierno y produzca brotes en invierno o primavera. Las condiciones que elevan las temperaturas del sedimento y disminuyen el oxígeno disuelto, incluyendo la presencia de materia orgánica en descomposición y aguas bajas, pueden incrementar el riesgo de brotes de botulismo. Pero el botulismo ha ocurrido en humedales profundos oxigenados lo que sugiere que otras condiciones ambientales pueden ser más críticas.

Además de las condiciones ambientales permisivas, el *C. botulinum* también requiere de una fuente de energía para su crecimiento y multiplicación. Debido a que carece de la habilidad para sintetizar ciertos aminoácidos, la bacteria requiere un sustrato altamente proteico para la replicación. Se ha demostrado que los cuerpos en descomposición de los vertebrados apoyan la producción de toxina por parte del *C. botulinum* tipo C en altos niveles y fácilmente pueden propagar un brote bajo ciertas condiciones. Sin embargo, se ha demostrado que los brotes de botulismo en aves acuáticas han ocurrido en la ausencia de cuerpos de vertebrados y en algunos brotes, los patrones de mortalidad no son consistentes con un cuerpo como fuente de la toxina. Cualquier tipo de materia orgánica en descomposición, restos de insectos, y otras partículas proteicas pueden servir como medio de crecimiento para el *C. botulinum*.

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 la vida acuática, de tal modo se provee de más sustrato para la producción de toxina. La vegetación en descomposición y las aguas residuales no tratadas son otras potenciales fuentes de energía.

Las esporas botulínicas y los virus

que llevan el gen de la toxina son tan prevalentes en los humedales que las aves frecuentan, que no son considerados como un factor limitante en la ocurrencia de brotes en las aves acuáticas. Las esporas pueden ser trasladadas en los tejidos de las aves y pueden ser distribuidos a nuevos ambientes a través de sus heces.

Actualmente, los mecanismos para la compleja asociación entre las condiciones ambientales y el riesgo de botulismo aviar no están claros. Presumiblemente, estas condiciones permiten el crecimiento bacteriano y la producción de toxina, pero para que un brote realmente ocurra los elementos alimenticios tóxicos deben ser encontrados y digeridos por las aves. En algunos casos, la materia orgánica en descomposición podría ser ingerida directamente, pero en otros casos existe un medio de transferencia desde el sustrato a las aves, presumiblemente a través del zooplankton o invertebrados que inadvertidamente consumen la toxina. Los invertebrados no son afectados por ésta, y debido a que se alimentan de la materia descompuesta, pueden actuar efectivamente para concentrar toxina. A pesar que la mayoría de las aves acuáticas no consumirán directamente un cuerpo de un vertebrado, fácilmente ingerirán cualquier gusano que caiga de este. De esta manera, los brotes de botulismo usualmente se perpetúan.

Ciclo cuerpo-larva del botulismo

Las aves acuáticas y otros vertebrados inadvertidamente ingieren esporas botulínicas mientras se alimentan y las transportan por un período de tiempo en sus tejidos. Luego de muertos, el ambiente anaeróbico resultante y la rica fuente de proteínas de los cuerpos es óptimo para la germinación de las esporas, el crecimiento celular vegetativo y la producción de toxina. Los cuerpos en descomposición también generan temperaturas internas altas apropiadas para la producción tóxica, la cual puede ser independiente de la temperatura ambiente,

