



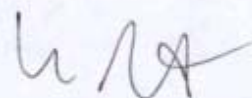
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Patología Animal

Pesquisa de "MEGABACTERIAS" en Aves en Chile

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
grado de LICENCIADO EN
MEDICINA VETERINARIA

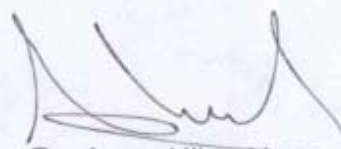
Myriam Jeanette Curillán Cayún
Valdivia Chile 2001

PROFESOR PATROCINANTE:

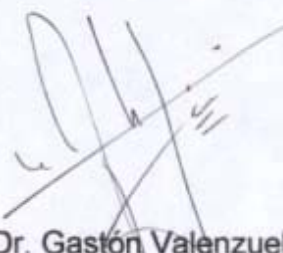


Dr. Josef Kösters

PROFESORES CALIFICADORES



Dr. Jorge Ulloa H.



Dr. Gastón Valenzuela J.

FECHA DE APROBACION: 28 de noviembre del 2001.

A mis padres

INDICE

| | |
|-----------------------|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. INTRODUCCION | 3 |
| 4. MATERIAL Y METODOS | 7 |
| 5. RESULTADOS | 9 |
| 6. DISCUSION | 13 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 16 |
| 8. ANEXO | 18 |

PESQUISA DE "MEGABACTERIAS" EN AVES EN CHILE.

1. RESUMEN

"Megabacterias" son bacilos Gram y PAS positivo, de un ancho aproximado de 1 a 2 μm y una longitud de 20 a 90 μm . Se pueden encontrar en el proventrículo de varias especies aviares, entre otras, periquitos (*Melopsittacus undulatus*) y canarios (*Serinus canaria*). Estudios sobre "Megabacterias" en periquitos llevan a la conclusión de que éstos son gérmenes eucarióticos que pertenecen a los hongos primitivos.

Clínicamente, se relacionan al cuadro de adelgazamiento de los periquitos y canarios. Observándose frecuentemente en estas aves alteraciones anatomopatológicas como inflamaciones catarrales a ulcerativas-hemorrágicas en proventrículos dilatados y cambios degenerativos y ablación de la capa de coilina de la molleja.

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de "Megabacterias" en aves de producción intensiva, de traspatio y ornamentales en Chile, mediante un muestreo de conveniencia, a partir de la observación de 683 muestras teñidas con Gram y PAS. De las muestras examinadas 430 fueron obtenidos de proventrículo y molleja de aves de producción intensiva, 151 de heces de la cloaca de aves de traspatio y 102 de heces frescas de aves ornamentales.

Las muestras obtenidas de proventrículos y estómago muscular de aves de producción intensiva fueron negativas. En muestras de heces de la cloaca se encontraron formas similares a "Megabacterias" en catorce aves de traspatio, las cuales se distribuyeron en patos domésticos (*Anas platyrhynchos*), pavos (*Meleagris gallopavo*), gallinas (*Gallus domesticus*) y descrita por primera vez en gallinetas (*Numida meleagris*). De 102 muestras de heces frescas examinadas se observó este germen en seis muestras. Estas muestras provenían de periquitos mantenidos en jaulas.

Como resultado de la investigación se concluye que "Megabacteria" está presente en aves de traspatio y ornamentales en Chile.

INVESTIGATION OF "MEGABACTERIUM" IN BIRDS IN CHILE.

SUMMARY

"Megabacteria" are a rod-shaped, gram- and PAS-positive microorganisms of about 1 -2 x 20 - 90 μm . They might be found on the mucosa of proventriculus of several bird species, such as budgeridgars (*Melopsittacus undulatus*), cañarles (*Serinus canaria*), and others. Findings on "Megabacteria" originated from budgeridgars lead to the conclusion that they are eucariotic germs which belong to primitive fungus.

Clinically they provoke the so called "going light syndrome" in budgeridgars and canaries. Pathological alterations such as inflammation and hemorrhagic ulcerations of the dilated proventriculus and degenerative changes and ablation of the coilin layer of the gizzard are commonly observed.

The main purpose of this research was to determine the existence of "Megabacterium" in commercial poultry, backyard chicken and ornamental birds from Chile, by means of a convenience sampling and the examination of 683 gram- and PAS-stained samples. From the samples, 430 were obtained as mucosal swabs from proventriculus and gizzard of sacrificed commercial poultry, 151 as cloacal swabs from backyard birds and 102 as freshly deposited feces from ornamental birds.

All samples from proventriculus and gizzard of commercial poultry were negative. In the cloacal swabs from backyard poultry, "Megabacterium" like forms were found in 14 cases, which were distributed among domestic ducks (*Anas platyrhynchos*), turkeys (*Meleagris gallopavo*), hens (*Gallas domesticas*), and for first time in guinea fowl (*Numida meleagris*). From the 102 samples of freshly excreted feces of ornamental birds, the germs were detected in six cases, but only from budgeridgars.

It is concluded that "Megabacterium" is present in backyard and ornamental birds in Chile.

3. INTRODUCCION

A pesar de que el estudio de las "Megabacterias" data de comienzos de los años 80, no se tiene muy claro su rol como patógeno en las diferentes especies aviares, ni su pertenencia al sistema taxonómico. Se pueden encontrar en el proventrículo y heces de diferentes especies aviares. (Schweighardt y col., 1984; Baker, 1992; Huchzermeyer y col., 1993; Christensen y col., 1997; Ravelhofer y col., 1998; Wolf, 2000).

Este microorganismo ha sido descrito en periquitos (Schweighardt y col., 1984; Tuschak y col., 1990; Baker, 1992), canarios (Schweighardt y col., 1984; Van Herck y col., 1984), avestruces (Huchzermeyer y col., 1993), patos domésticos, pato mudo, gansos, pavos y urogallo (Wolf, 2000), codornices japonesas y en numerosas especies del orden Passeriformes y Psittaciformes (Filippich y Parker, 1994).

