

MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS EN PRIMATES ALOJADOS EN EL CENTRO DE RECEPCIÓN Y REHABILITACIÓN DE FAUNA SILVESTRE DEL DAMA, BOGOTÁ

Barragán K.B.^a, Brieva C.^a, Guerrero M.I.^b

^aUniversidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

^bGrupo de Micobacterias, Subdirección de Investigación. Instituto Nacional de Salud. Bogotá-Colombia.

RESUMEN

Enmarcados dentro del estudio de especies micobacterianas en primates en cautiverio de Barragán *et al.* 2005, investigamos la presencia de especies micobacterianas en 41 primates neotropicales de diferentes especies, cautivos en el Centro de Rescate y Rehabilitación de Fauna Silvestre del Departamento Administrativo del Medio Ambiente - DAMA. Evaluamos 82 muestras de lavados gástricos y de sangre mediante amplificación por PCR del gen *hsp65* para MNT (micobacterias no tuberculosas). Del total de sujetos investigados en el CRRFS (41 primates), encontramos 4 animales con MNT, generalmente presentes en el medio, lo que corresponde a una prevalencia de 9.75% de MNT. Concluimos que aunque la prevalencia encontrada fue baja, evidencia un gran riesgo para la salud pública teniendo en cuenta la importancia que han cobrado las MNT dentro de la salud humana.

Palabras claves: *Micobacterias, hsp65, Primates Neotropicales, MNT, Mycobacterium.*

INTRODUCCIÓN

En el género *Mycobacterium* se ubican, además de micobacterias tuberculosas, especies saprófitas denominadas micobacterias oportunistas, que normalmente habitan el medio ambiente, pudiendo causar ocasionalmente enfermedad tanto al hombre como a los animales (León 1998; Dulbecco *et al.* 1983).

Dentro del grupo de micobacterias no tuberculosas se encuentran: *Complejo M. avium-intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae*, *M. parafortuitum*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. genavense*, entre otras (Mc Murray 2000; León 1998, Renquist & Whitney 1987; Lepper & Corner 1983, Dulbecco *et al.* 1983).

Las micobacteriosis (enfermedades producidas por micobacterias no tuberculosas - MNT) han sido reportadas tanto en primates del Viejo Mundo, como en primates del Nuevo Mundo (Heard *et al.* 1997; Lamberski 1993; Lepper & Corner 1983).

El complejo *Mycobacterium avium* comprende dos especies: *M. avium* y *M. intracellulare*, así como otras bacterias de difícil asignación. Se han reconocido cuatro subespecies de *M. avium*: *avium*, *hominissuis*, *paratuberculosis* y *silvaticum* (Murcia *et al.* 2004). Este complejo, el reportado con mayor frecuencia, ha sido aislado en animales sanos (Lamberski 1999) y en animales enfermos (Kaup 2000; Heard *et al.* 1997; Sedgwick *et al.* 1970) cuyos signos característicos son depresión, pérdida de peso y diarrea asociada a lesiones granulomatosas a lo largo del intestino delgado y grueso (Heard *et al.* 1997; Thoen 1993; Henrickson 1984; Lepper & Corner 1983). Aunque este complejo también ha causado lesiones de tuberculosis pulmonar en algunos Callitrichidae (Montali & Bush 1999) y enfermedad cutánea en *Macaca fascicularis* (Dillehay & Huerkamp 1990) y otros primates (Ott – Joslin 1993).

Al igual que en pacientes humanos portadores de VIH (Thornton *et al.* 1999; León 1998), se ha observado enfermedad producida por el Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* en primates portadores de SIV (Virus de Inmunodeficiencia en Simios) (Kennedy *et al.* 1997; Dillehay & Huerkamp 1990).

La infección con *M. intracellulare* ha sido identificada en *Macaca mulata*, observando variables clinicopatológicas; mientras uno de los primates presentó enfermedad entérica diseminada, el otro estaba clínicamente sano y en la necropsia no se encontraron lesiones macroscópicas (Fleischman *et al.* 1982).

También existen reportes de otras micobacterias que pueden producir tuberculosis en primates, por ejemplo, *M. scrofulaceum* (Adams *et al.* 1995), *M. ulcerans* y *M. kansasii* (Dillehay & Huerkamp 1990; Brammer *et al.* 1995), o simplemente micobacterias aisladas en abscesos en *Aotus trivirgatus*, como el *M. chelonae* (Lepper & Corner 1983; Boever *et al.* 1976).

