

Tuberculosis en *Rhea Americana* y *Gallus Sp.* en cautiverio

Jorge, M.C.; Traversa, M.J.; Schettino, D.M.¹; Bernardelli, A.²; Zumárraga, M.³; Cataldi, A.³;
Romero, C.⁴; Grand, H.M.⁴

RESUMEN

La tuberculosis aviar tiene, distribución mundial y afecta a las aves domésticas y silvestres. El agente etiológico es *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. El potencial zoonótico de esta enfermedad ha adquirido relevancia con la pandemia de HIV por ello todas las maniobras que involucren la manipulación de microorganismos viables, deben ser llevadas a cabo con adecuadas medidas de bioseguridad. La fuente primaria de infección es el ambiente contaminado con este agente. La presentación clínica es variable y el método definitivo para confirmar la infección es el aislamiento. El objetivo fue identificar mediante histopatología, bacteriología y biología molecular la etiología de lesiones compatibles con tuberculosis en una raza ornamental de *Gallus sp.* (sedosa del Japón) y *Rhea americana* (ñandú). En la necropsia se observaron granulomas que presentaron centro caseonecrotico no mineralizado con bacilos ácido-alcohol resistentes en la histopatología. Se confirmó la presencia de *M. avium* subsp. *avium* por bacteriología y por PCR en las cepas aisladas. Esto permitió arribar al diagnóstico etiológico combinando técnicas y describir por primera vez en la Argentina un caso de tuberculosis en ñandú.

Palabras clave: (aves), (*Rhea americana*), (sedosa del Japón), (tuberculosis).-

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Pinto 399, (7000) Tandil. Pcia. de Buenos Aires. mcjorge@vet.unicen.edu.ar, ²DILAB-SENASA, Avenida Alexander Fleming 1653, (1640) Martínez. Pcia. de Buenos Aires., ³Instituto de Biotecnología, CICV y A, INTA Castelar. De Los Reseros y De Las Cabañas, CC 25, (1712) Castelar. Pcia. de Buenos Aires, ⁴Zoológico La Máxima, Municipalidad de Olavarría, Avenida Pellegrini 4200, (7400) Olavarría. Pcia. de Buenos Aires.

Recibido: junio 2006 - Aceptado: diciembre 2006 - Versión on line: diciembre 2007

Tuberculosis in ratites and ornamental birds

ABSTRACT

Avian tuberculosis is worldwide distributed and affects domestic and wild birds. Aetiological agent is *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Its zoonotic potential has acquired importance since HIV pandemia, that is why the manipulation of viable microorganism should be done with careful biosecurity measures. Primary source of infection is the environment contaminated with these microbes. Clinical signs are not uniform and the confirmation of the disease is by bacteriological isolation. The purpose was to identify by histopathological, bacteriological and molecular biology methods the aetiology from tuberculosis like lesions found in an ornamental race of *Gallus* sp. (Japanese Silkie) and *Rhea americana*. At post-mortem examination granulomas were observed which presented in the histopathology caseonecrotized center with acid-fast bacilli. *M. avium* subsp. *avium* was confirmed by bacteriology and PCR in cultured strains. These allowed to arrive to the aetiological diagnosis by the combination of methods and describe for the first time in Argentina tuberculosis in ratites.

Key words: birds, Japanese Silkie, *Rhea americana*, tuberculosis

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis aviar es una enfermedad importante de las aves de compañía, en cautiverio, exóticas y silvestres del mundo¹⁷. El agente etiológico es el *Mycobacterium avium* subsp. *avium*^{9,11} y a partir de 1990 se identificó a *M. genavense* como agente causal de la tuberculosis en esta Clase con signos clínicos y lesiones histopatológicas iguales a las producidas por el complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium scrofulaceum* (MAIS). También son aislados ocasionalmente de lesiones tuberculosas en las aves *M. fortuitum*, *M. tuberculosis* y *M. bovis*¹⁷. Estos microorganismos además de causar tuberculosis en aves de corral también infectan un amplio rango de especies como la porcina, bovina; cérvidos, caprinos, equinos, carnívoros y animales silvestres^{1, 11, 13, 17, 19}. En bovinos se observan infecciones localizadas que inducen sensibilidad a la tuberculina bovina¹¹. Múltiples factores que incluyen la edad, condiciones

de estrés, estado inmune y enfermedades preexistentes determinan la susceptibilidad a las micobacterias. Con respecto al sexo es más común en las hembras que en los machos, de acuerdo a un estudio experimental en pavos y a reportes en psitácidas y paserinos^{9,17}.