Recientemente, se reportó la existencia de organismos similares a "Megabacterias" en perros y gatos, situación en la cual el organismo puede ser un invasor oportunista o comensal; sin embargo, esto aún no ha sido comprobado (Cooke, 2000).

Las "Megabacterias" son gérmenes baciliformes de un ancho aproximado de 1 a 2 μm y una longitud de 20 a 90 μm (Schweighardt y col., 1984; Van Herck y col., 1984; Filippich y Parker, 1994; Mutlu y col., 1997).

Estos microorganismos se describen como Gram y PAS positivos (Schweighardt y col., 1984; Van Herck y col., 1984; Scanlan y Graham, 1990). En la tinción de Grocott se comportan como hongos; en Hematoxilina Eosina (HE) se tiñen sólo tenuemente y actúan semejante a cristales (Schweighardt y col., 1984) o muestran una suave basofilia (Scanlan y Graham, 1990). En la coloración con Giemsa las "Megabacterias" se presentan acidófilas (Van Herck y col., 1984), se observan granulos citoplasmáticos y vacuolas en las células de las "Megabacterias" (Scanlan y Graham, 1990).

La multiplicación de "Megabacterias" mediante cultivo es lenta y afectada por la contaminación secundaria (Ravelhofer y col., 1998), esto indica que son microorganismos muy exigentes y posiblemente microaerófilos, por esta razón no es posible obtener un cultivo puro de "Megabacteria" (Ravelhofer y col., 2000).

Mediante microscopía electrónica investigadores llegaron a la opinión de que debía tratarse de bacterias; por consiguiente, éstos gérmenes fueron denominados "Megabacterias" (Van Herck y col., 1984). Sin embargo, se demostró a través de

Técnica Hibridación con fluorescencia in situ (FISH), la presencia de un núcleo rodeado por una membrana nuclear, mediante la inspección de cortes longitudinales de estos organismos, provenientes de la mucosa del estómago glandular de periquitos. Por otra parte, se ha observado estructuras semejantes a un núcleo, con las tinciones de Pappenheim y Giemsa (Ravelhofer y col., 2000). En consecuencia la denominación de "Megabacteria" no es correcta, ya que estudios de estos microorganismos procedentes de periquitos corroboran que éstos son gérmenes eucarióticos que pertenecen a los hongos primitivos. Por lo tanto, se aconseja nombrarlos provisoriamente como "Fungoides proventriculi" (Ravelhofer y col., 2000).

La edad de presentación de la enfermedad en periquitos es entre 1 a 3 años (Tuschak y col., 1990; Filippich y Parker, 1994; Wolf, 2000). La presencia de "Megabacterias" en aves jóvenes se produciría por un traspaso de los padres a los polluelos durante la alimentación (Wolf, 2000). Probablemente el menor número de infecciones en periquitos de mayor edad es consecuencia de una resistencia que van adquiriendo estas aves, por lo que, factores desconocidos pueden influir al curso de una "Megabacteriosis" como: edad de las aves, defensa inmunológica, patogenicidad de las cepas involucradas etc.(Wolf, 2000).

Factores estresantes como crianza y transporte de las aves pueden ayudar a la presentación de una infección por "Megabacterias" (Filippich y Hendrikz, 1998; Conzo y Liberti, 1999).

Aparentemente, las "Megabacterias" existen también en aves clínicamente sanas (Scanlan y Graham, 1990) y en estómagos patológicamente no alterados (Pennycot y col., 1998). Hasta ahora hay opiniones muy divergentes sobre el significado patogénico de "Megabacterias", se las clasifica como patógenos primarios o secundarios (Schweighardt y col., 1984; Baker, 1992, 1997; Conzo y Liberti, 1999), o como posible germen simbiótico de la flora gastrointestinal (Scanlan y Graham, 1990).-

Las investigaciones descritas por Wolf (2000) en periquitos y canarios llevan a la conclusión, de que las "Megabacterias" en estas especies aviares son patógenos primarios. Esta observación coincide con la opinión de Baker (1997) y Conzo y Liberti (1999). Los datos obtenidos por Wolf (2000) no corroboran la sospecha de Scanlan y Graham (1990), con relación a que las "Megabacterias" son posiblemente parte de la flora intestinal fisiológica o simbiótica en periquitos.

Con respecto a los signos clínicos, las investigaciones en periquitos y canarios infectados con "Megabacterias" señalan que en estas aves se produce una disminución del peso en forma progresiva (Jones y Carrol, 1977; Baker, 1985; Filippich y Parker, 1994). Las aves a pesar de su buen apetito, ingieren poco alimento y luego lo dejan caer nuevamente en el comedero (Baker, 1992; Filippich y Parker, 1994). Además, pueden presentar vómitos (Schweighardt y col., 1984) y diarrea (Jones y Carrol, 1977; Baker, 1992; Filippich y Parker, 1994).

En polluelos de avestruz se observa que desde los 10 días hasta 12 semanas se produce una disminución del peso, con un retraso del crecimiento, a pesar de presentar un comportamiento aparentemente normal. Posteriormente, se presenta debilidad, anemia, decoloración de las plumas en la zona de la cloaca y sequedad de las heces (Huchzermeyer y col., 1993).

El curso de la enfermedad se extiende desde semanas a meses (Baker, 1992; Filippich y Parker, 1994), incluso hasta años (Schweighardt y col., 1984). Existen dos formas de presentación de la enfermedad, una forma aguda en la cual la muerte se produce entre las 12 y 24 horas y una forma crónica que se manifiesta en los primeros años de vida (Filippich y Parker, 1994). La enfermedad puede finalizar con la muerte (Baker, 1985), o llevar a una lenta recuperación (Filippich y Parker, 1994).