Otras micobacterias saprofitas han sido aisladas de primates, pero han sido raramente asociadas con enfermedad (Alfonso *et al.* 2004; Foster 1993), es el caso del *M. nonchromogenicum*, *M. favescens*, *M. fortuitum* y *M. terrae*, aislados en orangutanes (*Pongo pygmaeus*) (Calle *et al.* 1989).

Las infecciones por micobacterias MNT en primates, usualmente están asociadas a pruebas cutáneas de tuberculina falsas positivas, debido a reacciones cruzadas como consecuencia de antígenos que comparten estas micobacterias con las del complejo *M. tuberculosis* (Ott – Joslin 1993; Wells *et al.* 1990; Calle *et al.* 1989; Lehner 1984; Sedgwick *et al.* 1970).

Existe una real susceptibilidad de los primates a las infecciones con micobacterias no tuberculosas y hay una dificultad de identificación en animales vivos (Heard *et al.* 1997). Para Fleischman *et al.* 1982, en años recientes ha habido un incremento en el número de reportes de micobacterias MNT como patógenos humanos y de

primates. Por lo tanto, el reconocimiento de infección con MNT en primates es importante por varias razones: el diagnóstico en vivo es difícil por su nula o baja respuesta a los test de tuberculina mamífera o aviar, las micobacterias MNT son más resistentes a la mayoría de drogas quimioterapéuticas, el curso de estas infecciones en primates no ha sido establecido claramente y el curso potencial de infección incluye el suelo, el agua, otros animales, otros primates y el humano.

En Colombia, como en el resto del mundo, no se conoce la verdadera prevalencia de las enfermedades por micobacterias no tuberculosas (León 1998; Fleischman *et al.* 1982). En el caso de los humanos, los aislamientos de micobacterias MNT han aumentado y muchos de ellos son la causa de enfermedad, tanto en inmunocompetentes como en inmunosuprimidos, siendo las especies aisladas con mayor frecuencia: *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum* (León 1998).

En el Centro de Recepción de Fauna Silvestre del Departamento Administrativo del Medio Ambiente (DAMA) se alojan primates de diferentes géneros y especies, provenientes de decomisos y entregas voluntarias. La labor de este centro es recibir y dar un manejo adecuado a estos animales, procurando que su destino final (rehabilitación para liberación, reubicación o eutanasia) sea el más adecuado según el caso. Uno de los principales campos de acción desarrollado en estos centros es el de la medicina de animales silvestres, dentro del cual la investigación de patologías propias de especies colombianas es de interés primordial.

Aparte del interés científico, es necesario establecer que los primates alojados en el centro del DAMA se encuentren libres de enfermedades potencialmente zoonóticas, como es el caso de la tuberculosis y micobacteriosis. Lo anterior es de vital importancia ya que por un lado existe un riesgo para las personas que manejan directamente estos primates. y por el otro, algunos de estos animales

serán liberados al medio ambiente, con el consecuente riesgo para las poblaciones silvestres.

Esta razón ha motivado el interés conjunto del Grupo de Micobacterias de la Subdirección de Investigación del Instituto Nacional de Salud, la Universidad Nacional de Colombia (URRAS) y el DAMA para realizar investigación de micobacterias presentes en los primates alojados en este centro como parte del estudio realizado por Barragán *et al.* 2005., mediante metodologías moleculares, como una primera aproximación a la situación de los primates colombianos a este respecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

SUJETOS EXPERIMENTALES

Teniendo en cuenta la alta cantidad de primates alojados en el CRRFS durante la realización de este estudio (período comprendido de agosto de 2003 a septiembre de 2004), y la falta de recursos económicos, los individuos estudiados fueron solamente los involucrados en proyectos de rehabilitación y liberación, es decir 41 individuos. Todos los animales incluyeron aquellos clínicamente sanos o enfermos, de todos los sexos y edades. Se identificaron con el número de historia clínica asignado en el centro, y se tuvo en cuenta el género y la especie correspondientes.

La distribución de las especies en el Centro de Rescate y rehabilitación de Fauna Silvestre – CRRFS, se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de Especies de Primates en el CRRFS

Especies	Número individuos
<i>Cebus apella</i>	8
<i>Saimiri sciureus</i>	7
<i>Cebus albifrons</i>	19
<i>Ateles belzebuth</i>	1
<i>Aotus sp.</i>	6
Total	41

TOMA DE MUESTRAS

Restricción Química

La restricción química se realizó previa restricción física del animal mediante la inyección intramuscular de una mezcla de Ketamina HCL (Imalgene 500 o 1000® Lab.) a dosis de 20 – 30 mg/Kg. y Xilazyne HCL (Rompum® Lab.) a dosis de 0.5 – 1 mg/kg.

