

71176

MFN:
Clasif:
T-738



Crear... Crear... Crecer...

# **DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENTERITIS PROLIFERATIVA PORCINA EN CRIADEROS CONFINADOS DE LA ARGENTINA**

Trabajo de tesis presentado para optar al título de  
**MAGISTER EN SALUD Y PRODUCCIÓN PORCINA**

**M. V. Judith Martina Bertone**

**Directora: Dra. MV Silvia Romanini**  
**Codirector: MSc. MV Raúl Yaciuck**

A mis papis, Jorge y Noemí, por tanto sacrificio y apoyo incondicional. Gracias por cuidarme los chicos tantas veces en los viajes que esta profesión me llevó a hacer.

A Lisandro, mi hermano, gracias por tu apoyo.

A Jorge, por haberme ayudado a tener lo que siempre soñamos, una familia hermosa, por llorar junto a mí cuando vemos crecer a nuestros hijos, tan felices y rápido.

A Martina, mi Martu, que con sus nueve añitos me ha enseñado lo que es la pasión y la dedicación por lo que se ama.

A Lorenzo, mi Lolo, la personita más tierna y dulce, nunca pierdas tu inocencia.

Los amo...

## **Agradecimientos**

En primer lugar a esta querida institución la Universidad Nacional de Río Cuarto, que me ha permitido crecer como alumna de grado y posgrado, docente y amiga de mis compañeros docentes, no docentes y alumnos.

A Arnaldo Ambrogi, por incentivar-me a realizar la Maestría. A todo el grupo de Salud y Producción Porcina que me apoyo incondicionalmente y a Bibiana Pelliza por su insistencia y amistad.

A Silvia Romanini, quien me apoyó como Directora, por su ayuda en la vida, por estar siempre en los momentos buenos y malos, como compañera, amiga y a veces como hermana mayor.

A Raúl Yaciuk, por su mirada sabia, por sus consejos y su paciencia en todo el trayecto de esta tesis, por su vocación a enseñar en todo momento.

A mis compañeros de cohorte, Natalia Illanes, Hernán Lovera, Ana Cabral y Paola Corrales, por lo que nos divertimos y por el apoyo que me siguen dando todos los días.

A Pablo Tamiozo, Julián Parada, Roberto Ambrogi, Sergio Bautista y Lucas Melanesio por su ayuda en el laboratorio y en el campo.

A mis amigos Marcos, Mónica, Cecilia, Andrea que me ayudaron tanto especialmente a Nelcy y Analia por su cariño, por ayudarme a poner a punto las técnicas y por las horas compartidas en el laboratorio, y a Santiago por conciliarme con la tecnología, muchas gracias.

## **INDICE**

<b>RESUMEN</b>	10
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	15
<b>CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO</b>	17
1.1- Acerca de la Enteritis Proliferativa Porcina	18
1.2- Formas clínicas y edad de presentación de la enfermedad	20
1.3- Importancia Económica de la enfermedad	23
1.4- Características biológicas de la <i>Lawsonia intracellularis</i>	24
1.5- Taxonomía	25
1.6- Vías de infección de la Enteritis Proliferativa Porcina	26
1.7- Estructura histológica y respuesta inmunológica en el intestino delgado del cerdo	27
1. 7.1- Modulación de la respuesta inmune en la mucosa intestinal	30
1.8- Tropicismo y ubicación del agente	33
1.9- Patogenia de la Enteritis Proliferativa Porcina	34
1.10- Curso de la enfermedad	39
1.11- Respuesta inmunitaria específica frente a <i>Lawsonia intracellularis</i>	41
1.11.1- Inmunidad celular y humoral	41
1.11.2- Inmunidad materna	45
1.12- Características anatomopatológicas del intestino delgado	46
1.13- Características histopatológicas del intestino delgado	48
1.14- Regeneración del tejido intestinal	50
1.15- Formas de diagnóstico de <i>Lawsonia intracellularis</i>	51
1.15.1- Diagnóstico Ante mortem	51
1.15.2- Diagnóstico Post mortem	54
1.15.3- Diagnóstico diferencial	57
<b>CAPITULO II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	59

2.1- Hipótesis de trabajo	60
2.2- Objetivos	60
2.2.1- Objetivo general	60
2.2.2- Objetivos particulares	60
<b>CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>61</b>
3.1- Población a estudiar	62
3.2- Selección de los animales	62
3.3- Abordaje de la cavidad abdominal y sitio para la toma de muestra	63
3.4- Toma de muestras	63
3.4.1- Procedimiento para obtención de muestras para Histoquímica e Inmunohistoquímica	64
3.4.2- Procedimiento para obtención de muestras para PCR de materia fecal	64
3.4.3- Procedimiento para obtención de muestras para PCR de mucosa	64
3.4.4- Procedimiento para obtención de muestras para Microscopía Electrónica	65
3.5- Procesamiento de las muestras en el laboratorio de histopatología	65
3.5.1- Preparación de los tejidos destinados a Histoquímica e Inmunohistoquímica	65
3.5.2- Protocolo de tinción de Hematoxilina Eosina	66
3.5.3- Protocolo de tinción de Warthin Starry	66
3.5.4- Protocolo de Inmunoperoxidasa	67
3.6- Procesamiento de las muestras en el laboratorio de PCR	67
3.7- Procesamiento de las muestras en el área de Microscopía Electrónica	68

<b>CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	69
4.1- Observación de lesiones anatómo-patológicas en mesenterio, lifonódulos mesentéricos e íleon	70
4.2- Observación de lesiones histopatológicas con tinción de Hematoxilina Eosina en íleon	80
4.3- Observación de <i>Lawsonia intracellularis</i> con tinción de Warthin Starry en íleon	94
4.4- Observación de <i>Lawsonia intracellularis</i> mediante técnicas de Inmunoperoxidasa en íleon	98
4.5- Resultados de la técnica de PCR en la mucosa ileal	104
4.6- Resultados de la técnicas de PCR en la materia fecal	105
4.7- Observación de <i>Lawsonia intracellularis</i> mediante Microscopía Electrónica	106
4.8- Comparación de resultados por diferentes técnicas y lesiones	108
4.9- Análisis Estadístico	113
<b>CAPITULO V CONCLUSIONES</b>	119
<b>CAPITULO VI ANEXOS</b>	122
Anexo 1.	123
Anexo 2.	124
Anexo 3.	125
Anexo 4.	127
Anexo 5.	131
Anexo 6.	132
Anexo 7.	134
Anexo 8.	135
Anexo 9.	138





## **RESUMEN**

La Enteropatía Proliferativa Porcina (EPP) o Ileítis es considerada por numerosos investigadores como una de las principales enfermedades transmisibles en la producción confinada de cerdos en todo el mundo. Producida por *Lawsonia intracellularis* (Li), una bacteria Gram (-), bacilo pequeño, móvil, intracelular obligado curvo o recto (Lawson y cols, 1993; McOrist y cols, 1994; Lawson y cols, 2000; McOrist y Gebhart, 2005), que manifiesta como principales signos clínicos anorexia, diarrea, retardo en el crecimiento e incremento en la mortalidad de cerdos en la etapa de terminación (Lawson y Gebhart, 2000; Jensen y cols, 2006).