La mayor parte de las lesiones anatomopatológicas se encuentran en el tracto digestivo. Dentro de las lesiones gastrointestinales se diagnostican inflamaciones del estómago glandular, acompañadas con acumulaciones de mucus viscoso; en casos graves, ulceraciones y dilatación del proventrículo, así como inflamaciones catarrales y hemorrágicas del intestino (Schweighardt y col., 1984; Baker, 1992; Filippich y Parker, 1994; Conzo y Liberti, 1999). Además, se describe un reblandecimiento y ablación de la capa de coilina del estómago muscular (Van, Herck y col., 1984).

Investigaciones indican que la dilatación del proventrículo es consecuencia de un aumento en la mucosidad (Schweighardt y col., 1984), por acumulaciones del alimento (Huchzermeyer y col., 1993), o debido a un impedimento del tránsito en el istmo entre proventrículo y estómago muscular, siendo éste la principal causa de la dilatación (Baker, 1992). Las úlceras y erosiones descritas en el estómago glandular de periquitos, pueden llevar eventualmente a perforaciones del proventrículo (Filippich y Parker, 1994).

La principal característica histológica de una infección por "Megabacterias" en el proventrículo es la disposición paralela y en alta densidad de estos gérmenes, especialmente en la parte distal del proventrículo y en el lumen de las glándulas mucosas superficiales (Schweighardt y col., 1984; Van Herck y col., 1984). Huchzermeyer y col. (1993), en polluelos de avestruz observaron una concentración de "Megabacterias" en la capa profunda de coilina del estómago muscular.

En periquitos infectados con "Megabacterias", se describe una inflamación de la mucosa del proventrículo con infiltración de monocitos, linfocitos, macrocitos y heterófilos. En conjunto con una "Megabacteriosis" crónica, se encuentra una proliferación de tejido conectivo (Baker, 1992).

Para el diagnóstico diferencial de "Megabacteria" se deben considerar las siguientes enfermedades: Salmonelosis crónica, Psitacosis/Ornitosis, Macaw wasting disease, y afecciones que cursen con una disminución de peso en forma crónica (Wolf, 2000).

En clínicas veterinarias se pueden diagnosticar las "Megabacterias" mediante tinción de Gram, basándose en características morfológicas como el largo, ancho, grosor celular, forma recta del bastón y ramificaciones en "Y" (Wolf, 2000).

En relación con la terapia, se ha utilizado Nistatina vía oral. Debido al poco tiempo de permanencia de Nistatina en el tracto gastrointestinal y a la profunda localización de "Megabacterias" en la mucosa, el tratamiento no muestra ningún efecto (Schweighardt y col., 1984). Se describen todas las terapias con antibióticos en periquitos sin éxito (Baker, 1985). Huchzermeyer y col. (1993), no encontraron ningún antibiótico eficaz contra "Megabacteria" en experimentos realizados en polluelos de avestruz.

Resultados de investigaciones "*in vitro*" sobre la sensibilidad de "Megabacterias" frente a distintos antibióticos son variables. De esta manera, se informa de sensibilidad frente a Cloranfenicol, Ampicilina y Cefaloridina (Scanlan y Graham, 1990; Huchzermeyer y col., 1993).

La excreción de "Megabacterias" se puede evitar mediante la administración de Anfotericina B; sin embargo, su mecanismo de acción se desconoce y el curso de la enfermedad no se detiene en todos los casos (Schweighardt y col., 1984; Filippich, 1997). El uso de Anfotericina B diluido en el agua de bebida o aplicado directamente en el buche del ave produce un aumento de peso y una mejoría del estado general de éstas (Christensen y col., 1997). Conzo y Liberti (1999), informan sobre una disminución de la mortalidad de un 5 % a un 18 % en un grupo de 200 periquitos, después de la administración de Anfotericina B en el agua de bebida.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la presencia de "Megabacterias" en aves de producción intensiva, de traspatio y ornamentales en Chile, planteándose como hipótesis: "Megabacterias" están presentes en Chile en aves de producción intensiva, de traspatio, y ornamentales produciendo signos clínicos y lesiones anatomopatológicas.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material biológico

- 200 Proventrículos y estómago muscular de Broilers.
- 130 Proventrículos y estómago muscular de Reproductoras.
- 100 Proventrículos y estómago muscular de Pavos.
- 151 Muestras de heces cloacales de aves de traspatio.
- 102 Muestras de heces frescas de aves ornamentales.

Las aves examinadas se clasificaron de acuerdo a la propuesta de Wolters (1975-1982) (Anexo N° 13).

4.1.2. Material de laboratorio

- Solución fisiológica salina.
- Soluciones para Tinción de Gram.
- Soluciones para Tinción de PAS
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Microscopio de contraste de fases.
- Tijeras, pinzas.
- Tórulas.

4.2. METODOS

Este estudio exploratorio de la pesquisa de "Megabacterias" se llevó a cabo mediante muestreo de conveniencia.

El primer grupo correspondió a aves de producción intensiva de las distintas plantas faenadoras. Estos fueron abiertos mediante un corte longitudinal y se procedió a retirar la capa de coilina del estómago muscular, determinándose la presencia o ausencia de lesión de ambos estómagos.

El procedimiento de obtención de muestras consistió en realizar un raspado profundo de la zona intermedia entre el proventrículo y estómago muscular, raspado que se colocó sobre el portaobjetos con una gota de solución fisiológica salina, observándose el frotis en un microscopio de contraste de fases con un aumento de 10x y 40x. Simultáneamente, se procedió a obtener un segundo raspado de la zona mencionada, el cual se colocó sobre el portaobjetos y se procedió a teñir con Gram. Esta muestra se observó en el microscopio con aumento 100x.

