

# Estudio de dos casos de micobacteriosis en charatas (*Ortalis canicollis*) mantenidas en cautiverio

Origlia J<sup>1</sup>, Traveria GE<sup>2</sup>, Gioffré A<sup>3</sup>, Gorriti G<sup>4,5,6</sup>, Alvarado Pinedo MF<sup>2</sup>, Piscopo MV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos, Facultad de Ciencias Veterinarias. <sup>2</sup>CEDIVE, Facultad de Ciencias Veterinarias. <sup>3</sup>Instituto de Biotecnología CICVyA INTA-Castelar, CONICET. <sup>4</sup>Jardín Zoológico y Botánico de La Plata. <sup>5</sup>Cátedra de Ecología General, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. <sup>6</sup>Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

[javieroriglia@fcv.unlp.edu.ar](mailto:javieroriglia@fcv.unlp.edu.ar)

**Resumen:** La micobacteriosis es una enfermedad infecciosa crónica, generalmente de presentación sistémica, que afecta a un gran número de especies de vertebrados. En aves mascotas y de zoológico las infecciones producidas principalmente por microorganismos pertenecientes al Complejo *Mycobacterium avium* y de la especie *Mycobacterium genavense* son una causa importante de morbilidad y mortalidad. Describimos dos casos de micobacteriosis en un macho y una hembra de charata (*Ortalis canicollis*) mantenidas en cautiverio en un zoológico de Argentina. En cortes histológicos de hígado, bazo, pulmón e intestino de ambos ejemplares se observaron granulomas los cuales evidenciaron la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes teñidos con Ziehl-Neelsen. A partir de muestras de hígado del ejemplar macho inoculadas en medio de Stonebrink se obtuvieron colonias que fueron caracterizadas como *Mycobacterium avium* subsp. *avium* por medio del análisis de secuencia del gen *ARNr16S*. La micobacteriosis en aves silvestres cautivas no solo reviste importancia como un problema de salud pública, sino que también es una potencial amenaza para especies en peligro de extinción o raras que se encuentran en programas de conservación ex situ. En base a lo conocido por los autores esta sería la primera descripción de infección por *Mycobacterium avium* subsp. *avium* en charatas.

**Palabras clave:** Micobacteriosis aviar, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Ortalis canicollis*, zoológico

## Mycobacteriosis in captive Chaco chachalaca (*Ortalis canicollis*)

**Abstract:** Mycobacteriosis is a chronic infectious disease, usually of systemic presentation, that affects a large number of vertebrate species. In pet and zoo birds, infections mainly caused by microorganisms belonging to the *Mycobacterium avium* Complex and the *Mycobacterium genavense* species are an important cause of morbidity and mortality. We describe two cases of mycobacteriosis in a male and a female of Chaco chachalaca (*Ortalis canicollis*) held in captivity at Argentinian zoo. Histological results of sections of the liver, spleen, lung and intestine of both specimens, reveals granulomas, showing the presence of resistant acid-alcohol bacilli stained with Ziehl-Neelsen. Colonies that were characterized as *Mycobacterium avium* subsp. *avium* were obtained from liver samples of the male specimen inoculated in Stonebrink medium by means of sequence analysis of the *RNA16S* gene. Mycobacteriosis in captive wild birds is not only important as a public health problem that is also a potential threat to endangered or rare species found in ex situ conservation programs. Based on what is known by the authors, this would be the first description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in Chaco chachalaca.

**Key Words:** Avian Mycobacteriosis, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Ortalis canicollis*, zoological

## Introducción

La micobacteriosis es una enfermedad infecciosa crónica, debilitante, generalmente de presentación sistémica que afecta a un gran número de especies de vertebrados (Dahlhausen *et al.*, 2012). En aves mascotas y de zoológico, las infecciones por micobacterias son una causa importante de morbilidad y mortalidad (Tell *et al.*, 2003). Si bien distintas especies de micobacterias pueden estar involucradas como agentes etiológicos de esta enfermedad, los microorganismos pertenecientes al Complejo *Mycobacterium avium* y de la especie *Mycobacterium genavense* son los que más habitualmente se encuentran en aves infectadas (Bougiouklis *et al.*, 2005; Dhama *et al.*, 2011).