El potencial zoonótico de *M. avium* subsp. *avium* ha adquirido relevancia con la pandemia de SIDA y los pacientes inmunodeprimidos por HIV y otras causas comenzaron a presentar enfermedad progresiva, diseminada y refractaria al tratamiento^{11,17,19}.

La tuberculosis puede ser introducida en países libres con la importación de aves ornamentales o de zoológico infectadas siendo la fuente primaria de infección el ambiente con alta contaminación⁹. Las heces de aves infectadas diseminan al agente, el cual puede permanecer viable por años en el ambiente. Por lo tanto un área infectada es una fuente de infección para generaciones sucesivas, especialmente si los suelos son ricos en materia orgánica, ácidos, pantanosos e inundables¹⁷.

La transmisión horizontal es importante cuando diferentes especies susceptibles comparten el mismo hábitat y las costumbres alimentarias de ciertas aves pueden aumentar la posibilidad de exposición a las micobacterias patógenas, mientras que la dieta per se no ejercería tal efecto; siendo mayor la morbilidad en las aves que excavan^{9,17}. Las moscas domésticas son capaces de transmitir el agente a humanos y animales¹². La transmisión vertical es por la contaminación fecal del huevo y se sospecha que también puede ocurrir antes de la oviposición⁹.

La tuberculosis aviar causa signos clínicos inespecíficos, la forma clásica es de una enfermedad devastante con animales emaciados, letárgicos y débiles que mueren luego de varios meses de evolución y en condiciones de manejo intensivo pueden ocurrir muertes súbitas. La lesión primaria se observa en los intestinos con gran cantidad de micobacterias que se liberan al lumen para luego ser eliminadas por las heces. La musculatura está reducida con pérdida de grasa subcutánea y cavitaria y es común la diarrea crónica o intermitente, otros signos observados son plumaje erizado y palidez de la cresta y de los barbillones^{17,19}.

El agente causal generalmente no se identifica en aves mascota, esto se debe a que los hallazgos posmortem son inespecíficos o a la presencia de micobacterias no cultivables. Las lesiones macroscópicas observadas con mayor frecuencia son tubérculos diseminados en hígado, bazo e intestinos¹⁷. Las lesiones histopatológicas principales son proliferación de células epitelioides con micobacterias en su interior y células inflamatorias asociadas⁸.

El aislamiento por cultivo es el método definitivo para confirmar la infección¹⁹. La tuberculinización se ha empleado con éxito en Gallus, pero no es confiable cuando se aplica a otras especies de aves, se utiliza para determinar

la prevalencia en explotaciones avícolas o detectar aves infectadas^{11,19}. Mediante la técnica de PCR es posible la detección de secuencias de ADN IS1245 de *M. avium subsp. avium* con alta sensibilidad y especificidad⁶.

La mayoría de los reportes de tuberculosis aviar involucra a mascotas, colecciones de aves, granjas de ñandúes y crianza de pollos de traspatio, debido a que en las explotaciones comerciales se aplican exitosamente medidas de control y la presentación de la enfermedad es rara^{9,17,19}.

Los ratites son aves sin quilla que no pueden volar e incluyen al avestruz (*Struthio camelus*), emú (*Dromaius novaehollandiae*) y ñandú (*Rhea americana*) y la tuberculosis en ratites se ha registrado en el mundo en pocas ocasiones. En la actualidad la cría ha ganado popularidad en EEUU y Canadá^{13,15}. En Argentina hay 10.000 ejemplares y el 90% de la producción se destina al comercio local por las ventajas de la producción de carne, cueros, aceite y subproductos y por revalorizar lo autóctono.

Los primeros aislamientos en ñandúes se reportaron en Italia y Canadá en 1991 y 1994 respectivamente^{13,15} y en 1999 se describió el primer caso de micobacteriosis en un avestruz en Australia⁴, mientras que en Argentina no hay registros de la enfermedad en ñandúes.

La vía de transmisión fecal-oral está más acentuada en los ratites por su conducta de comer suelo y el signo clínico más destacado es la pérdida de peso⁴. En el diagnóstico inmunológico de estas especies se presentan dificultades porque son aves primitivas con anticuerpos estructuralmente diferentes a los de otras aves¹⁷. Dentro de la Clase Aves, Gallus es más resistente a *M. avium subsp. avium* que otros géneros y a su vez dentro del género hay distinto grado de susceptibilidad según la especie¹⁸.