Muestra de Sangre

Se obtuvo una muestra de sangre entera en tubos Vacutainer® con anticoagulante (EDTA) de la vena femoral, en volumen mínimo de 1 ml por animal. La muestra de sangre se realizaba previa desinfección del área femoral con yodo y alcohol.

Lavado Gástrico

Se utilizó una sonda orogástrica estéril, por la cual se instilaron de 10 a 20 ml de agua ultra pura (MiliQ), dependiendo del tamaño de la especie, y aspirando

nuevamente la totalidad del contenido gástrico, colocándolo en un tubo estéril con 2ml de TSP (10%) y homogenizando inmediatamente.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Traslado al laboratorio

Las muestras fueron llevadas al Grupo de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud el mismo día de la toma. Las muestras de aspirado gástrico que no pudieron ser trasladadas ese mismo día se refrigeraron a 4°C y se llevaron en menos de 12 horas. Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Pruebas moleculares

Aislamiento del ADN

La muestra se inactivó y se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo de J. van Embden *et al.* utilizado rutinariamente para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Marcadores moleculares para MNT: PRA

Esta técnica conocida como PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis), es un método reportado por Telenti *et al.* 1993, que consiste en la amplificación de un fragmento del gen *hsp65* (gen que codifica para la proteína micobacteriana de 65kDa, detecta la presencia de cepas del género *Mycobacterium*) el cuál es sometido a las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*. La interpretación se realiza

por comparación con tablas publicadas y siguiendo un algoritmo disponible en internet (<http://app.chuv.ch/prasite>).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados fueron colectados y analizados mediante el programa de computador *EpiInfo2002*®, determinando distribución de frecuencias de todas las variables incluidas en la base de datos, discriminadas por especie de primate y por especie de micobacteria encontrada.

RESULTADOS

PRESENCIA DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS

Se realizó el PCR-PRA a todas las muestras de lavado gástrico y sangre, obteniendo amplificación del fragmento de 439pb en 4 muestras de lavado gástrico que fueron purificadas y sometidas a restricción con las enzimas *Hae III* y *BstE II*.

En la electroforesis realizada se separaron y visualizaron las bandas producidas por la restricción de las dos enzimas observando diferentes patrones (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de MNT presentes en los primates del CRRFS.

Centro	H.C.*	Especie	MNT	Bandas <i>BstE II</i> (peso)	Bandas <i>Hae III</i> (peso)
CRRFS	7020	<i>Cebus albifrons</i>	<i>M. vaccae</i> ¹	440	160, 90, 60
CRRFS	11322	<i>Cebus albifrons</i>	<i>M. flavescens</i> ¹	440	140, 60, 55
CRRFS	13844	<i>Cebus apella</i>	<i>M. flavescens</i> ³	440	160, 85, 55

CRRFS	13845	<i>Cebus apella</i>	<i>M. szulgai</i> ¹	440	130, 105, 60
-------	-------	---------------------	--------------------------------	-----	--------------

*Número de Historia Clínica

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS PRIMATES CON MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (MNT)

Del total de sujetos experimentales del CRRFS (41 primates), 4 animales presentaron, es decir, que la prevalencia para MNT es de 9.75%. Así mismo, el análisis de distribución de frecuencias, mostró que los animales con MNT correspondían principalmente a *Cebus apella* (2) y *Cebus albifrons* (2). La mayoría de los animales infectados correspondía a machos adultos, lo que se observa también en el caso de micobacterias en la población humana.

DISCUSIÓN

Las MNT se identificaron solamente en las muestras de lavado gástrico. Esto debido, probablemente, a que la diseminación hematológica de las micobacterias no es continua y depende de la carga bacteriana que haya llegado a infectar; además, en este estudio se detectó infección, no enfermedad, donde si existe diseminación vía hematológica del agente patógeno.

La presencia de MNT está ampliamente reportada en primates, la prevalencia encontrada aquí (9.75%), demuestra que las MNT están infectando primates aunque por sus características de no patógenas sino de patógenas oportunistas, sólo representan un peligro limitado tanto para la salud de estas especies como para la salud humana de los individuos inmunosuprimidos. Las MNT, por estar ampliamente difundidas en la naturaleza, normalmente colonizan el tejido normal (León 1998).