Las muestras de heces de las diferentes especies de aves se obtuvieron de dos formas:

1.- En aves de traspatio de procedencia particular, se tomaron muestras de 23 aves provenientes de Temuco, 70 aves de Máfil y 58 aves de Niebla. Para obtener las muestras de heces se introdujo en la cloaca una tórula humedecida en solución fisiológica salina (Anexo N° 2-4).

2.- En aves ornamentales mantenidas en jaulas, se tomaron muestras de diferentes locales de venta de mascotas. En Temuco a partir de 2 locales se obtuvieron 26 muestras de heces, 34 muestras desde 3 locales en Valdivia y 42 muestras de 3 locales en Osorno. Con una tórula humedecida en solución fisiológica salina se obtuvieron en forma selectiva las heces frescas, depositadas en el piso de las jaulas (Anexo N°5 - 12).

Las muestras de heces frescas y de cloaca, se tiñeron con Gram para su posterior observación al microscopio con aumento de 100x. De las muestras que presentan formas similares a "Megabacterias" en la tinción de Gram, se realizó un nuevo frotis que se sometió a la tinción de PAS para verificar la presencia.

De acuerdo a la concentración de "Megabacteria" presentes en las muestras (Wolf, 2000), éstas se clasificaron en:

- 1.- Negativa: sin presencia de Megabacteria.
- 2.- Escaso: menos de 10 Megabacterias por campo.
- 3.- Mediana: entre 10 a 50 Megabacterias por campo.
- 4.- Alta: más de 50 Megabacterias por campo.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a una evaluación estadística descriptiva, apoyada en fotografías.

5. RESULTADOS

En el primer grupo, constituido por 430 proventrículos y estómago muscular provenientes de 3 plantas faenadoras, no se evidenciaron lesiones a nivel del proventrículo de igual modo cuando se procedió a retirar la capa de coilina de la molleja. Esta capa se mantenía firmemente adherida a la mucosa.

Tanto en las muestras preparadas a partir del raspado profundo de la zona intermedia entre proventrículo y estómago muscular tratados con solución fisiológica, como en los teñidos con Gram, no se evidenciaron microorganismos similares a "Megabacterias" (Anexo N°1).

En el segundo grupo que correspondía a 151 aves de traspatio se encontraron formas que corresponden a las descritas como "Megabacterias" en 14 aves, las cuales se distribuyeron en: Patos domésticos, pavos, gallinetas, y gallinas (Cuadro N° 1).

CUADRO N° 1

PRESENCIA DE "MEGABACTERIAS" EN FROTIS DE CLOACA TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES DE TRASPATIO.

| Especie | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|--------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Faisán Mongol Azul | 6 | 6 | 6 | 0 |
| Gallinas * | 97 | 97 | 88 | 9 |
| Gallinetas | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Gansos | 8 | 8 | 8 | 0 |
| Palomas ** | 4 | 4 | 4 | 0 |
| Pato mudo | 6 | 6 | 6 | 0 |
| Patos domésticos | 13 | 13 | 10 | 3 |
| Pavos | 15 | 15 | 14 | 1 |
| Pavo real | 1 | 1 | 1 | 0 |

*Los gallos/ gallinas de traspatio corresponden las siguientes razas/ híbridas: gallina araucana negra, barreada, trintre, cogote pelado, cogote pelado trintre,

criolla, desnuda de abesinia, seda blanca, Brahma, Isabrown, Leghorn, Shaver y gallito de la pasión.

**Las palomas representan las razas Abanico y Capuchino.

De un total de 102 muestras de heces frescas, de distintas especies de aves ornamentales mantenidas en jaulas, teñidas con Gram, se observaron microorganismos similares a "Megabacterias" en seis muestras provenientes de periquitos (Cuadro N° 2).

CUADRO N° 2

PRESENCIA DE "MEGABACTERIAS" EN HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES ORNAMENTALES.

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|--------------------------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Bengalíes | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Cachaña | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Canarios | 62 | 29 | 29 | 0 |
| Codorniz | 26 | 11 | 11 | 0 |
| Cotorra argentina | 5 | 3 | 3 | 0 |
| Diamantes | 39 | 13 | 13 | 0 |
| Inseparables (<i>A fischeri</i>) | 8 | 4 | 4 | 0 |
| Inseparables (<i>A roseicolli</i>) | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Paloma abanico | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Periquitos | 96 | 35 | 29 | 6 |

Tanto en las aves de traspatio como ornamentales en las que se pesquisó "Megabacterias" no se observaron signos clínicos.

Las características morfológicas de estos microorganismos corresponden a las descritas como "Megabacterias". Estos microorganismos son Gram y PAS positivos y se presentan principalmente en forma de bastones, observándose en un caso ramificaciones en "Y" (Cuadro N° 3). La concentración de "Megabacterias" por campo fue escasa en todas las muestras, este microorganismo presentaba un ancho de 1 μm y una longitud que osciló entre 20 a 30 μm (Cuadro N° 3 y 4) (Figura 1 y 2).

CUADRO N° 3

PRESENCIA, DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS "MEGABACTERIAS" EN FROTIS DE CLOACA Y HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM EN DIFERENTES ESPECIES AVIARES

| Especies | Muestras Positivas | Densidad | Morfología |
|-------------------------------|--------------------|----------|---------------------|
| Gallina barreada | 1 | Escaso | Bastones |
| Gallina cogote pelado | 1 | Escaso | Bastones |
| Gallina cogote pelado trintre | 1 | Escaso | Bastones |
| Gallina criolla | 2 | Escaso | Bastones |
| Gallineta | 1 | Escaso | Bastones |
| Gallito de la Pasión | 3 | Escaso | Bastones |
| Pato doméstico | 1 | Escaso | Ramificación en "Y" |
| Pato doméstico | 2 | Escaso | Bastones |
| Pavo | 1 | Escaso | Bastones |
| Periquitos * | 6 | Escaso | Bastones |
| Polla trintre | 1 | Escaso | Bastones |