Este estudio se realizó en dos especies en cautiverio, *Gallus sp.* (sedosa del Japón), raza utilizada con fines ornamentales y *Rhea americana* (ñandú), con lesiones compatibles con tuberculosis aviar, con el objetivo de determinar la etiología mediante técnicas histopatológicas, bacteriológicas y de biología molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron muestras de una sedosa del Japón hembra de dos años y de un ñandú hembra de tres años, provenientes del zoológico “La Máxima” de la ciudad de Olavarría. Las aves fueron halladas muertas, se les realizó la necropsia y en ambos casos se observaron lesiones granulomatosas compatibles con tuberculosis aviar en los órganos viscerales. El ñandú hembra presentó decaimiento una semana previa a la muerte e importante pérdida de masa muscular.

En los laboratorios de la FCV-UNCPBA se procesaron las muestras de hígado y estómago glandular de la sedosa del Japón, e hígado y bazo del ñandú. Las muestras fijadas en formol al 10% se procesaron utilizando la técnica de parafina estándar y las secciones fueron teñidas con las técnicas de hematoxilina eosina (HE) y Ziehl-Neelsen (ZN).

En el laboratorio de micobacterias del DILAB-SENASA a las muestras refrigeradas se les realizó la coloración de ZN y cultivo en los medios de Löwenstein Jensen, Stonebrink, Herrold (con y sin micobactina), Watson-Reid, Middlebrook 7H 10 con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa) y el equipo MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) Becton Dickinson, de ambos animales. Los aislamientos fueron tipificados mediante la realización de pruebas bioquímicas que determinan el crecimiento en presencia de: hidroxilamina, ácido

para-nitrobenzoico, cloruro de sodio al 5%, ácido pícrico e isoniácida; la actividad enzimática frente a catalasa, arilsulfatasa, ureasa, pirazinamidasas, β -galactosidasa y nitrato reductasa y otras pruebas como hidrólisis del Tween, toma de hierro y reducción de telurito¹⁰.

A las cepas aisladas mediante la técnica de PCR se investigó la presencia de las siguientes secuencias de ADN: *hsp 65*¹⁶ gen que codifica para la proteína del estrés térmico presente en todas las micobacterias (440pb), IS6110⁷ presente en las micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (245pb), IS900² presente en *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (195 pb) y IS1245⁶ presente en *Mycobacterium avium subsp. avium* (427 pb). Las PCR fueron realizadas en el Instituto de Biotecnología del CICV y A INTA Castelar, según las condiciones indicadas en la bibliografía citada.

RESULTADOS

Se observaron granulomas en hígado, bazo y estómago glandular. Los frotis directos coloreados con la tinción de ZN revelaron acúmulos de bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR).

En los cortes histopatológicos se demostró que los granulomas presentaban centro caseonecrotico no mineralizado y BAAR libres y dentro de células inflamatorias, gigantes y macrófagos. (Figuras 1 y 2).

Se obtuvieron cultivos positivos a la coloración de ZN, en todos los medios empleados en el caso de la sedosa del Japón y en el ñandú en todos los medios a excepción de Stonebrink. Las cepas aisladas presentaron crecimiento lento a 25°C, 37°C y 45°C, fueron no cromógenas y las pruebas bioquímicas permitieron tipificarlas como *M. avium subsp. avium* (Tabla 1).

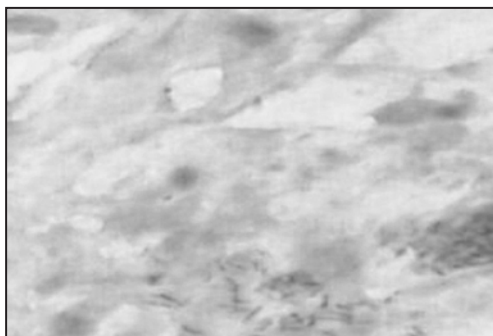


Figura 1. Coloración de Ziehl Neelsen corte histológico. Referencias: Estómago glandular de sedosa del Japón

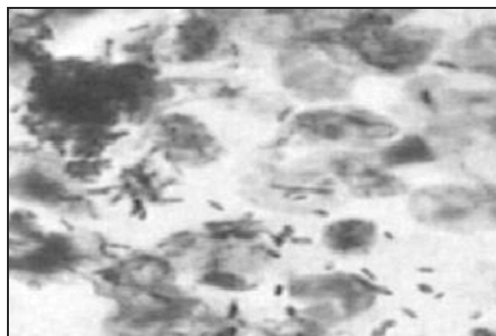


Figura 2. Coloración de Ziehl Neelsen corte histológico. Referencias: Hígado de ñandú

Tabla I. Resultados de las pruebas bioquímicas.