La distribución de esta enfermedad es mundial y en algunos países el porcentaje de establecimientos afectados por Ileítis supera al 90% (McOrist y cols, 2003; McOrist y cols, 2006). Estudios serológicos han demostrado que la prevalencia de EPP en criaderos van del 60 al 90% en diferentes países de todo el mundo (Guedes, 2004).

Es una patología que afecta principalmente al intestino delgado, en particular al ileon en su parte terminal, y a veces, al ciego y al colon. La mucosa alterada por EPP se caracteriza por encontrarse engrosada y arrugada, producto de la proliferación adenomatosa de las células epiteliales inmaduras de las criptas infectadas por *Li* (Lawson y Gebhart, 2000; Jacobson y cols, 2003; Rodríguez y cols, 2004).

En los últimos años la consideraron a *Li* como el agente causal de hiperplasia en intestino, en numerosas especies de mamíferos y aves. Además de producir la enfermedad en cerdos, se ha comunicado su presencia en hamsters, equinos (Lawson y Gebhart 2000; França, 2007), ratones y macacos en cautiverio (Smith y cols 2000; Klein y cols, 1999) y se ha sugerido también como agente de la colitis ulcerosa en seres humanos, estudios en curso (Pitcher y cols en Smith y cols, 2000).

La EPP se manifiesta de dos formas en las granjas infectadas: en una forma crónica, con tres cuadros lesionales macroscópicos bien diferenciados, la adenomatosis intestinal, la enteritis necrótica y la ileítis regional; y en una forma aguda, la Enteropatía proliferativa hemorrágica (McOrist y Gebhart, 1999). Si bien estas

formas mantienen la misma lesión de base, son muy diferentes en sus manifestaciones clínicas (Carvajal y cols, 2005). Algunos autores agregan una forma más de presentación, a la que denominan subclínica (McOrist, 2006), sin los signos típicos de diarrea, pero afirman que desde el punto de vista de los parámetros productivos, esta enfermedad no debería pasar inadvertido.

Debido a que es una bacteria que no crece en medios convencionales "in vitro" en ausencia de enterocitos, tanto el aislamiento como el diagnóstico serológico resultan complicados ya que la respuesta humoral que se produce es variable y corta (Huerta y cols, 2003). Tanto el cuadro clínico como la observación de las lesiones macroscópicas son insuficientes para el diagnóstico certero de EPP, por lo que se recomienda un diagnóstico laboratorial, pudiendo ser directo o indirecto (Lawson y cols, 2000; Carvajal y cols, 2005). En función del incremento de casos de ileítis en la casuística de nuestro Departamento y su reciente asociación con otras entidades como Circovirus Porcino tipo 2 (PCV-2) (Jensen y cols, 2006; Machuca y cols, 2008); nos propusimos establecer una rutina de diagnóstico confiable y económica para ser aplicada en el servicio de diagnóstico histopatológico que brinda el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria.

Este trabajo se realizó en el marco de un proyecto de investigación denominado "Caracterización Patológica, Macro y Microscópica de Diarreas en Cerdos Confinados de 8 a 22 Semanas de Edad" iniciado el año 2007, en el marco de un Programa de Alta Salud para el Mejoramiento de la Calidad del Producto en Establecimientos Porcinos, que incluyó el estudio de varias entidades patológicas productoras de diarrea, como *Brachyspira spp.* y *Criptosporidium spp.*

En el presente trabajo se exponen los resultados de una investigación cuyo objetivo general ha sido el de determinar la presencia de *Li*, caracterizar las lesiones macroscópicas y microscópicas mediante diferentes técnicas de diagnóstico la EPP en los criaderos confinados, en cerdos con diarrea. El estudio se realizó sobre un total de

21 establecimientos intensivos pertenecientes a ocho provincias de la República Argentina.

Se realizó un muestreo no probabilístico de conveniencia (Thrusfield, 1990) dirigido en cada establecimiento, a 3 animales de entre 8 y 21 semanas de edad, con diarrea y con disminución de su condición general, presentaran o no lesiones anatómo-patológicas compatibles con EPP en íleon, a 10 cm por delante de la válvula ileocecal. El muestreo incluyó: necropsia, observación de las lesiones macroscópicas presentes, determinación color y de la consistencia, protocolización y toma de muestras de tejido y de materia fecal, sobre un total de 61 cerdos. Las técnicas empleadas en mucosa intestinal incluyeron Hematoxilina Eosina (H/E), Warthin Starry (WS), Inmunoperoxidasa (IPX), PCR y Microscopía electrónica (ME); y en materia fecal, PCR.

La discusión y los resultados se presentan en forma conjunta para cada uno de los ítems analizados, con el fin de facilitar su comprensión. En los resultados obtenidos se demuestra que las lesiones macroscópicas en general, no pueden ser utilizadas como únicas herramientas de diagnóstico. Mientras que los estudios microscópicos sirven para diagnosticar presuntivamente la EPP. La respuesta inflamatoria se caracteriza por la presencia de células inflamatorias de tipo mononuclear, de células gigantes e histiocitos en lámina propia del íleon distal, depleción linfoidea en folículos de Placas de Peyer, abscesos criptales y linfocitos intraepiteliales infiltrados entre los enterocitos hiperplásicos de las criptas de la mucosa ileal.