* Heces frescas

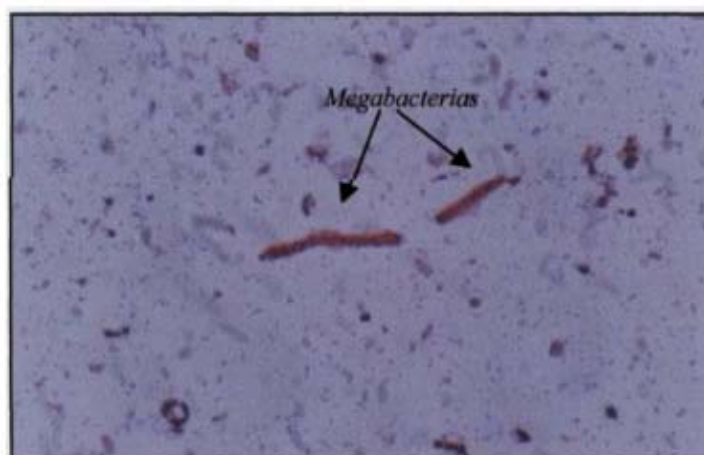


Figura 1: "Megabacterias" en heces de cloaca de gallineta con Tinción de Gram (100x)

CUADRO N° 4

PRESENCIA, DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS "MEGABACTERIAS" EN FROTIS DE CLOACA Y HECES FRESCAS TEÑIDOS CON PAS EN DIFERENTES ESPECIES AVIARES

| Especies | Muestras Positivas | Densidad | Morfología |
|-------------------------------|--------------------|----------|------------|
| Gallina barreada | 1 | Escaso | Bastones |
| Gallina cogote pelado | 1 | Escaso | Bastones |
| Gallina cogote pelado trintre | 1 | Escaso | Bastones |
| Gallina criolla | 2 | Escaso | Bastones |
| Gallineta | 1 | Escaso | Bastones |
| Gallito de la Pasión | 3 | Escaso | Bastones |
| Pato doméstico | 3 | Escaso | Bastones |
| Pavo | 1 | Escaso | Bastones |
| Periquitos * | 6 | Escaso | Bastones |
| Polla trintre | 1 | Escaso . | Bastones |

* Heces frescas.

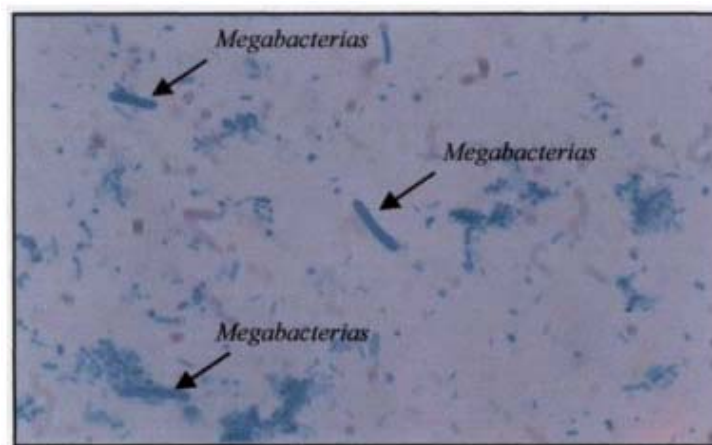


Figura 2: "Megabacterias" en heces de cloaca de pato doméstico con tinción de PAS (100x).

6. DISCUSION

Según la literatura, las "Megabacterias" tienen importancia como patógeno primario en periquitos (*Melopsittacus undulatus*) y canarios (*Serinus canarius*), mientras su patogenicidad en gallinas de traspatio y de mantenimiento industrial necesita de mayor investigación (Wolf, 2000). Exámenes histopatológicos pueden contribuir a la definición de la patogenicidad de "Megabacterias" en las diversas especies aviares (Ravelhofer y col., 1998; Wolf, 2000).

En la obtención de las muestras para determinar la presencia de "Megabacterias", se utilizaron tres técnicas. En las aves de producción intensiva, las muestras se obtuvieron mediante un raspado profundo en el área del istmo entre proventrículo y molleja (Schweighardt y col., 1984; Baker, 1992; Christensen y col., 1997; Wolf, 2000), no se encontraron aves positivas a "Megabacterias" posiblemente debido a que se utilizan sustancias promotoras de crecimiento en la alimentación que podrían ejercer una acción inhibitoria sobre la multiplicación de las "Megabacterias" o bien a la aplicación de estrictos programas de bioseguridad. La literatura indica que "Megabacterias", también pueden ser encontradas en las heces (Huchzermeyer y col., 1993; Christensen y col., 1997; Filippich y Hendrikz, 1998; Ravelhofer y col., 1998), por lo tanto, ante la imposibilidad de sacrificar las distintas especies de aves muestreadas, se procedió a obtener heces de la cloaca, lo cual permite identificar al individuo. Además, se tomaron muestras de heces frescas, idealmente las recién excretadas, cuya desventaja principal es la dificultad para identificar individuos, además de existir riesgo de contaminación.

En el presente trabajo, a través del microscopio de contraste de fases con un aumento de 100x, "Megabacterias" se diferenciaron fácilmente de otros microorganismos, ya que además de su gran longitud y ancho poseen una típica forma de bastón.

Investigaciones llevadas a cabo por Wolf (2000), con relación a la tinción de Gram, demuestra que ésta produce una segura y rápida coloración de las "Megabacterias", aunque no permite un contraste del citoplasma, específicamente de los organelos. La descripción en la literatura como Gram y PAS positivo (Van Herck y col., 1984; Schweighardt y col., 1984; Scanlan y Graham, 1990; Ravelhofer y col., 1998; Wolf, 2000) concuerdan con los resultados del trabajo.