DESARROLLO EN PRESENCIA DE	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	OTRAS PRUEBAS
Hidroxilamina 500 µg/ml -	Catalasa semicuantitativa -	Producción de niacina -
Ácido tiofenocarboxílico + 2 µg/ml	Arilsulfatasa -	Reducción del telurito + en 9 días
Ácido paranitrobenzoico + 0,5 mg/ml	Ureasa -	Toma del hierro -
Cloruro de sodio 5% -	Pirazinamidasa -	Hidrólisis del Tween a - los 5 y 10 días
Ácido pícrico 0,2% -	β-galactosidasa -	
Hidroxilamina 500 µg/ml -	Catalasa a T° ambiente y a 68 ^a -	
Isoniacida 10 µg/ml -	Reducción de nitrato -	

En los aislamientos de la sedosa del Japón y del ñandú fueron detectadas secuencias de ADN correspondientes a *hsp65* presentes en todas las micobacterias y a la secuencia de inserción IS1245 característica de *M. avium* mientras que no se detectaron las secuencias de inserción IS900 ni IS6110 (Figura 3).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se identificó a *M. avium subsp. avium* como agente causal de tuberculosis aviar en dos especies de aves en cautiverio de un parque zoológico que presentaron signos clínicos y lesiones compatibles con la enfermedad,

estos hallazgos ya fueron descriptos en esos ecosistemas por otros autores ^{9, 15, 17}.

En el hábitat del zoológico estudiado se mantienen buenas condiciones nutricionales e higiénicas, pero están presentes factores predisponentes ambientales, como la convivencia de varias especies aviares, el empleo de los mismos lugares a lo largo del tiempo y al ser el agente un patógeno ambiental ubicuo es difícil de controlar. Las aves afectadas eran adultas y hembras estos factores del hospedador predisponen a la presentación de la tuberculosis aviar y coinciden con lo descrito por Tell cuando se refiere a la distribución de la enfermedad según el hábitat, el sexo y la edad.

En parques zoológicos y reservas naturales este agente es difícil de eliminar porque conviven diferentes especies de animales pudiendo causar pérdidas de especies protegidas o en peligro de extinción ^{14,17}. Para el control se deben cubrir con cal las instalaciones porque al aumentar el pH se crea un medio adverso para las micobacterias y como no existe un tratamiento efectivo para los animales enfermos y sus reservorios, que abarcan una amplia gama de especies domésticas y silvestres, se debe evitar la superpoblación y los factores desencadenantes de estrés.

Los parques zoológicos son lugares de riesgo para la salud pública porque el acceso al público es libre¹⁴, puede haber animales asintomáticos que eliminan micobacterias e infectar principalmente a los pacientes inmunocomprometidos. Si bien las personas inmunocompetentes son bastante resistentes a la infección por este agente y que los aislamientos reportados en el hombre son de distinto serotipo que los aislados de las aves de corral, todas las maniobras que involucren la manipulación de microorganismos viables, deben ser llevadas a cabo con adecuadas medidas de bioseguridad ^{5,11}.

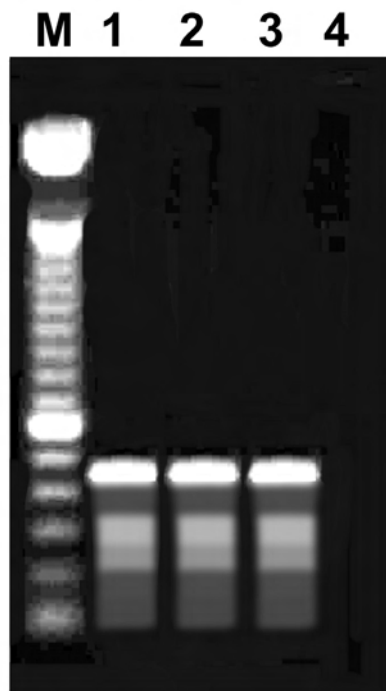


Figura 3: Resultados de la amplificación de IS1245. Referencias: calle M, marcador de peso molecular (100pb), calles 1 y 2 muestras 1 y 2, calles 3 y 4 controles positivo y negativo respectivamente.

La tuberculosis aviar en *Gallus sp.* actualmente no se observa en explotaciones de tipo industrial, se la encuentra en aves criadas para consumo familiar que se mantienen por mucho tiempo vivas en los establecimientos de campo y en las ciudades en la cría de traspatio. *M. avium* se transmite por la ingestión de comida o agua contaminada por las heces de las aves que lo diseminan. En todos los casos los animales con tuberculosis deben eliminarse. En el caso en estudio se trataba de un ave ornamental no destinado al consumo, pero no debe desestimarse la transmisión al hombre.