La constatación del aumento de tamaño del íleon, de los linfonódulos y de las lesiones microscópicas proliferativas típicas, es una herramienta confiable a la hora de caracterizar la EPP, cuando es utilizada en forma conjunta en el examen post mortem. La técnica de WS resultó ser rápida y simple en su desarrollo y permitió identificar, además del agente etiológico, estructuras histológicas, patológicas y la respuesta celular. Por otro lado la técnica de IPX fue la prueba de oro para el diagnóstico histopatológico de *Li*, y permitió identificar diferentes etapas en la patogenia de la enfermedad (incluyendo los animales en recuperación) y grado de infección. Además,

permitió determinar la asociación entre la presencia de la bacteria, las lesiones macroscópicas y las lesiones proliferativas microscópicas. La técnica de PCR de mucosa ileal permitió identificar animales con poca cantidad de *Li* en mucosa y su asociación con las lesiones, de donde se concluye que su aplicación podría ayudar a determinar infecciones subclínicas. La técnica de PCR de materia fecal por su parte dio lugar a la identificación de cerdos siguieron eliminando bacterias de manera intermitente por varias semanas. Por último, la ME permitió identificar animales con signos de recuperación con enterocitos con numerosos cuerpos apoptóticos, sin microvellosidades, sin *Li* en su interior y con macrófagos en la luz glandular.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AI	Adenomatosis Intestinal
EN	Enteritis Necrótica
EPH	Enteropatía Proliferativa Hemorrágica
EPP	Enteropatía Proliferativa Porcina
HE	Hematoxilina Eosina
HQ	Histoquímica
IHQ	Inmunohistoquímica
IR	Ileítis Regional
IPX	Inmunoperoxidasa
<i>Li</i>	<i>Lawsonia intracellularis</i>
ME	Microscopía Electrónica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR MF	PCR de materia fecal
PCR M	PCR de mucosa
WS	Warthing Starry



**CAPITULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## 1.1- Acerca de la Enteropatía Proliferativa Porcina

La Enteropatía Proliferativa Porcina fue comunicada por primera vez en 1931 por Harry Biester en Estados Unidos, a partir de la descripción de las lesiones anatomopatológicas en cerdos con esta enfermedad (Guedes, 2005; McOrist y Gebhart, 2005a). Se la describió como una enfermedad neoplásica transmisible que podía estar asociada a dietas ricas en granos y pobres en vitaminas (McOrist y Gebhart, 2005a). Emsbo y cols, en 1951, describieron la enfermedad en animales en el frigorífico (Lawson y Gebhart, 2000). Posteriormente, en 1972, en el Reino Unido, Rowland y Lawson diagnosticaron un síndrome hemorrágico en cerdos con engrosamiento de mucosa (Carvajal y cols, 2005a). Estos autores describirían un año más tarde, la presencia de bacterias intracelulares en los enterocitos de las áreas del intestino con proliferación epitelial, asociando así las lesiones al microorganismo (Guedes, 2005; McOrist y Gebhart, 2005a). A partir de entonces se inicio un estudio más profundo de la enfermedad, considerando causas y consecuencias. Al comienzo, algunos autores atribuyeron la causa a *Campylobacter spp* (Wilson y cols, 1986; McOrist y Gebhart, 2005a), al observar la presencia de pequeñas bacterias curvas en el interior de las células proliferadas al examinar la ultraestructura de las lesiones o al emplear tinciones de plata; más tarde se denominó al agente "microorganismo semejante a *Campylobacter*" (*Campylobacter-like organisms*) (McOrist y cols, 1992).

Denominado *Ileal symbiont intracellularis*, el agente fue aislado en 1993, por Lawson y cols, mediante su siembra en células entéricas; logrando la reproducción de la enfermedad en cerdos a partir de un cultivo puro de este agente infeccioso (Lawson y Gebhart, 2000).

La bacteria fue clasificada y recibió su denominación definitiva en 1995 por investigadores del mismo grupo, que la clasificaron como un nuevo género denominado *Lawsonia* en honor a Lawson dándole el nombre de especie

"*intracellularis*" por sus características de cultivo y de ciclo vital (McOrist y cols, 2005; Jensen y cols, 2006).

La distribución de esta enfermedad es mundial y en Estados Unidos y algunos países de Europa, el porcentaje de establecimientos afectados supera al 90% (McOrist y cols, 2003; Chouet y cols, 2003). Estudios serológicos han demostrado que la prevalencia de Enteropatía Proliferativa Porcina en rebaños fue del 60 al 90% en diferentes países de todo el mundo (Guedes, 2004). Por otro lado, en un estudio epidemiológico realizado hace algunos años en España en una granja infectada, fue detectada la eliminación de *Li* por PCR en el 12% de las hembras gestantes y en el 8% de las lactantes, así como en el 35% de los animales de 12 a 17 semanas y en el 4% de los animales de terminación de 18 a 23 semanas (Carvajal y cols, 2005b). En Europa se habla de que al menos de un 20% a un 47% de las granjas de cerdos han tenido algún caso serio de ileítis, mientras que la prevalencia de infección en granjas afectadas es generalmente de un 20 a un 30% de los cerdos en engorde (McOrist, 2006a).

En Argentina, la Ileítis fue descrita por primera vez por el grupo de investigación de patologías porcinas de la Universidad Nacional de La Plata entre 1996 y 1997, oportunidad en la que se trabajó sobre dos granjas, una de las cuales contaba con antecedentes de Enteropatía Proliferativa Hemorrágica, determinándose la presencia de *Li* en los animales examinados a través de los hallazgos anatomopatológicos, histológicos, histoquímicos y de microscopía electrónica (Perfumo y cols, 1996; Perfumo y cols, 1997). En otro estudio serológico realizado en 2006, en 30 explotaciones intensivas en confinamiento, localizadas en Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, San Luis, La Rioja y Entre Ríos; se determinó que el 76,6% de las granjas fueron positivas, encontrando una prevalencia intrapredial que varió del 57,7 al 90,1% (Perfumo y cols, 2006). En 2007 se determinó que el 68,8% de las granjas de la República Argentina estuvieron en contacto con la bacteria y que, en cerdos en

engorde, el porcentaje de animales seropositivos fue del 19,8% (Machuca y cols, 2009).

En un estudio de cohorte transversal en 22 establecimientos de la zona de mayor producción porcina del país, realizado en cerdos de 8, 15 y 21 semanas de edad, mediante la técnica de ELISA en suero y por PCR en materia fecal, se descubrió que el 90,9% de las granjas fueron seropositivas, así como la eliminación de *Li* por PCR, encontrándose entre 5 y 30 muestras positivas en 3 de los establecimientos muestreados. En este estudio se concluyó también que *Li* está presente en forma endémica a lo largo del país y dentro de los establecimientos, y que el mayor impacto de la enfermedad se da en los animales de 15 semanas de edad (Corrales y cols, 2009).

## **1.2- Formas clínicas y edad de presentación de la enfermedad**

La Enteropatía Proliferativa Porcina se manifiesta clínicamente de dos formas en las granjas infectadas: una forma crónica, con tres tipos de lesiones macroscópicas bien diferenciadas; que son la adenomatosis intestinal, la enteritis necrótica y la ileítis regional; y una forma aguda, la Enteropatía Proliferativa hemorrágica (Gebhart y Guedes, 2001). Estas formas difieren mucho en sus manifestaciones clínicas, aunque mantienen la misma lesión de base macroscópicamente caracterizada por el engrosamiento de la mucosa del íleon y, en menor grado, del ciego y del colon, y microscópicamente por la hiperplasia de los enterocitos inmaduros de las criptas (Carvajal y cols, 2005a). La EPH, se caracteriza por provocar la muerte aguda de cerdos reproductores y animales de reposición entre los 4 y 12 meses de edad (McOrist y Gebhart, 1999). Algunos autores, como McOrist y Gebhart (1999) agregan una forma de presentación que es la subclínica.