Los *Mycobacterium vaccae*, *M. szulgai* y *M. flavescens* se han encontrado colonizando tejidos de humanos inmunocompetentes en Colombia y otros países (León 1998). Sin embargo, en los últimos años, se han encontrado reportes de enfermedad por *M. szulgai*, en humanos inmunosuprimidos (León, C.I.¹. comunicación personal), lo que las convierte en organismos oportunistas.

Es importante tener en cuenta que aunque algunas de estas micobacterias no han sido relacionadas con un proceso patógeno, probablemente por la falta de estudios en las implicaciones reales de estas MNT, podrían actuar como patógenos oportunistas y dar lugar a una enfermedad extendida en un huésped con déficit inmunitario (Dulbecco *et al.* 1983).

Finalmente, se observa que no existe una diferencia real a nivel descriptivo (frecuencias) en cuanto a la edad, al sexo y al tipo de entrega de los individuos infectados con MNT con respecto a los individuos que no las presentaron, ya que al realizar la comparación, en ambas poblaciones (infectados y no), tanto el porcentaje de machos como de adultos era más alto.

Este estudio muestra la importancia de realizar estudios médicos más específicos en todos los primates que se encuentran en cautiverio, ya sea para programas de reintroducción a la vida silvestre, para exhibición en zoológicos, para investigación o para otros fines que impliquen contacto cercano con el humano.

Existe un riesgo real de tuberculosis y micobacteriosis en general, para las poblaciones de primates en cautiverio, las poblaciones silvestres y los humanos que se encargan de su manejo, por ello es de suma importancia realizar más

¹ Investigadora Grupo de Micobacterias – Instituto Nacional de Salud

estudios sobre la epidemiología de las micobacterias tuberculosas y MNT, en primates tanto de vida silvestre como en cautiverio, para conocer su real significancia epidemiológica y de salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, S; MUCHMORE, E & J RICHARDSON. 1995. **Biosafety**. En: BENNETT, T; ABEE, C & R. HENRICKSON (Eds). *Nonhuman Primates in Biomedical Research. Biology and Management*. Academic Press, Inc. USA. Pp 375 – 420.

ALFONSO, R; ROMERO, R; DIAZ, A; CALDERON, M; URDANETA, G; ARCE, J; PATARROYO, M. E. & M. A. PATARROYO. 2004. **Isolation and Identification of Mycobacteria in New World Primates Maintained in Captivity**. *Veterinary Microbiology*. 98: 285 – 295.

BARRAGÁN, K; BRIEVA, C. & M. GUERRERO. 2005. **Estudio preliminar de especies de micobacterias en primates colombianos no humanos en cautiverio en dos centros de rescate de fauna silvestre de Bogotá**. Tesis de Maestría en Ciencias - Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Colombia. 98p.

BOEVER, W.; THOEN, C. & J. WALLACH. 1976. ***Mycobacterium chelonae* Infection in a Natterer Manatee**. *JAVMA*. 169 (9): 927 – 929.

BRAMMER, D.; O'ROURKE, C.; HEATH, L.; CHRISP, C.; PETER, G. & G. HOFING. 1995. ***M. kansasii* Infection in Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus sciureus*)**. *J. Med. Primatol*. 24: 231 – 235.

CALLE, P.; THOEN, C. & M. ROSKOP. 1989. **Tuberculin Skin Test Responses, Mycobacteriologic Examinations of Gastric Lavage, and Serum Enzyme – Linked Immunoabsorbent Assays in Orangutans (*Pongo pygmaeus*)**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 20 (3). 307 – 314.

DILLEHAY, D. & M. HUERKAMP. 1990. **Tuberculosis in a Tuberculin – Negative Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) on Chemoprophylaxis**. Journal of Zoo and Wild Life Medicine. 21 (4): 480 – 484.

DULBECCO, D.; DAVIS, B.; CULBECCO, R.; EISEN, H.; GINSBERG, H.; WOOD, B. & M. McCARTHY. 1983. **Tratado de Microbiología**. Segunda Edición. Editorial Salvat – Editores S.A. Pp. 868 – 891.