Con respecto a la salud animal *M. avium* subsp. *avium* puede producir en el bovino y en otras especies lesiones micro y macroscópicas indistinguibles de las causadas por *M. bovis* y reacciones paraespecíficas al derivado proteico purificado (DPP) de tuberculina bovina ³.

Como la presentación clínica de la enfermedad es variable y las pruebas de diagnóstico no están ampliamente difundidas creemos que el aporte de nuestro trabajo es haber arribado al diagnóstico etiológico en *Rhea americana* y *Gallus sp.* combinando técnicas histopatológicas, bacteriológicas y de biología molecular.

También es relevante la primera descripción en la Argentina de tuberculosis en ñandúes, dado que esta especie al ser parte de la fauna autóctona es posible que actúe como reservorio y deseminador de *M. avium* para las otras especies de aves de la región.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barry, M.; Taylor, J.; Woods, J.P. Disseminated *Mycobacterium avium* infection in a cat. *Can Vet J* 2002; 43(5):369-71
2. Collins, D.; Stephens; De Lisle, G. Comparison of polimerasa chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet Microbiol* 1993; 36(3-4): 289-99
3. De Lisle, G.W.; Yates, G.F.; Joyce, M.A.; Cavaignac, S.M.; Hynes, T.J.; Collins, D.M. Case report and DNA characterization of *Mycobacterium avium* isolates from multiple animals with lesions in a beef cattle herd. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10(3): 283-4
4. Doneley, R.J.T.; Gibson, J.A.; Thorne, D.; Cousins, D.V. *Mycobacterial* infection in an ostrich. *Aust Vet J* 1999; 77(6): 368-70
5. Gaskin, J.M.; Wilson, H.R.; Mather, F.B.; Jakob, J.P.; Garcia, J.C. Enfermedades transmisibles a los humanos. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu/AN099> (22 de febrero de 2006)
6. Guerrero, C.; Bernasconi, C.; Burki, D.; Bodmer, T.; Telenti, A. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol* 1995; 33(2): 304-7
7. Hermans, P.W.; Van Soolingen, D.; Dale, J.W.; Schuitema, A.R.; McAdam, R.A.; Catty, D.; Van Embden, J.D. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28(9): 2051-8
8. Hoop, R.K.; Bröttger, E.C.; Pfyffer, G.E. Etiological agents of *Mycobacteriosis* in pet birds between 1986 and 1995. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (4): 991-2
9. Kearns, K.S. *Mycobacteriosis* aviar. Recent advances in avian infectious diseases. Disponible en: <http://www.ivia.org> A1903.0303.ES (6 de agosto de 2003).
10. Nolte, F.S.; Metchock, B. *Mycobacterium*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA. y cols. (ed) *Manual of clinical microbiology*. Sixth Edition. ASM Press. Washington D.C. USA 1995, pág. 400-437
11. OIE (Organización Internacional de Epizootias) 2004. Tuberculosis aviar. In: *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas)* Capítulo 2.7.8. Quinta Edición, OIE, París, pág. 965-973.
12. Sánchez Arroyo, H. 2003. Housefly, *Musca doméstica* Linnaeus. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu/IN205> (22 de febrero de 2006)
13. Sanford, S.E.; Rehmtulla, A.J.; Josephson, G.K.A. Tuberculosis in farmed rheas (*Rhea americana*). *Avian Disease* 1994; 38(1): 193-6
14. Scott, F. *Mycobacteriosis* in an American Bald Eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *Avian disease* 2003; 48(2):437-41
15. Tacconi, G.; Valente, C. Su di un caso di tubercolosi del ñandú (*Rhea americana*). *Rivista di Zootecnia e Veterinaria* 1981; 9 (4): 234-6

16. Telenti, A.; Marchesi Balz, M.; Bally, F.; Bottger, E.C.; Bodmer, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31(2): 175-8
17. Tell, L.A.; Woods, L.; Cromie, R.L. Micobacteriosis in birds. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2001; 20(1): 180-203
18. Tell, L.A.; Foley, J.; Needham, M.L.; Walker, R.L. Diagnosis of avian mycobacteriosis: comparison of culture, acid-fast stains, and polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium avium* in experimentally inoculated Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Avian disease* 2003; 47(2): 444-52
19. Thorel, M.F.; Huchzermeyer, H.; Weiss, R.; Fontaine, J.J. *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review - *Vet Res* 1997; 28(5): 439-47