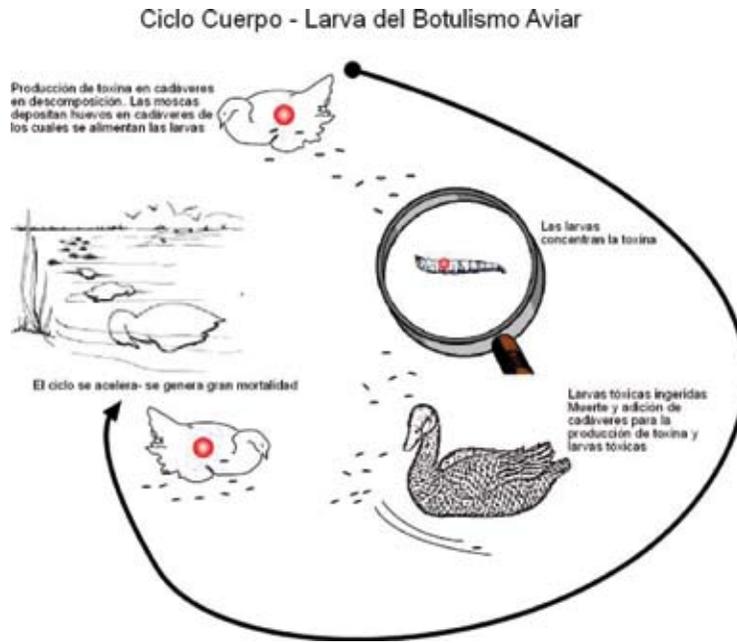


Figura 2. Ciclo Cuerpo-larva del botulismo aviar. Adaptado de: *Avian botulism*. Friend, M.; Franson, J. C. (Eds.). *Field Manual of Wildlife Diseases: General Procedures and Diseases of Birds*. pp. 243.

permitiendo que la producción de toxina continúe durante el clima frío.

SIGNOS CLÍNICOS

Las agrupaciones de cuerpos coincidentes con niveles de aguas en retroceso generalmente caracterizan al botulismo; típicamente es una enfermedad de la orilla del agua y raramente hay aves enfermas o muertas muy alejadas del borde de la vegetación. Las aves sanas, enfermas y las muertas recientemente, comúnmente serán encontradas juntas durante un brote de botulismo, junto con cuerpos en varios estados de descomposición. A menudo, especies que representan dos, tres o incluso más órdenes de aves simultáneamente sufren pérdidas.

La rapidez de aparición y severidad de los signos clínicos es proporcional al monto de toxina ingerida. En general, las aves afectadas muestran signos de debilidad progresiva, paresis y parálisis flácida de los músculos esqueléticos. La inhabilidad para sostener el vuelo es vista temprano en el botulismo. La paresis de las patas resulta en una marcha torpe y eventualmente en la

incapacidad de pararse. En este estado usualmente se propulsan en el agua y en tierra utilizando sus alas como remos. El reflejo al tacto de la membrana



Figura 3. Anseriforme con membrana nictitante visible.

Figura 4. Anseriforme propulsándose con las alas. Adaptado de: *Avian botulism*. Friend, M.; Franson, J. C. (Eds.). *Field Manual of Wildlife Diseases: General Procedures and Diseases of Birds*. pp. 243.

nictitante gradualmente desaparece y las aves debilitadas frecuentemente presentan los párpados cerrados. La enfermedad progresa afectando los músculos del cuello, resultando en la inhabilidad para mantener la cabeza. Estos son los dos signos del botulismo aviar más fáciles de reconocer. Cuando las aves alcanzan este estado, usualmente se ahogan antes de que mueran finalmente por una falla respiratoria. La anorexia y la diarrea verde han sido ocasionalmente reportadas.

En estados tempranos de la enfermedad, incluso con parálisis significativa, las aves se mantienen mentalmente alertas. Las aves postradas expuestas al sol y al calor rápidamente se deshidratan. No hay lesiones generales características o diagnósticas en las aves acuáticas muertas por botulismo tipo C. Usualmente, las aves afectadas mueren por falla respiratoria y/o ahogadas y las lesiones debido a este motivo pueden estar presentes.

PATOGÉNESIS

Los siete tipos de neurotoxina poseen una estructura parecida, y en consecuencia, una acción farmacológica similar. La toxina es inicialmente producida como una cadena proteica simple, inactiva. Luego de la lisis de la bacteria, esta proteína simple es "mordida" por proteasas endógenas o exógenas a la bacteria (las proteasas abundan en el tejido en descomposición). Esta proteína mordida es una molécula de doble cadena, compuesta de una cadena pesada (H) y una liviana (L) unidas por un puente disulfuro. Una vez que la toxina ha sido ingerida y absorbida, llega a su órgano blanco, que son las células nerviosas colinérgicas. La neurotoxina ejerce su efecto paralizante bloqueando la liberación del neurotransmisor acetilcolina. Actúa en el sistema nervioso periférico, incluyendo las uniones neuromusculares colinérgicas, ganglios autonómicos,

sitios postganglionares parasimpáticos y glándulas adrenales. La toxicidad extrema de la neurotoxina botulínica se debe a su alta afinidad a las membranas presinápticas y la inhibición específica y persistente que ejerce en la liberación del neurotransmisor. No cruza la membrana hemato-encefálica y tampoco mata neuronas, pero interrumpe la función más esencial de la sinapsis.