En zoológicos y aviarios, la transmisión se produce probablemente por la exposición a las heces que contienen un gran número de micobacterias. Sin embargo, las infecciones también pueden ser adquiridas a través del agua contaminada y el suelo, debido a que estos microorganismos son comunes y persisten en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo. En las aves la vía de ingreso de la bacteria es principalmente por ingestión y con menor frecuencia por vía respiratoria (Lennox, 2007). El contacto directo entre aves y humanos puede contribuir con la transmisión de la enfermedad en ambos sentidos (Hoop, 1997).

La enfermedad se caracteriza por un largo periodo de incubación y el desarrollo de lesiones inflamatorias granulomatosas en diversos órganos (Shivaprasad & Palmieri, 2012) (Thoen, 1995). Los signos clínicos presentes en las aves son variables, y dependen del curso y gravedad de la infección, como así también de los órganos afectados. Las aves pueden presentar pérdida de peso, plumaje deficiente, poliuria, diarrea, distensión abdominal, dificultad respiratoria y claudicación (Lennox, 2007; Shivaprasad & Palmieri, 2012). Debido a la variabilidad de signos clínicos y a que los cambios hematológicos no son característicos, en la mayoría de los casos el diagnóstico ante mortem resulta un desafío (Dahlhausen *et al.*, 2012; Lennox, 2007). De la combinación de los datos aportados por la historia clínica, el examen físico, estudios por imágenes, hematología, serología y otras pruebas auxiliares complementarias se puede arribar a un diagnóstico presuntivo de la enfermedad. La correcta identificación de las micobacterias a través de métodos de diagnóstico microbiológico y molecular permite acceder al diagnóstico etiológico definitivo de la micobacteriosis (Dahlhausen *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo es describir dos casos de micobacteriosis en charatas (*Ortalis canicollis*) mantenidas en cautiverio en un zoológico.

## Presentación del caso

Un ejemplar de macho adulto de charata (*Ortalis canicollis*) y muestras de órganos en formol de una hembra de la misma especie provenientes del Jardín Zoológico y Botánico de la ciudad de La Plata, Argentina, fueron recibidos para su estudio diagnóstico. El macho había ingresado a la colección en el año 2008 proveniente de otro zoológico en el cual, dos meses antes de su traslado, se produjo la muerte de la hembra con la cual compartía su ambiente. Entre mayo y junio de 2009 presentó plumaje erizado, decaimiento, regurgitación, materia fecal de color ocre con semillas y frutas sin digerir, abundantes uratos, dificultad para subir a las perchas, mala condición corporal con un peso de 400 gr, hipotermia y muerte. Previo a su muerte, los análisis coproparasitológicos fueron negativos y el estudio radiológico reveló hepatomegalia. El ejemplar fue tratado con ronidazol 10 mg/kg PO cada 24 h durante 7 días, ácido tióctico 10 mg/kg PO cada 12 h y suplemento multivitamínico. La hembra de 9 años de edad (con 8 años de residencia en el zoológico) en noviembre de 2009 presentó plumaje erizado tres días previos al deceso sin otra sinología evidente. Ambos ejemplares se encontraban alojados en un aviario externo con piso de cemento. La higiene del ambiente se realizaba en forma diaria. La dieta suministrada estaba constituida por mezcla de semillas, balanceado para aves, frutas y verduras, suplementada con conchilla.