Clínicamente, los casos crónicos se presentan con diarrea y los casos subclínicos se manifiestan con variaciones en el peso en cerdos de 6 a 20 semanas de edad. Para McOrist, los casos más leves son difíciles de detectar, pero aún son

relativamente comunes en las piaras, por lo que estas granjas deben ser monitoreadas periódicamente para detectar cambios en el aumento de peso y eficacia en la conversión de los grupos de post-destete. En cambio, la forma crónica, al caracterizarse por diarreas persistentes, anorexia y pérdida severa de la condición corporal junto a la forma hemorrágica aguda; es más fácil de detectar (McOrist, 2006b).

Por otro lado, autores como Carvajal y cols (2005b) y McOrist y cols (2007), consideran que no se debería hablar de EPP subclínica, ya que a pesar de que en algunos casos puede no haber una diarrea evidente ni otros síntomas clínicos clásicos, la enfermedad siempre tiene mayor o menor impacto en los parámetros productivos como los índices de conversión, ganancia de peso media diaria y uniformidad en cerdos de terminación.

La Adenomatosis Intestinal es la forma de presentación más leve y también la más frecuente, de manifiesta entre las 6-8 semanas y las 14-18 semanas de edad según lo expresan los distintos autores, entre el destete y la mitad de la fase de engorde, aunque esta edad puede variar en cada granja en función de la epidemiología de la infección y de las del establecimiento (Lawson y Gebhart, 2000; Chouet y cols, 2003; McOrist y cols, 2007), los animales presentan generalmente anorexia y desmejoramiento (MacIntyre y cols, 2003). La mortalidad no es alta, generalmente no supera el 5%, y la mayoría de los animales se recuperan y pueden llegar a término con algún retraso (Lawson y Gebhart, 2000; McOrist y cols, 2007).

En los casos más leves, los signos clínicos son difíciles de reconocer, ya que solo se produce un ligero deterioro de la ganancia de peso media diaria con un desmejoramiento del índice de conversión. Se manifiesta también una desigualdad en las camadas, que se mantiene hasta el final de la categoría de terminación. Cuando los signos son más evidentes, puede observarse una anorexia más o menos marcada y las heces contienen restos de alimento sin digerir haciéndose cada vez menos consistentes hasta presentarse muy pastosas, con aspecto de cemento húmedo, y, en algunos cerdos, totalmente líquidas (McOrist y cols, 2007).

La forma aguda EPH ocurre más comúnmente hacia el final del engorde o bien en cerdos adultos de 4 a 12 meses de edad (McOrist y Gebhart, 1999). La morbilidad puede ser menor en la forma crónica (12- 50%) mientras que la mortalidad puede llegar al 70% (Gebhart y Guedes, 2001; Carvajal y cols, 2005b). La postura más común entre los investigadores es que la forma aguda se da cuando se infectan cerdos adultos de edades superiores a los 4 meses, con dosis muy altas de *Li*, que no habían tenido ningún contacto previo con esta bacteria. Esto suele suceder al final del engorde o bien en reproductores, sobre todo cuando llegan a una granja infectada cerdas de reposición sin ninguna inmunidad y se colocan en un ambiente muy contaminado (McOrist y cols, 2007). Normalmente se observa un cuadro agudo, en el que el primer signo clínico es una diarrea con heces sanguinolentas u oscuras, también con un aspecto similar al alquitrán, debido a que la sangre en las heces está digerida (Lawson y Gebhart, 2000; MacIntyre y cols, 2003). Ocasionalmente es hiperaguda, y provoca la muerte de algunos cerdos de manera súbita sin manifestar signos clínicos evidentes más que palidez del cadáver, a veces acompañada de eliminación de heces oscuras con un aspecto similar al alquitrán (McOrist y cols, 2007). Los cerdos que sobreviven a los síntomas iniciales mejoran progresivamente durante el período de una semana. En algunos casos los cerdos recuperados no manifiestan una pérdida considerable de la condición corporal, pero en otros casos quedan gravemente afectados, y deben ser eliminados (Lawson y Gebhart, 2000).

Un factor importante en el desencadenamiento de cuadros clínicos más graves de EPP es la presencia de otras infecciones digestivas concomitantes. Durante los años 2002 y 2003, algunos estudios en el territorio español demostraron que en el 46% de los cerdos estudiados se detectó *Li* en las heces mediante PCR y, en algo más de la mitad de ellos, había infecciones mixtas que incluían otros agentes como *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* o diferentes serotipos de *Salmonella* entérica. Por lo cual puede decirse que las infecciones mixtas son muy comunes y, en consecuencia, los cuadros clínicos resultan más difíciles de reconocer (McOrist y cols, 2007).

### **1.3- Importancia Económica de la enfermedad**

La Enteritis Proliferativa Porcina es una enfermedad que produce importantes pérdidas económicas, el mayor impacto económico está dado por el incremento en el uso de antibióticos en tratamientos, para prevenir o como para intentar solucionar los casos clínicos, también por la mortalidad relacionada con la forma aguda de presentación de la EPP (Guedes y cols, 2002a).

La forma crónica, a pesar de ser la manera de presentación más frecuente, es la menos detectada y diagnosticada; causando principalmente disminución de ganancia de peso, disminución de los índices de conversión, desigualdad en los lotes de terminación y retardo para llegar al peso de faena (Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2002a; Guedes, 2004).

En el caso de la presentación subclínica las pérdidas están relacionadas con menor conversión de los animales infectados y además constituyen la fuente de infección de aquellos animales susceptibles (Franca, 2007).

Los estudios más recientes han demostrado que los costos indirectos de la forma crónica van desde 3,55 € por sitio en la terminación y anualmente puede llegar, en algunos casos, a 20 € por sitio en la terminación (Lawson y cols, 2000). Teniendo en cuenta solo la industria porcina estadounidense, los cálculos aproximados de las pérdidas económicas anuales atribuibles a los efectos clínicos y subclínicos de la enfermedad ascienden a unos 100 millones de dólares anuales (Roof y cols, 2008).

El aumento del tiempo de engorde trae consigo una reducción del número de cerdos que pueden venderse al final del engorde. La oportunidad perdida ronda los 2,6 €/sitio de engorde y año (por día adicional de engorde). Los costos adicionales del pienso son del orden de 0,96 € por sitio de engorde. Esto demuestra que el tiempo de engorde más prolongado repercute sustancialmente sobre el rendimiento y el beneficio obtenido de las inversiones en el engorde (Hardge y Mc Orist, 1999).