La presentación de Megabacterias ramificadas en "Y", se puede considerar como ramificaciones verdaderas de las células, formas que en bacterias se presentan con poca frecuencia (Rolle y Mayr, 1993). Investigaciones indican que estas formas, no corresponden a sobreposiciones de patógenos aislados, ni a

artefactos debido a medidas poco óptimas de cultivo, sino a uniones firmes, que mediante micromanipulación no se pueden separar (Ravelhofer y col., 1998).

El hallazgo de "Megabacteria" en aves de traspatio, demuestra que es posible una amplia distribución en este tipo de ave. Debido al manejo extensivo de estas aves, que se diferencia notablemente del manejo de otras especies infectadas por estos microorganismos (mantención en jaulas), es posible pensar que la tenencia al aire libre y el contacto con aves silvestres infectadas con "Megabacterias", podrían facilitar la infección en gallinas, pavos y patos (Filippich y Parker, 1994; Conzo y Liberti, 1999). Factores climáticos y/o de manejo pueden influir en la epidemiología de "Megabacterias" en las aves mencionadas.

Investigaciones realizadas por Wolf (2000), indican que entre las "Megabacterias" de los Passeriformes y gallinas no se presentan diferencias morfológicas significativas en relación con la longitud de este microorganismo, por lo tanto, no se puede descartar que las "Megabacterias" descritas en gallinas, pavos y patos sean transmitidas por Passeriformes silvestres, a través del consumo de las heces. Debido a que las "Megabacterias" se encuentran menos adaptadas a estas especies aviares, producen un menor efecto patógeno que en los Passeriformes. Posiblemente ocurra una multiplicación masiva de "Megabacterias", solamente cuando el sistema inmune esté ya debilitado por otras causas.

En la literatura se ha descrito el hallazgo de microorganismos similares a "Megabacteria" en periquitos, patos domésticos, pavos y gallinas (Ravelhofer y col., 1998; Wolf, 2000). La presencia de este microorganismo en gallinetas o pintadas (*Numida meleagris*) no estaba hasta ahora documentada en la literatura.

Es importante destacar el riesgo de contaminación con "Megabacterias" en los locales de venta, en los cuales puede existir transmisión desde aves ornamentales positivas a "Megabacterias" (periquitos, canarios), hacia aves de producción de pocos días de edad (pollitos, patitos, etc.), que permanecen en el mismo ambiente. Además, es posible que factores ambientales y de manejo adversos faciliten la colonización y susceptibilidad de estas especies. Al respecto, es recomendable mantener una estricta separación en la venta de aves de producción y ornamentales, considerando la posible transmisión no sólo de "Megabacterias", sino de otros agentes infecciosos, como el virus de la Enfermedad de Newcastle y/o Influenza.

En relación a la hipótesis se acepta que "Megabacteria" está presente en Chile en aves de traspatio y ornamentales, pero se rechaza con respecto a que las aves infectadas manifiestan signos clínicos y lesiones anatomopatológicas.

Bajo las condiciones en que se realizó este ensayo y de acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que "Megabacterias" están presentes en Chile en aves domésticas de traspatio (patos domésticos, pavos, gallinas y gallinetas), en

muestras de heces cloacales. Además, estos microorganismos se pesquisaron en muestras de heces recién excretadas de periquitos en diferentes locales comerciales.

7. BIBLIOGRAFIA

- BAKER, J. 1985. Clinical and pathological aspects of "going light " in exhibition budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Rec.* 116: 406 - 408.
- BAKER, J. 1992. Megabacteriosis in exhibition budgerigars. *Vet Rec.* 131: 12-14.
- BAKER, J. 1997. Megabacteria in diseased an healthy budgerigars. *Vet. Rec.* 140: 627.
- CHRISTENSEN, N., J. HUNTER, M. ALLEY. 1997. Megabacteriosis in flock of budgerigars. *N. Z. Vet. J.* 45: 196-198.
- CONZO, G., L. LIBERTI. 1999. Megabacterium infections of the proventriculus in recently imported pet birds to Italy. 5° Conf. Europ. Assoc. Avian Vet., Pisa. pp. 30-32.
- COOKE, S. 2000. Role of megabacteria in mammals. *Vet. Rec.* 146: 15, 444.
- FILIPPICH, L. 1997. Megabacteria and Going light syndrome in birds. 1st Int Symp Pet. Bird. Nutrition, Hannover. pp. 125-126.
- FILIPPICH, L., D. BOYLE, R. WEBB, J. FUERST. 1993. Megabacteria in birds in Australia. *Aust. Vet. Prac.* 23: 71-76.
- FILIPPICH, L., M. PARKER. 1994. Megabacteria and proventricular / ventricular disease in Psittacines and Passerines. Proc. A. Avian Vet, Reno / USA. pp. 287 - 293.
- FILIPPICH, L., J. HENDRIKZ. 1998. Prevalence of megabacteria in budgerigars colonies. *Aust. Vet. J.* 76: 92-95.
- HUCHZERMEYER, F., M. HENTON, R. KEFFEN. 1993. High mortality associated with megabacteriosis of proventriculus and gizzard in ostrich chicks. *Vet. Rec.* 133: 143-144.
- JONES, D., C. CARROL. 1977. Debilitating syndrome in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Rec.* 101:188.