La necropsia del macho reveló la presencia de mal estado corporal, estriaciones blancas en músculos pectorales, en hígado con aumento de tamaño y múltiples nódulos de color blanco amarillento

de aproximadamente 2 mm de diámetro en superficie y en profundidad del órgano, coloración general café (Figura 1), en bazo múltiples nódulos de color blanco amarillento en superficie y en profundidad, en pulmón nódulo de 5 mm de diámetro de coloración naranja y contenido caseoso. No se obtuvieron datos de la necropsia de la hembra. En los cortes histológicos de ambos ejemplares de hígado, bazo y pulmón, procesados por la técnica histológica de rutina y coloreados mediante Hematoxilina-Eosina, se observaron múltiples granulomas formados por un área necrótica central rodeada por células gigantes, macrófagos, linfocitos, halterófilos, células plasmáticas y tejido conectivo, con congestión de vasos sanguíneos (Figura 2 y 3). En el intestino también se observaron granulomas a nivel de la serosa y acúmulo de macrófagos de citoplasma espumoso, junto a halterófilos, linfocitos y células plasmáticas involucrando las tunicas mucosas, muscular y serosa. Los cortes teñidos con Ziehl-Neelsen evidenciaron abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes en el macho y escasos en la hembra (Figura 4).



Figura 1. Hígado con coloración café, hepatomegalia y múltiples nódulos de color blanco amarillento de aproximadamente 2 mm de diámetro.

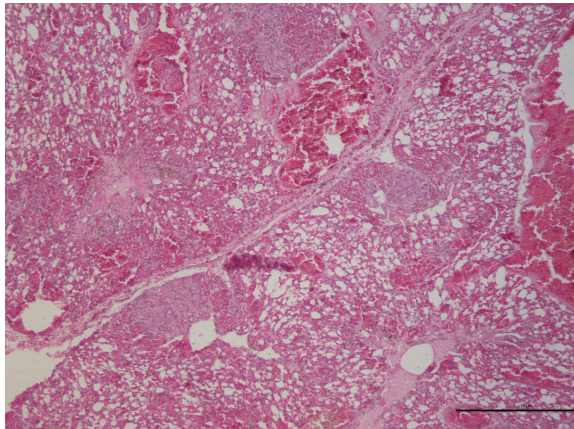


Figura 2. Pulmón con múltiples granulomas y congestión de vasos sanguíneos (H&E).

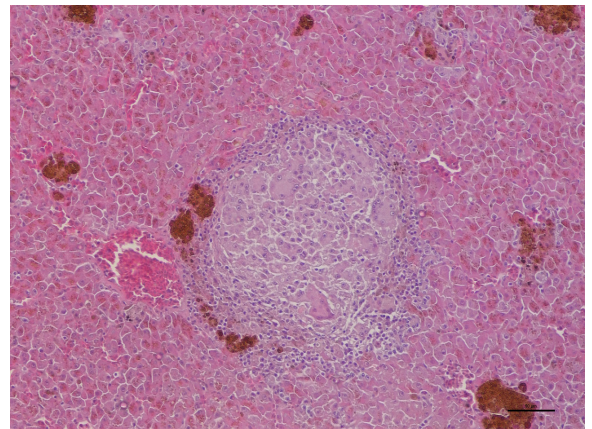


Figura 3. Granuloma en hígado (H&E).

Las muestras de hígado del ejemplar macho se cultivaron en agar Mac Conckey y agar sangre sin obtenerse desarrollo de colonias bacterianas. Para el cultivo de micobacterias se realizó previamente la de contaminación siguiendo el método de Petroff, aproximadamente 0,5 g de hígado se trituraron en mortero con arena y agua destilada estériles, 3 mL de la suspensión se agregaron a 3 mL de una solución de hidróxido de sodio al 4 %, se incubó a 37 °C durante 30 minutos, la muestra se neutralizó con fosfato mono potásico al 14 % conteniendo rojo de fenol como indicador de pH. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos a 2000 xg. Se eliminó el sobrenadante y se inoculó el sedimento en tubos con medio de cultivo de Stonebrink, los que se incubaron durante dos meses a 37 °C (Bernardelli *et al.*, 1990). A los 20 días de inoculación se observó el desarrollo de colonias compatibles con micobacterias. Las colonias se colorearon con el método de Ziehl-Neelsen y se observó la presencia