#### **1.4- Características biológicas de *Lawsonia intracellularis***

*Lawsonia intracellularis* es una bacteria Gram (-), bacilo curvo o recto, algunas veces sigmoideo, con extremos puntiagudos o romos, pequeño y móvil (Lawson y cols, 1993; McOrist y cols, 1994; Lawson y Gebhart, 2000; McOrist y Gebhart, 2005). Al microscopio electrónico se observan bacterias curvas, libres en el citoplasma apical de enterocitos, las cuales miden aproximadamente entre 0,25 a 0,43  $\mu\text{m}$  de espesor y de 1,25 a 1,75  $\mu\text{m}$  de largo (McOrist y cols, 1993; Lawson y cols, 1993; McOrist y cols, 1995; Lawson y Gebhart, 2000; Rodríguez y cols, 2004; McOrist y Gebhart, 2005). Además, se observa una pared celular trilaminar ondulada y un flagelo largo, simple, unipolar y de motilidad pulsátil, pero solo cuando la bacteria se encuentra en el medio extracelular (Lawson y Gebhart, 2000; McOrist y Gebhart, 2005).

Su cultivo es muy complicado, requiere de condiciones semejantes a las provistas para el cultivo viral. Sólo crece en atmósfera con microaerófila controlada, en estufas con niveles reducidos en oxígeno y altos en nitrógeno (Lawson y cols, 1993), en cultivos celulares de enterocitos de rata IEC-18, en íleon de cerdo con división activa, sin producir efecto citopático y en una línea fetal humana INT-407 (McOrist y cols, 1995; Gebhart y Guedes, 2001).

Hasta el momento no se ha logrado cultivar a *Li* en un medio sin células, probablemente porque depende de los trifosfatos sintetizados en las mitocondrias celulares o de una fuente de energía similar localizada en la célula hospedadora para satisfacer sus necesidades metabólicas. Este fenómeno de "parasitismo energético" es similar al de otras bacterias intracelulares obligadas como algunas especies de clamidias y rickettsias, aunque *Li* no está emparentada con dichas bacterias (McOrist y Gebhart, 2005).

Esta bacteria tiene dos características importantes: posee poca variabilidad y prolongada resistencia en el medio. La dificultad que presenta su aislamiento hace que solamente se halla conseguido cultivar menos de veinte cepas en todo el mundo. Estudios de biología molecular han permitido comprobar que todas son muy



semejantes, de modo que solamente con técnicas muy específicas pueden ser encontradas pequeñas diferencias entre unas y otras, en función del animal del que proceden o de su origen geográfico. Esta homogeneidad de cepas facilita la vacunación contra la enfermedad. La otra particularidad práctica importante es la resistencia en el ambiente, comprobándose en estudios realizados en Australia, que la capacidad infectante de las heces dura por lo menos dos semanas al ser mantenidas a temperatura de 18° C. Se supone que la supervivencia en las heces puede ser aún mayor, sin embargo no hay estudios que lo demuestren con certeza (Carvajal y cols, 2005a).

### **1.5- Taxonomía**

Por varios años, luego de no haber aislado *Campylobacter spp.* de los casos de Enteropatía Proliferativa Porcina, se determinó que antigénicamente era diferente, que era intracelular y que no crecía en medios convencionales y desde allí recibió diferentes nombres (McOrist y cols, 1989). Debido a la dificultad del aislamiento recién en 1993 Gebhart y cols, lograron amplificar y secuenciar la región S16 ADN ribosomal de 4 preparaciones de bacterias extraídas directamente de cerdos con enfermedad intestinal. Posteriormente, en 1995 McOrist y cols, obtuvieron la porción de ADNr de colonias de *Lawsonia intracellularis* aisladas en cerdos y en otras especies hospedadoras como hámster, caballo, cérvidos muestreando un alto grado de semejanza (>98%) con las secuencias de ADNr 16S del genoma de *Desulfovibrio desulfuricans*. Se obtuvo de regiones de importancia taxonómica clave y en las proteínas de la pared celular, lo que hace factible la existencia de una sola “cepa” homogénea de *Lawsonia intracellularis* (McOrist y cols, 2005). Al no poseer capacidad sulfatorreductora, la bacteria fue establecida en un nuevo género y especie de la clase *proteobacteria*, denominándose *Lawsonia intracellularis* (McOrist y cols, 1994; McOrist y cols, 1995; Dong-Kyun Suh y cols, 2000).

## **1.6- Vías de infección de la Enteropatía Proliferativa Porcina**

La infección es transmitida por vía fecal-oral, a partir de la ingestión de heces contaminadas o alimento contaminado (McOrist y cols, 1995; Lawson y Gebhart, 2000; Carvajal y cols, 2005b).

La dosis infectante necesaria es moderada, tan solo se necesitan de  $10^6$ -  $10^8$  bacterias por gramo de heces para iniciar la infección del intestino (McOrist y cols, 1993) y cada cerdo excreta aproximadamente  $10^8$  bacterias por gramo de heces según Smith y cols, (1997).

Los animales infectados pueden comenzar a excretar la bacteria en las heces siete días pos-infección, en pocos casos la eliminación persiste hasta los 21 días pos-infección. A veces, en algunos animales puede persistir por 2-3 semanas, mientras que otros son eliminadores intermitentes por 12 semanas (Guedes y cols, 2002a; Carvajal y cols, 2005b; Nistal, 2005). Otros autores indican que la excreción en las heces se realiza por un tiempo mínimo de 10 semanas y que los reproductores pueden llegar a desarrollar un estado de portador asintomático (van der Heijden y cols, 2004). Además, se ha comunicado que existe eliminación de *Li* en animales tan jóvenes como de 3 semanas de edad (Guedes, 2004). Un trabajo realizado en México demuestra que, la frecuencia de eliminación de la bacteria en heces se presentó hasta las 11 semanas post-infección y el mayor número de cerdos lo hizo a las 7 semanas. Todos los cerdos eliminaron *Li* de tres a 8 veces de manera intermitente, durante el período de engorde, lo cual indica una importante persistencia del agente en el establecimiento (Rodríguez Buenfil y cols, 2008).

La importancia de la transmisión por medio de vectores mecánicos y biológicos no se conoce aún. La infección natural se ha reproducido en numerosas especies incluyendo ratas y hamsters de laboratorio, y se ha identificado el agente en roedores de granjas de cerdos, pero se necesitan mas estudios acerca de la implicancia de éstos y otros vectores en condiciones naturales (Guedes, 2004; Jacobson y cols, 2010).

## **1.7- Estructura histológica y respuesta inmunológica en el intestino delgado del cerdo**

Para poder comprender la patogenia de la enfermedad y la respuesta inmune tan particular que se presenta ante la acción de esta bacteria intracelular, se hace necesario recordar las estructuras tisulares e inmunitarias de las distintas porciones del intestino delgado y del íleon en particular, sitio donde ejerce su acción patógena *Li*.