- MUTLU, O., S. SECKIN, K. RAVELHOFER, R. HILDEBRAND, F. GRIMM. 1997. Eine durch Megabakterien verursachte Drüsenmagenentzündung beim Haushuhn (*Gallus gallus* var. Dom. L, 1758). *Tierärztl. Praxis*. 25: 460-462.
- PENNYCOTT, T., H. ROSS, I. LAREN, A. PARK, G. HOPKINS, G. FOSTER. 1998. Causes of death of wild birds of the family Fringillidae in Britain. *Vet. Rec.* 143: 155-158.
- RAVELHOFER, K., R. ROTHENEDER, M. GAREIS, R. SUTTNER, O. WOLF, R. MATIELLO, J. KÖSTERS. 1998. Megabakteriosen bei verschiedenen Vogelspezies. XI DVG-Tagung Vogelkrankheiten, München. pp. 95-104.
- RAVELHOFER, K., R. ROTHENEDER, H. ENGELHARDT, O. WOLF, R. AMANN, W. BREUER, J. KOSTERS. 2000. Taxonomische Klassifizierung von "Megabakterien"- Isolaten aus Wellensittichen (*Melopsittacus undulatus* Shaw, 1805). *Tierärztl. Praxis*. 28:415-420.
- ROLLE, M., A. MAYR. 1993. Fortpflanzung bei Bakterien und Pilzen. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Mayr A, Hrsg. Stuttgart. pp. 477-482.
- SCANLAN, C; D. GRAHAM. 1990. Characterization of a gram positive bacterium from the proventriculus of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Avian Dis.* 34: 779-786.
- SCHWEIGHARDT, H., P. PECHAN, E. LAUERMANN. 1984. Leichtwerden, Hinfälligkeit und Erbrechen als Ausdruck einer spezifischen, pilzbedingten Drüsenmagenentzündung bei Wellensittichen und Kanarienvögeln. *Kleintierpraxis* 29: 439-442.
- TONELLI, A. 1993. Megabacteriosis in exhibition budgerigars. *Vet. Rec.* 133: 492.
- TUSCHAK, N., H. HAFEZ, G. HEIL. 1990. Vorkommen von Megabakterie-Infektion ("Leichtwerden") bei Wellensittichen und anderen Ziervögeln. *Prakt. Tierarzt.* 10: 24-30.
- VAN HERCK, H., T. DUIJSER, P. ZWART, G. DORRESTEIN, M. BUITELAAR, M. HAGE. 1984. A bacterial proventriculitis in canaries (*Serinus canaria*). *Avian Path.* 13:561-572.
- WOLF, O. 2000. Untersuchungen zu Vorkommen, Bedeutung und Eigenschaften von sog Megabakterien bei verschiedenen Vogelspezies. Diss. Med. Vet., München (in Vorbereitung).

WOLTERS, H. 1975-1982. Die Vogelarten der Erde - eine systematische Liste mit Verbreitungsangaben sowie deutschen und englischen Namen. Parey, Hamburg, Berlin.

8. ANEXOS

ANEXO N° 1

PRESENCIA DE "MEGABACTERIAS" EN PROVENTRICULO Y ESTOMAGO MUSCULAR DE AVES DE PRODUCCION INTENSIVA EN FROTIS TRATADOS CON SOLUCION FISIOLÓGICA Y TINCIÓN DE GRAM.

| Categoría | Muestras N° | Muestras | |
|---------------|-------------|--------------|--------------|
| | | Negativas N° | Positivas N° |
| Broiler | 200 | 200 | 0 |
| Pavos | 100 | 100 | 0 |
| Reproductoras | 130 | 130 | 0 |

ANEXO N° 2

PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN FROTIS DE CLOACA TEÑIDOS CON GRAM EN MUESTRAS CLOACALES DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES DE TRASPATIO EN TEMUCO

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|-------------------------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Faisán Mongol Azul (hembra) | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Faisán Mongol Azul (macho) | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Gallina criolla | 5 | 5 | 3 | 2 |
| Gallito de la Pasión (hembra) | 8 | 8 | 6 | 2 |
| Gallito de la Pasión (macho) | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Paloma Abanico | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Paloma Capuchino | 2 | 2 | 2 | 0 |

ANEXO N° 3

**PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN FROTIS DE CLOACA TEÑIDOS CON
GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES DE TRASPATIO EN MAFIL**

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|-------------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Gallina Araucana | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Gallina Barreada | 7 | 7 | 7 | 0 |
| Gallina Brahma | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Gallina Isabrown | 25 | 25 | 25 | 0 |
| Gallina Leghorn | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Gallina Seda blanca | 3 | 3 | 3 | 0 |
| Gallo Barreado | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Gallo Brahma | 3 | 3 | 3 | 0 |
| Gallo Criollo | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Gallo Italiano | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pato doméstico (hembra) | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Pato doméstico (macho) | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pato mudo (hembra) | 5 | 5 | 5 | 0 |
| Pato mudo (macho) | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pavo blanca (hembra) | 1 | 1 | 2 | 0 |
| Pavo blanco (macho) | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Pavo negra (hembra) | 6 | 6 | 6 | 0 |
| Pavo negro (macho) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pavitos | 3 | 3 | 3 | 0 |
| Polla Araucana | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Polla Criolla | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Polla Isabrown | 3 | 3 | 3 | 0 |

ANEXO N° 4

**PRESENCIA DE "MEGABACTERIAS" EN FROTIS DE CLOACA Y HECES
FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES EN
NIEBLA**

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|-------------------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Cachaña * | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Canarios * | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Cotorra argentina * | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Faisán mongol azul (hembra) | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Faisán mongol azul (macho) | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Gallina Araucana | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Gallina Barreada | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Gallina cogote pelado | 4 | 4 | 3 | 1 |
| Gallina cogote pelado trintre | 3 | 3 | 2 | 1 |
| Gallina Criolla | 4 | 4 | 4 | 0 |
| Gallina Desnuda de Abesinia | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Gallina Isabrown | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Gallina Shaver | 3 | 3 | 3 | 0 |
| Gallineta | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Gallito de la Pasión (hembra) | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Gallito de la Pasión (macho) | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Gallo trintre castellano | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Gallo blanco | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Ganso domésticos | 8 | 8 | 8 | 0 |
| Pato domestico | 10 | 10 | 7 | 3 |
| Pavo Real | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Pavitos | 3 | 3 | 3 | 0 |
| Polla Criolla | 3 | 3 | 3 | 0 |
| Polla trintre | 1 | 1 | 0 | 1 |

* Muestras de heces frescas obtenidas desde las jaulas.