La interferencia de la toxina con la transmisión neuromuscular ocurre en un proceso de tres pasos: la unión específica a los receptores de las células nerviosas, la internalización de la toxina por endocitosis y translocación de la cadena L a través de la membrana endosomal, y la acción enzimática sobre las proteínas blanco en el citosol que interrumpe la habilidad celular para liberar el neurotransmisor.

Anclaje Neuroespecífico

Luego de la absorción, la toxina difunde a través de los líquidos corporales y se une rápida e irreversiblemente a la membrana presináptica de los terminales nerviosos colinérgicos⁰. La evidencia disponible sugiere que la zona de la molécula que contiene el sitio de unión probablemente reside en la región carboxy-terminal de la cadena pesada (H).

Internalización

Las toxinas botulínicas son internalizadas dentro de un endosoma a través de una endocitosis mediada por receptor. Luego de que las toxinas son internalizadas, la región amino terminal de la cadena H se cree que media la translocación de la cadena L a través de la membrana endosomal hacia el citoplasma. El bajo pH ambiental del endosoma puede disparar un cambio conformacional en el dominio de translocación, formando así un canal para la cadena L para entrar al citosol de célula nerviosa.

Acción Intracelular

El paso final en la intoxicación de las células involucra la hidrólisis catalítica de las proteínas en las vesículas que contienen acetilcolina. Las cadenas L de las neurotoxinas botulínicas son endoproteasas zinc dependientes que inactivan las proteínas esenciales involucradas en el acoplamiento y fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática. Esta inactivación previene la liberación del neurotransmisor desde la célula, resultando en parálisis neuromuscular. Existen 3 proteínas sinápticas, las llamadas proteínas SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment protein receptor), que han sido identificadas como blancos de las neurotoxinas botulínicas.

DIAGNÓSTICO

Un diagnóstico presuntivo está basado frecuentemente en una combinación de signos clínicos observados en aves enfermas y la ausencia de lesiones obvias de enfermedad cuando los órganos internos y tejidos de las aves muertas son examinados en la necropsia. Sin embargo, este diagnóstico inicial debe ser confirmado por la Prueba de Protección en

Ratón (Mouse Protection Test) para demostrar la presencia de la toxina botulínica en la sangre.

La Prueba de Protección en Ratón fue descrita por primera vez en 1943 por Quortrup & Sudheimer, y es el método de diagnóstico clásico para el botulismo aviar. Se obtiene muestras de sangre desde las aves enfermas y se centrifuga. La fracción sérica es inoculada en dos grupos de ratones de laboratorio, uno de los cuales ha sido protegido previamente con la antitoxina específica. Los ratones son observados durante los 5 días posteriores a la inoculación para detectar signos de botulismo como parálisis de los miembros posteriores, abdomen contraído (típicamente llamado cintura de avispa figura 4), respiración dificultosa y muerte. La muestra se considera positiva si los ratones no protegidos mueren, o muestran signos de botulismo y los ratones protegidos permanecen sanos. 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. A pesar que la Prueba de Protección en Ratón es la más sensible para todos los tipos de botulismo, los falsos negativos son posibles.

Durante un episodio de mortalidad, cuando se sospecha de botulismo, es importante recolectar sangre de aves moribundas o muertas recientemente, porque la formación de toxina botulínica post-mortem puede ocurrir en los cuerpos de mayor data, haciendo cuestionable la interpretación de los resultados. Aves individuales afectadas por el botulismo pueden tener bajas cantidades de la toxina en su

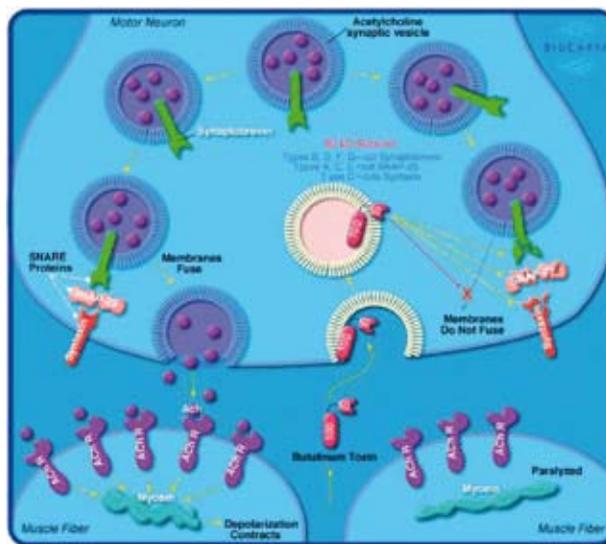


Figura 5. Mecanismo de Acción de las toxinas botulínicas.

sangre, no detectable por los métodos actuales. Por lo tanto, en un brote es recomendable testear varias aves con diferentes grados de morbilidad.