Según Stinson y Lois Calhoun (1976) el intestino delgado está formado por el duodeno, yeyuno e íleon. Las funciones digestiva y absorbente se ven facilitadas por varias estructuras especializadas, como los pliegues, las vellosidades y las microvellosidades, que aumentan la superficie de contacto de la mucosa con el contenido.

La primera capa que se encuentra en íntimo contacto con la luz es la túnica mucosa, comprendida por el epitelio de revestimiento, la lámina propia con glándulas y la muscular de la mucosa. Las vellosidades son proyecciones de mucosa hacia la luz intestinal, recubierta de epitelio cilíndrico simple con células caliciformes que se vuelven más numerosas hacia la porción terminal del intestino delgado (Stinson y Lois Calhoun, 1976).

Las glándulas intestinales de Lieberkühn, se abren en las depresiones entre la base de las vellosidades, atravesando la lámina propia hasta la muscular de la mucosa, éstas se encuentran revestidas de diversos tipos celulares. Las células cilíndricas bajas indiferenciadas se multiplican en la base de las criptas, se diferencian y migran hacia el extremo de la vellosidad, dando lugar a células absorbentes (enterocitos) y a las células caliciformes. Como consecuencia de la continua renovación celular, se pueden observar muchas figuras mitóticas, por lo que el epitelio se renueva cada dos o tres días (Stinson y Lois Calhoun, 1976).

La lámina propia es el tejido conectivo laxo que forma la parte central de las vellosidades y rodea a las glándulas intestinales, en su interior hay vasos sanguíneos, linfáticos, leucocitos, células plasmáticas y cebadas, por debajo de la lámina propia se

encuentra la muscular de la mucosa que está formada por capas de tejido muscular liso, una circular interna y otra longitudinal externa (Stinson y Lois Calhoun, 1976).

A lo largo de todo el intestino delgado se encuentra el tejido linfoide asociado al intestino, GALT del inglés "gut-associated lymphoid tissue", que es componente del sistema inmune de la mucosa constituido por Placas de Peyer y linfocitos intraepiteliales. Este sistema mantiene a los antígenos fuera del organismo, a diferencia de otros componentes del sistema inmune que precisan eliminar a los antígenos activamente, a través de un proceso que implica inflamación y cierto grado de daño tisular (Stokes y cols, 2000). Además, promueve la tolerancia inmunológica a antígenos presentes en los alimentos y a cerca de 400 especies de flora microbiótica autóctona Stokes (1996) en Guedes y Franca, 2007). Sólo una vez que los microorganismos (o sus toxinas) se han adherido a las células epiteliales y pueden entrar a través del epitelio van a causar la enfermedad. Por lo que el mantenimiento de la integridad de la superficie epitelial es un proceso crítico en la prevención de las infecciones (Stokes y cols, 2000).

El GALT agrupa al mayor número de células secretoras de inmunoglobulinas (Ig) del organismo, y en su mayor parte secretora de Ig A, que son capaces de activar al complemento, y están en condiciones de cumplir con la función de mantener fuera a los microorganismos patógenos. En particular, otros isotipos de inmunoglobulinas (Ig G), los linfocitos citotóxicos y las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado están implicados en la recuperación de infecciones de la mucosa en los cerdos (Stokes y cols, 2000).

Para entender mejor al GALT, debemos dividirlo en una zona inductora y una efectora del sistema inmune. Los sitios inductores primarios están presentes en la pared intestinal como GALT organizado que son las Placas de Peyer. Los principales sitios efectores de la respuesta inmune corresponden a los presentes en la lámina propia y a los linfocitos intraepiteliales o GALT difuso. Los linfocitos B y T maduros, luego de ser inducidos en las Placas de Peyer, migran a la lámina propia, que

representa un grupo grande y heterogéneo de células linfoides y mieloides, compuesta por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, entre otras. Los linfocitos intraepiteliales, presentes en el intestino, se desenvuelven independientemente de las Placas de Peyer. Son una población celular homogénea, compuesta en su gran parte por células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup> / CD8<sup>-</sup>. Algunas de estas células se distinguen por presentar receptores,  $\gamma$  y  $\delta$  (Neutra, 1996 en Guedes y Franca, 2007).

Lo que se denomina el GALT difuso está constituido por linfocitos y otras células del sistema inmunológico presentes en la lámina propia y por los linfocitos intraepiteliales de tipo CD2. Células maduras intraepiteliales producen IL-2 e interferón y presentan citotoxicidad. En los cerdos las células T son mayoritarias en las vellosidades. En las criptas, se encuentra el mayor número de células B, productoras de Ig (Stokes y cols, 2000). Se sabe que el 90% de los plasmocitos presentes en la lámina propia del cerdo adulto producen Ig A e Ig M, pero también hay Ig G (Neutra, 1996 en Guedes y Franca, 2007; Stokes y cols, 2000). Los linfocitos de la lámina propia son, predominantemente, del fenotipo CMH II, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y expresan receptores  $\alpha/\beta$  de las células T. Estas células son coadyuvantes importantes en la respuesta mediada por Ac, y también pueden modular la acción de otras células como macrófagos, neutrófilos y mastocitos (Neutra, 1996 en Guedes y Franca, 2007). Los linfocitos intraepiteliales están localizados entre los enterocitos y pueden representar el 30% de las células presentes en el epitelio intestinal. La mayoría de esas células del complejo CMH clase II presentan un fenotipo citotóxico especialmente las CD4<sup>-</sup> y CD8<sup>+</sup> y expresan receptores  $\alpha/\beta$  y en menor proporción expresan receptores  $\gamma$  y  $\delta$ . En la mucosa intestinal, esas células pueden funcionar como primera línea de defensa contra patógenos invasores, promover el crecimiento y diferenciación de células vecinas T  $\alpha/\beta$  y destruir células infectadas por virus (Thome, 1994 en Guedes y Franca, 2007). Hay una clara separación espacial entre las células CD8 que están bajo el epitelio y las células CD4 que están en la profundidad de la lámina propia en los plexos capilares (Stokes y cols, 2000).