ANEXO N° 5**PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES EN LOCAL DE VENTA N° 1 DE TEMUCO.**

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|--------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Canarios | 8 | 5 | 5 | 0 |
| Diamantes | 6 | 3 | 3 | 0 |
| Inseparables | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Periquitos | 9 | 4 | 4 | 0 |

ANEXO N° 6**PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES EN LOCAL DE VENTA N° 2 DE TEMUCO.**

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Canarios | 8 | 4 | 4 | 0 |
| Diamantes | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Periquitos | 12 | 6 | 6 | 0 |

ANEXO N° 7**PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES ORNAMENTALES EN LOCAL DE VENTA N° 1 DE VALDIVIA.**

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Canarios | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Diamantes | 5 | 2 | 2 | 0 |
| Periquitos | 17 | 7 | 4 | 3 |

ANEXO N° 8**PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES ORNAMENTALES EN LOCAL DE VENTA N° 2 DE VALDIVIA.**

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Periquitos | 11 | 3 | 2 | 1 |

ANEXO N° 9**PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN HECES FRESCAS TENIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES ORNAMENTALES EN LOCAL DE VENTA N° 3 DE VALDIVIA.**

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Canario | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Codorniz | 26 | 11 | 11 | 0 |
| Periquitos | 11 | 2 | 1 | 1 |

ANEXO N° 10**PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES ORNAMENTALES EN LOCAL DE VENTA N° 1 DE OSORNO.**

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|----------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Canarios | 16 | 6 | 6 | 0 |
| Diamantes | 12 | 2 | 2 | 0 |
| Paloma Abanico | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Periquitos | 4 | 2 | 2 | 0 |

ANEXO N° 11

PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES ORNAMENTALES EN LOCAL DE VENTA N° 2 DE OSORNO.

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Canarios | 16 | 4 | 4 | 0 |
| Diamantes | 8 | 2 | 2 | 0 |
| Periquitos | 12 | 4 | 4 | 0 |

ANEXO N° 12

PRESENCIA DE "MEGABACTERIA" EN HECES FRESCAS TEÑIDOS CON GRAM DE DIFERENTES ESPECIES DE AVES ORNAMENTALES EN LOCAL DE VENTA N° 3 DE OSORNO.

| Especies | Individuos N° | Muestras N° | Muestras | |
|--------------------------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Negativas N° | Positivas N° |
| Bengalíes | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Canarios | 8 | 6 | 6 | 0 |
| Cotorra argentina | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Diamantes | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Inseparables (<i>A fischeri</i>) | 4 | 2 | 2 | 0 |
| Inseparables (<i>A roseicolli</i>) | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Periquitos | 20 | 4 | 2 | 2 |

ANEXO N° 13

SISTEMATICA ZOOLOGICA SEGUN WOLTERS (1975-1982)

| | NOMBRE COMUN | NOMBRE ZOOLOGICO |
|----------|-----------------------|---|
| O | Columbiformes | |
| F | Columbidae | |
| G | Columba | |
| E | Paloma Abanico | Columba liviana domestica var Abanico |
| | Paloma Capuchino | Columba liviana domestica var Capuchino |
| O | Psittaciformes | |
| F | Micropsittidae | |
| G | Agapornis | |
| E | Inseparables | Agapornis fischeri |
| | Inseparables | Agapornis roseicollis |
| G | Cyanoliseus | |
| E | Cachaña | Cyanoliseus patagonus |
| G | Myiopsitta | |
| E | Cotorra argentina | Myiopsitta monachus |
| F | Melopsittacidae | |
| G | Melopsittacus | |
| E | Periquitos | Melopsittacus undulatus domesticus |
| O | Anatiformes | |
| F | Anatidae | |
| G | Anser | |
| E | Ganso doméstico | Anser anser domesticus |
| G | Cairina | |
| E | Pato mudo | Cairina moschata |
| G | Anas | |
| E | Pato doméstico | Anas platyrhynchos domesticus |
| O | Phasianiformes | |
| F | Phasianidae | |
| G | Numida | |
| E | Gallineta (Pintada) | Numida meleagris |
| G | Pavo | |
| E | Pavo real | Pavo cristatus |
| G | Meleagris | |
| E | Pavos | Meleagris gallopavo domesticus |
| G | Phasianus | |
| E | Paisán Mongol Azul | Phasianus colchicus |
| G | Gallus | |
| E | Gallinas de traspatio | Gallus gallus domesticus |
| | Broiler | Gallus gallus domesticus var. Broiler |
| | Reproductoras | Gallus gallus domesticus var. Reproductoras |
| | Gallito de la Pasión | Gallus gallus domesticus var. de la Pasón |

| | | |
|---|---------------|-----------------------------------|
| G | Coturnix | |
| E | Codorniz | <i>Coturnix Japonica</i> |
| O | Passeriformes | |
| F | Estrildidae | |
| G | Stagonopleura | |
| E | Diamante | <i>Stagonopleura guttata</i> |
| G | Lonchura | |
| E | Bengalíes | <i>Lonchura striata domestica</i> |
| F | Carduelidae | |
| G | Serinus | |
| E | Canario | <i>Serinus canaria domesticus</i> |

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible la realización de esta Tesis

Con especial reconocimiento a :

Dr. Josef Kösters, Profesor Patrocinante, por el apoyo brindado y buena disposición.

Dr. Jorge Ulloa, por su apoyo y desinteresada ayuda.

Dra. Aída Cubillos, por su apoyo y dedicación.

Dr. Orlando Garrido, por su desinteresada ayuda.

Sra. Gloria Jara, por su buena disposición.

Jéssica, Marta, Sandra y Myriam por su constante apoyo y comprensión.

Don Daniel, por su buen humor.