de bacilos ácido-alcohol resistentes al microscopio óptico. Para la obtención de ADN se realizó la lisis de una alícuota del cultivo en agua mediante 3 ciclos de congelamiento-ebullición, se centrifugó a 10000 xg durante 10 minutos y se empleó una alícuota del sobrenadante como templado de PCR. Se confirmó la presencia de *Mycobacterium* spp. mediante amplificación de la secuencia de *hsp65* (Telenti *et al.*, 1993; Bougiouklis *et al.*, 2005; Dhama *et al.*, 2011). Posteriormente, para identificar la especie se amplificó la secuencia ARNr16S de acuerdo a lo reportado previamente (Kirschner *et al.*, 2003) y se envió el fragmento purificado para su secuenciación a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA. Las secuencias fueron analizadas en las bases de datos *Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms* (<http://www.ridom-rdna.de/>, fecha de acceso agosto de 2012) y *Ribosomal database project* (<https://www.rdp.cme.msu.edu/>), obteniéndose un 100 % de identidad con el gen ARNr16S de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* en ambas bases de datos.

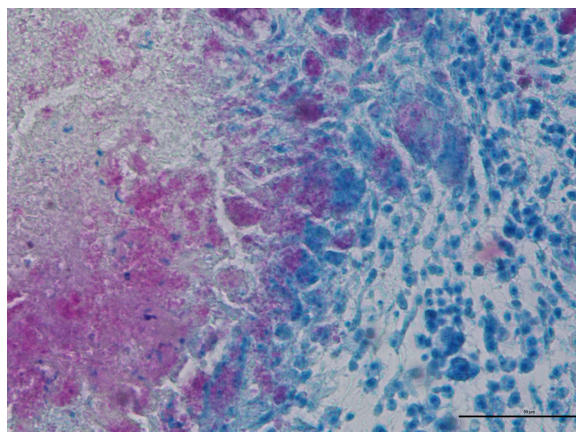


Figura 4. Sección de pulmón en la cual se observa la presencia de abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes (Ziëhl-Neelsen).

Los resultados de los estudios histopatológicos, bacteriológicos y de biología molecular nos permitieron arribar al diagnóstico de micobacteriosis; confirmándose la especie *Mycobacterium avium* subsp. *avium* para el caso del macho.

## Discusión y conclusiones

La micobacteriosis aviar es una de las enfermedades infecciosas más importantes que puede afectar a todo tipo de aves. Distintas especies de micobacterias pueden estar involucradas como agentes etiológicos, pero *Mycobacterium avium* subsp. *avium* y *Mycobacterium genavense* son las más habituales (Bougiouklis *et al.*, 2005; Dhama *et al.*, 2011). El Complejo *Mycobacterium avium* (MAC), que comprende *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *M. intracellulare*, también pueden infectar a diferentes especies de animales como cerdos, vacas, ciervos, ovejas, cabras, caballos, gatos, perros, y especies exóticas, además de causar infección en los seres humanos (Dhama *et al.*, 2011). Al ser necesario un largo periodo de incubación para el desarrollo de la micobacteriosis aviar, los signos clínicos generalmente solo se observan cuando la enfermedad se encuentra en estadios avanzados (Biet *et al.*, 2005) lo que muchas veces impide un diagnóstico temprano de la enfermedad que permita tomar medidas adecuadas para prevenir la propagación del microorganismo. Las aves son los principales agentes de propagación de *M. avium* subsp. *avium* (MAA), debido a que excretan grandes cantidades de bacilos en sus heces que pueden persistir durante largos períodos en el suelo o en el agua (Biet *et al.*, 2005), siendo una fuente potencial de infección para otros animales y seres humanos. En individuos inmunocomprometidos la susceptibilidad a las infecciones por MAA son mayores (Griffith, 2007; Lennox, 2007). Debido a lo anteriormente citado, la micobacteriosis en aves cautivas en zoológicos, zoológicos y centros de rescate o rehabilitación de fauna no solo reviste importancia como un problema de salud pública, sino que también es una potencial amenaza para especies en peligro de extinción o raras que se encuentran en programas de conservación *ex situ*. Teniendo en cuenta las características epidemiológicas de la enfermedad como el largo periodo de incubación, reactivación por fallas inmunológicas de infecciones latentes, diseminación por aves silvestres, entre otras, resultó imposible determinar fehacientemente cual fue la fuente de infección en los casos descritos en nuestro trabajo. Si bien presumimos que el macho podría haber ingresado a la colección infectado (dos meses antes

del ingreso al zoológico, murió su compañera en la institución de origen), no descartamos que ambos hayan adquirido la infección en el zoológico ya que se han detectado otros casos de micobacteriosis en aves y mamíferos con anterioridad en este zoológico (Origlia, datos no publicados).