Se presentan nódulos linfáticos independientes presentes dispersos por todo el intestino, miden aproximadamente 0,6 a 3 mm de diámetro (Romanini, 2001). Cuando se agrupan los nódulos linfáticos constituyen las Placas de Peyer las cuales se distribuyen a lo largo de todo el intestino, siendo más característica su presentación en el íleon (Stokes y cols, 2000). Este GALT organizado está compuesto por las Placas de Peyer y los folículos linfoides independientes (Neutra, 1996 en Guedes y Franca, 2007). Las Placas de Peyer están compuestas principalmente por un centro germinal activo, con células B en estado mitótico, o de reposo, precursores de células plasmáticas (Romanini, 2001), recubierto por epitelio cúbico especializado, denominados folículos asociados al epitelio; una región subepitelial, SED del inglés "subepitelial dome", localizada entre los folículos asociados al epitelio y los folículos linfoides, y una región interfolicular, con vénulas y linfáticos aferentes (Stokes y cols, 2000). Del 20 al 30 % de los enterocitos del Folículos asociados al epitelio, corresponden a las células M, células epiteliales especializadas, derivadas de los enterocitos de las criptas (Neutra, 1996 en Guedes y Franca, 2007), con expresión del CMH clase II de lucha y con morfología característica de las células dendríticas (Stokes y cols, 2000), cuya función será descrita en el punto 1.9- correspondiente a la patogenia. Además, constituyendo el Folículos asociados al epitelio se encuentran linfocitos T CD4+ y CD8+ y macrófagos. Por el área interfolicular circulan los linfocitos para penetrar en el parénquima de la Placas de Peyer (Romanini, 2001).

La túnica muscular se compone de dos capas de tejido muscular liso, la circular interior y la externa longitudinal. Y por último se encuentra la túnica serosa, constituida de tejido conectivo laxo revestido de mesotelio del peritoneo visceral (Stinson y Lois Calhoun, 1976).

#### 1.7.1- Modulación de la respuesta inmune en la mucosa intestinal

Los antígenos transitan a través de las células M y exponen a las células presentadoras de Ag (células dendríticas o macrófagos) y linfocitos (células B y T

auxiliares), localizados entre la base de la región epitelial y los folículos de la PP (Neutra, 1996 en Guedes y Franca, 2007). La comunicación cruzada entre linfocitos y células epiteliales, así como la liberación de citoquinas por esas células, regula la diferenciación de células B y la producción de Ig A. Inicialmente linfocitos B Ig M+/ Ig D+ inactivos, presentes en la base entre el epitelio y los folículos linfoides, son activados por Ag, citoquinas y lipopolisacáridos. Entonces estos linfocitos se diferencian en plasmocitos que expresan Ig en su superficie. Un Ag se liga a esas Ig y son neutralizados (Stokes, 1994 en Guedes y Franca, 2007).

La IgA está bien adaptada para la defensa de la mucosa del tracto gastrointestinal: es resistente a la proteólisis por enzimas digestivas, es un activador del sistema del complemento, puede inhibir la adhesión bacteriana, neutralizar enterotoxinas y virus presentes en la luz, intensificar mecanismos de defensa inespecíficos y citotoxicidad dependiente de Ac (Abbas y Lichtman, 2005 en Guedes y Franca, 2007). La inmunidad inducida por el GALT, puede ser transferida a otras superficies mucosas. Este proceso es posible a través de la expresión de moléculas de adhesión específicas en las vénulas (Neutra, 1996 en Guedes y Franca, 2007). Se sabe que células productoras de IgA de la glándula mamaria son derivadas de precursores que fueron estimulados en intestino por patógenos entéricos. Así la inmunidad pasiva puede ser transmitida a la cría a través del calostro (Butter y Brown, 1994 en Guedes y Franca, 2007).

Además de linfocitos B, la lámina propia presenta subgrupos de linfocitos T, los linfocitos T auxiliares Th1 y Th2 y linfocitos T citotóxicos. Células presentadoras de Ag interactúan con células CD4<sup>+</sup> en LP para originar subpoblaciones de células efectoras que cumplen diferentes tipos de reacciones inmunológicas (Stokes, 1994 en Guedes y Franca, 2007).

Los patógenos intracelulares o microorganismos encapsulados estimulan respuestas Th1 que son caracterizadas por predominio secretor IL-2, INF-  $\gamma$ , factor de necrosis tumoral-  $\beta$  y productos de macrófagos. Las reacciones Th1 son típicamente

respuestas inmunes mediadas por células que activan células B, T y macrófagos (Stokes y cols, 2000).

En la figura 1 se expresa como se realiza la captación, presentación, reconocimiento y diseminación del Ag en la mucosa intestinal en el modelo ratón (Mowat, 2003).