FLEISCHMAN, R.; du MOULIN, G.; ESBER, H.; ILIEVSKI, V. & A. BODGEN. 1982. **Nontuberculous Mycobacterial Infection Attributable to *Mycobacterium intracellulare* Serotype 10 in Two Rhesus Monkeys**. JAVMA. 181 (11): 1358 – 1362.

FOSTER, J. 1993. **Health Plan for the Mountain Gorillas of Rwanda**. En: FOWLER, M. (Ed). Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy 3. WB Saunders Company. USA. Pp. 331 – 340.

HEARD, D.; GINN, P. & L. NEUWIRTH. 1997. ***Mycobacterium avium* – intracellulare Infection in a White – Faced Saki (*Pithecia pithecia*)**. American Association of Zoo Veterinarians. 185 – 188.

HENRICKSON, R. 1984. **Biology and Diseases of Old World Primates**. En: COHEN, B & F. LOEW (Eds). Laboratory Animal Medicine. Academic Press Inc. USA. Pp. 297 - 381.

KAUP, F. 2002. **Infectious Diseases and Animal Models in Primates**. Primate Report. 62: 16 – 18.

KENNEDY, R.; SHEARER, M. & W. HILDEBRAND. 1997. **Nonhuman Primate Models to Evaluate Vaccine Safety and Immunogenicity**. Vaccine. 5(8): 903 – 908.

LAMBERSKI, N. 1999. **Nontuberculosis Mycobacteria: Potential for Zoonosis**. En: FOWLER, M. & E. MILLER (Eds). Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy 4. W.S. Saunders Company. USA. 146 – 150.

LEHNER, N. 1984. **Biology and Diseases of Cebidae**. En: Laboratory Animal Medicine. Academic Press Inc. USA. Pp. 321 - 353.

LEÓN, C.I. 1998. **Presencia de las Micobacterias No Tuberculosas en Colombia**. MEDICAS UIS. Revista de los Estudiantes de Medicina de la Universidad Industrial de Santander. 12: 181 – 187.

LEPPER, A & L CORNER. 1983. **Naturally Occurring Mycobacterioses of Animals**. En: RATLEDGE, C. & J. STANFORD (Eds). The Biology of Mycobacteria. Vol. 2. Academic Press, Inc. Inglaterra. Pp 417 – 500.

MONTALI, R. & M. BUSH. 1999. **Diseases of the Callitrichidae**. En: FOWLER, M. & E. MILLER (Eds). Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy 4. W.S. Saunders Company. USA. 369 – 396.

OTT – JOSLIN, J. 1993. **Zoonotic Diseases of Nonhuman Primates**. En: FOWLER, M. (Ed). Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy 3. WB Saunders Company. USA. Pp. 358 – 373.

RENQUIST, D. & R. WHITNEY. 1987. **Zoonoses Acquired From Pet Primates**. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 17 (1) 219-240.

SEDGWICK, C.; PARCHER, J. & R. DURHAM. 1970. **Atypical Mycobacterial Infection in the Pig – Tailed Macaque (*Macaca nemestrina*)**. J. Am. Vet. Assoc. 157, 5. 724 – 725.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTRGER, E. & T. BODMER. 1993. **Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis**. Journal of Clinical Microbiology. 31 (2), 175 – 178.

THOEN, C. 1990. **Mycobacterial Infections in Exotic Animals: Pathogenesis and Diagnosis**. Proceedings American Association of Zoo Veterinarians. IOWA – USA. 103 – 1015.

THORNTON, C.; CRANFIELD, M.; MACLELLAN, K.; BRINK, T.; STRANDBERG, J.; CARLIN, E.; TORRELLES, J.; MASLOW, J.; HASSON, J.; HEYL, D.; SARRO, S.; CHATTERJEE, D. & S. PASSEN. 1999. **Processing Posmortem Specimens With C18 – Carboxypropylbetaine and Analysis by PCR to Develop an Antemortem Test for *M. avium* Infections in Ducks**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 30 (1): 11 – 24.

VAN EMBDEN, J.; VAN GORKOM, T.; KREMER, K.; JANSEN, R.; VAN DER ZEIJST, B. & I. SCHOOLS. 2000. **Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Lcus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria.** Journal of Bacteriology. 182 (9): 2393 – 2401.

WELLS, S.; SARGENT, E. & M. ANDREWS. 1990. **Tuberculosis and Tuberculin Testing in Orangutans (*Pongo pygmaeus*).** Proceedings American Association of Zoo Veterinarians. Pp 110 – 113.