Una prueba de ELISA para la detección de la toxina tipo C ha sido desarrollado recientemente. La prueba ELISA es una prueba in vitro que detecta la toxina tanto biológicamente activa como la inactiva, pero necesita mayor cantidad de muestra para ser sensible.

TRATAMIENTO Y CONTROL

El tratamiento de los patos intoxicados con botulismo es generalmente muy exitoso; las tasas de sobrevivencia van entre 75 – 90%). Las aves medianamente afectadas pueden ser tratadas proveyendo de acceso fácil al agua, comida y sombra. Las aves con signos clínicos más severos, como dificultad para caminar o recostadas completamente, debería dárseles agua oralmente. La inyección con la antitoxina tipo C mejora las tasas de sobrevivencia de los patos con signos clínicos moderados y severos y, si es dada a las aves en los estados iniciales de la enfermedad, pueden prevenir la progresión de la enfermedad. 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 reexpuestas.

El método de manejo más común para los brotes de botulismo tipo C en las aves acuáticas es remover los cuerpos antes del desarrollo de las larvas, en un intento por prevenir la transmisión de toxina a otras aves. Esta es una respuesta lógica, dado que la investigación ha demostrado repetidamente la importancia de los cuerpos en la propagación de los brotes debido a que las larvas pueden desarrollarse en los cuerpos dentro de 3 a 5 días, los humedales deben ser chequeados frecuentemente para reducir la

disponibilidad de larvas para las aves.

SITUACIÓN EN CHILE

En el mes de abril del año 2005, la oficina de Recursos Naturales Renovables del SAG metropolitano, detectó brotes de mortalidad en aves acuáticas con sospechas de botulismo en el humedal Laguna de Batuco y en la planta de Tratamiento de Aguas Servidas La Cadellada, ambos lugares muy relacionados ubicados en la Comuna de Lampa, Región Metropolitana. Ambos eventos, en el transcurso de un mes, causaron la enfermedad en 71 aves acuáticas y provocaron la muerte de aproximadamente 2150 individuos principalmente especies de las familias Anatidae, Laridae, Rallidae, Ardeidae, y Charadriidae. En esa oportunidad, el SAG encargó al Instituto de Salud Pública (ISP) que realizara una prueba diagnóstica confirmativa para



Figura 6. Pato Jergón Grande (Anas georgica) encontrado en La Farfana, abril 2006. Fotografía Juan Aguirre.

el botulismo a partir de muestras de intestino y de fecas de aves silvestres con data de muerte antigua, dando positivo a la toxina botulínica tipo D, la cual no afecta a las aves.

Posteriormente, durante los años 2006 y 2007, nuevos brotes con etiología atribuible a botulismo se desarrollaron en las Plantas de Tratamiento de Aguas La Farfana, Comuna de Pudahuel, y La

Cadellada; y en el humedal Laguna de Batuco, todos lugares pertenecientes a la Región Metropolitana. En estos eventos el SAG basó el reconocimiento de esta enfermedad como causa de mortalidad en diagnósticos presuntivos por los signos clínicos característicos, la histopatología de algunas aves, la ausencia de lesiones a la necropsia y el descarte de otras patologías (Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle). Durante el período 2005 – 2007, el total de aves presuntivamente afectadas por botulismo en los lugares previamente señalados es de 259 aves enfermas y de 3.170 aves muertas, siendo las familias Anatidae, Rallidae y Laridae las más perjudicadas y el Pato Jergón Grande (*Anas georgica*) la especie con mayor número de individuos muertos. Los exámenes clínicos realizados a 64 aves enfermas (principalmente anátidos) revelaron decaimiento progresivo, falta apoyo extremidades posteriores, incapacidad desplazamiento, cuello flácido, baja respuesta a estímulos externos, cloaca sucia, diarrea verdosa de olor pestilente y temperaturas corporales entre 36.7 – 40.7°C. Las necropsias revelaron deshidratación de las aves y la ausencia de lesiones macroscópicas atribuibles a patología específica. La histopatología no reveló lesiones y las pruebas para Influenza Aviar como para la Enfermedad de Newcastle resultaron negativas.