La micobacteriosis se caracteriza por ser una enfermedad granulomatosa, crónica y generalizada que afecta diferentes órganos. Con mayor frecuencia las lesiones se observan en hígado, bazo, intestino y médula ósea, siendo menos comunes las observadas en pulmón, ovario, oviducto y testículo (Bougiouklis *et al.*, 2005; Palmieri *et al.*, 2013) . En los casos descritos por nosotros, las lesiones observadas coinciden con las clásicas reportadas por la literatura (Shivaprasad & Palmieri, 2012) , encontrando en una de las aves lesiones a nivel pulmonar lo cual no es frecuentemente observado en aves y podría indicar que la vía de ingreso del agente fue respiratoria (Manarolla *et al.*, 2009; Shivaprasad & Palmieri, 2012) . El diagnóstico *ante mortem* de esta enfermedad en las aves resulta dificultoso, si bien los signos clínicos y los estudios complementarios realizados in vivo pueden ser de utilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de la enfermedad, la confirmación definitiva implica la utilización del cultivo bacteriológico, histopatología o técnicas moleculares (Dahlhausen *et al.*, 2012; Shivaprasad & Palmieri, 2012) . Nosotros pudimos utilizar estas técnicas de forma complementaria para arribar al diagnóstico de micobacteriosis producida por MAA. El aislamiento y posterior identificación y caracterización molecular de la bacteria es de importancia ya que puede permitir detectar y diferenciar entre especies de micobacterias, determinar patrones de resistencia a antibióticos y realizar estudios de nexo epidemiológico con otras aves, animales o humanos (Dahlhausen *et al.*, 2012). También nos brinda información de importancia para conocer la situación de la enfermedad dentro del zoológico donde vivían las aves y en base a esto diseñar programas de medicina preventiva y de cuarentena destinados al control de la enfermedad. Si bien la infección por *Mycobacterium avium* subsp. *avium* es relativamente frecuente en aves de zoológico y dentro del orden Galliformes, nosotros no hemos encontrado en la literatura descripciones para *Ortalis canicollis*.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Técnica Erika Badura por la asistencia histológica. Declaración de conflicto de intereses. Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Bernardelli A, Nader AJ, Loureiro J, Michelis H, Debenedetti R. 1990. Micobacteriosis en mamíferos y aves marinas. *Revue Scientifique et Technique*. 9 (4):1121-1129.
- Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*. 36 (3):411-436. doi: 10.1051/vetres:2005001
- Bougiouklis P, Brellou G, Fragkiadaki E, Iordanidis P, Vlemmas I, Georgopoulou I. 2005. Outbreak of avian mycobacteriosis in a flock of two-year-old domestic pigeons (*Columba livia* f. domestica). *Avian Diseases*. 49 (3):442-445. doi:10.1637/7325-011005R.1
- Dahlhausen B, Tovar DS, Saggese MD. 2012. Diagnosis of mycobacterial infections in the exotic pet patient with emphasis on birds. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 15(1):71-83. doi:10.1016/j.cvex.2011.11.003
- Dhama K, Mahendran M, Tiwari R, Shambhu DS, Deepak K, Shoorvir S, Pradeep MS . 2011 Tuberculosis in Birds: Insights into the *Mycobacterium avium* Infections. *Veterinary Medicine International*. 2011:712369. doi:10.4061/2011/712369
- Griffith DE, , Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F , Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF , Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace Jr.RJ, Winthrop K. 2007. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 175:367–416. doi:10.1164/rccm.200604-571ST
- Griffith DE. 2007. Therapy of nontuberculous mycobacterial disease. *Current Opinion Infectious Diseases*. 20 (2):198-203. doi: 10.1097/QCO.0b013e328055d9a2