La ONG Aves Chile, encargó al Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile una prueba con ratones (*Mus musculus*) que concluyó que los sueros de 3 taguas comunes, 2 patos jergón grande, un blanquillo y un pato sin identificar, presentaban un elemento termosensible que provocaba la muerte de los roedores que habían sido inoculados por vía intraperitoneal con dichos sueros, con presentación previa de signología neurológica similar a la provocada por una toxina botulínica,

pero que no permitió la identificación específica de la toxina.

Estos resultados nos muestran una similitud clínica y patológica de las aves afectadas en los diferentes focos de mortalidad. Los hallazgos pre y post mortem, son coincidentes con botulismo, sin embargo, no permiten determinar de manera específica la toxina responsable.

A pesar del gran número de aves muertas y de la no realización de pruebas diagnósticas concluyentes en los diferentes brotes, nuestro país aún no cuenta con un método toxicológico objetivo y estandarizado que permita confirmar o descartar definitivamente si la toxina botulínica tipo C es la causa de los brotes de mortalidad, que se han presentado y se seguirán presentando en el futuro, en las aves de ambientes acuáticos.

CONCLUSIONES

Es necesario continuar con la investigación de esta enfermedad a nivel mundial para poder comprender mejor su epizootiología, de manera que sea factible tomar medidas preventivas y así poder disminuir la gran mortalidad de avifauna que genera esta intoxicación año tras año, tanto a nivel mundial como nacional.

El botulismo aviar es una enfermedad emergente en el país que se ha producido debido a alteraciones humanas en el hábitat de las aves acuáticas que son las más susceptibles a esta intoxicación. En el humedal de Batuco es donde ha generado un mayor impacto, lo cual podría llevar a la extinción local de algunas especies

en peligro descritas en este lugar.

Es importante poder contar con una prueba diagnóstica definitiva, para poder determinar fehacientemente esta enfermedad como etiología de los brotes de mortalidad que ocurren en determinados cuerpos de agua de la Región Metropolitana durante la estación cálida, y poder descartar su rol en los episodios donde se ha responsabilizado a los metales pesados. Por este motivo el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile está trabajando para poder implementar en nuestro país la prueba diagnóstica confirmativa.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la doctora Tonie Roche, al doctor Milton Friend, a Juan Aguirre, a Rocío Pozo y a Juan Tassara, por facilitar las imágenes que aparecen en este artículo.

Agradecemos la gran voluntad del personal de Recursos Naturales Renovables del SAG Metropolitano, que nos han apoyado en la obtención de datos y muestras, particularmente a Loreto Alvarez y Jorge Juri.

REFERENCIAS

- Matveev, K.I.; Konstantinova, N.D. 1974. The role played by migrating birds in the distribution of the botulism agent. *Hygiene and Sanitation* 12: 91-92.

- Reed, T.; Roche, T. E. 1992. The role of avian carcasses in botulism epizootics. *The Wildlife Society*

Bulletin 20:175-182.

- Roche, T.E.; Brand, C.J. 1994. Use of sentinel mallards for epizootiologic studies of avian botulism. *Journal of Wildlife Diseases* 30: 514-522.

- Roche, T.E.; Smith, S.R.; Nashlod, S.N. 1998. A preliminary evaluation of an in vitro test for the diagnosis of botulism in waterfowl. *Journal of Wildlife Diseases* 34: 744-751.

- Roche, 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., U.S.A. pp. 217-281.

- Roche, T.E.; Nol, P.; Pelliza, C.; Sturm, K. 2004. Type C botulism in pelicans and other fish-eating birds at Salton Sea. *Studies in Avian Biology* 27: 136-140.

- Roche, 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.

- Sandler, R.J.; Roche, T.E.; Samuel, M.D.; Yuill, T.M. 1993. Seasonal prevalence of *Clostridium botulinum* type C in sediments of northern California wetland. *Journal of Wildlife Diseases* 29: 533 – 539.