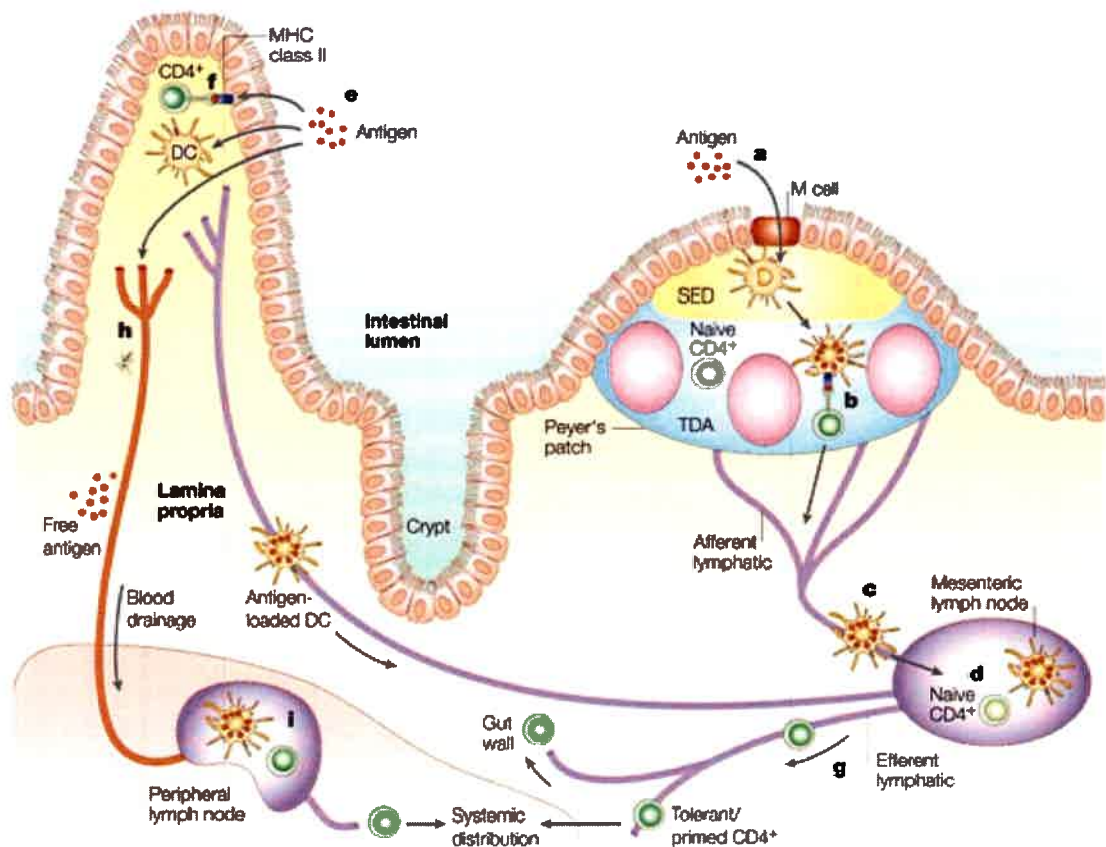


Figura 1- El antígeno puede entrar a través de las células M del epitelio asociado al folículo (a), y después se produce la transferencia a las células dendríticas locales (CD), o podría ser presentada directamente a las células T en la placa de Peyer (b). Alternativamente, el antígeno o el antígeno-unido a las CD desde la placa de Peyer podrían tener acceso directo al drenaje linfático (c), con reconocimiento posterior de las células T en los nódulos linfáticos mesentéricos (d). Un proceso similar del antígeno o de células presentadoras de antígeno podría ocurrir si el antígeno difunde al nódulo linfático mesentérico, tras entrar a través del epitelio que recubre la vellosidad (e), pero en este caso, existe la posibilidad, además, de que CMH de clase II + enterocitos pueda actuar como células presentadoras de antígeno local (f). En todos los casos, el antígeno CD4 sensible+ células T adquieren la expresión de la integrina  $\alpha 4$  7 y el receptor de quimioquinas CCR9, deja el nódulo linfático mesentérico por los vasos eferentes (g) y después de entrar en el torrente sanguíneo a través del conducto torácico, sale a la mucosa a través de los vasos en la lámina propia. Las células T que han reconocido antígeno primero en el nódulo linfático mesentérico también podrían difundirlo por la



circulación sanguínea a todo el sistema inmune periférico. El antígeno también podría tener acceso directo al torrente sanguíneo desde el intestino (h) e interactuar con las células T en los tejidos linfoides periféricos (i) (Mowat, 2003).

### **1.8- Tropismo y ubicación del agente**

*Lawsonia intracellularis* infecta los enterocitos inmaduros de las criptas de Lieberkühn a nivel de la última porción del íleon e inicio del intestino grueso (McOris y cols, 1992; Smith y Lawson, 2001; McOrist y cols, 2007). La infección induce hiperplasia de enterocitos inmaduros, que como parte de un mecanismo de autoregulación muchas de las células mueren liberando las bacterias intracelulares. Dichas bacterias pueden infectar a otros enterocitos próximos o ser liberadas por materia fecal. Estas células provocan un engrosamiento considerable de las paredes intestinales con una marcada disminución de las células caliciformes. Como consecuencia de ello, el intestino pierde su capacidad de absorción, lo que conduce a diarrea. Además, hay pérdida de proteínas en la forma aguda. Originándose una respuesta inflamatoria grave que alcanza a la lámina propia y a la submucosa, sale sangre hacia la luz intestinal (Carvajal y cols, 2005a). En los animales que sobreviven a este mecanismo de acción patógena hay regeneración de las zonas lesionadas con eliminación de bacterias (Jensen y cols, 2006).

En cuanto a la extensión de las lesiones, pueden presentarse desde el íleon hasta el colon, pero generalmente están en la porción terminal del íleon (McOrist y cols, 1993). En otro trabajo posterior, este mismo autor indica que las lesiones de Enteropatía Proliferativa Porcina crónica y subclínica ocurren más comúnmente en los últimos 50 centímetros del intestino delgado y en el tercio superior del colon proximal incluyendo al ciego. Para McOrist y cols (2006a), el íleon debe ser examinado a 10 centímetros por delante de la válvula íleo-cecal (orificio ileal) como sitio más probable de infección.

El antígeno bacteriano fue identificado fundamentalmente en el intestino. La infección por *Li* se presenta en los enterocitos, sin embargo el antígeno ha sido

detectado en la lámina propia y en los ganglios linfáticos mesentéricos, pudiendo ser transportado a esos lugares por los macrófagos (Gebhart y McOrist, 2005). La bacteria infecta primero al intestino delgado y desde allí coloniza niveles inferiores del intestino. La colonización de los enterocitos del intestino grueso y recto se produce en etapas tardías de la infección por *Li* (Gebhart y McOrist, 2005).

Jensen y cols, 2000 en Smith y Lawson (2001) han descrito, en un caso de EPH, que las *Li* aparecen libres en los macrófagos de la lámina propia y de la submucosa, como así también en las tonsilas y dentro de los capilares y vasos linfáticos del intestino. Las tonsilas no parecen tener protagonismo en la patogenia, asimismo se pudo identificar antígeno de *Li* en el citoplasma de las células de la cripta tonsilar (Gebhart y McOrist, 2005). Algunos autores han identificado *Li* en las criptas de las tonsilas en las fases iniciales de la infección oral, aunque esto no pudo relacionarse con el desarrollo de la enfermedad a nivel intestinal por lo que esta situación requiere de más estudio (Smith y Lawson, 2001). La identificación de *Li* en linfonódulos mesentéricos, relacionado con la propagación de la bacteria al mismo, solo ha sido descrita en cerdos y en hurones; además, en estos últimos se han visto bacterias curvas en el interior de las células epiteliales del hígado (Smith y Lawson, 2001).

### **1.9- Patogenia de la Enteropatía Proliferativa Porcina**

Poco se conoce sobre los eventos que tienen lugar en los primeros 5 días de infección, que resultan en la colonización de las células criptales (Smith y Lawson, 2001). La bacteria se asocia a la membrana celular a través de receptores específicos en los enterocitos y es posible que la motilidad y los flagelos sean importantes protagonistas en la asociación inicial con estos receptores, como ocurre con otros microorganismos morfológicamente similares (Lawson y Gebhart, 2000; Smith y Lawson, 2001; Roof y cols, 2008). La entrada de la bacteria dentro de la célula parece

depender del citoesqueleto de la propia célula, este mecanismo sería un tipo de fagocitosis inducida (Lawson y cols, 1993; Smith y Lawson, 2001).

Una vez adherida al enterocito, la bacteria entra a la célula madre de la cripta, y se forma una vacuola endocítica, la cual se rompe a las 3 horas pos-infección (Lawson y cols, 1995). Una vez dentro, la bacteria se multiplica libremente en el citoplasma, preferentemente en el polo apical y cerca de las mitocondrias (Lawson y Gebhart, 2000; Rodríguez y cols, 2004; McOrist y cols, 2005; Smith y Lawson, 2001). Estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado la interacción bacteria-célula (McOrist y cols, 1996). Adhesivos específicos, ligandos o receptores, aún no han sido identificados, pero se sabe que la unión puede evitarse con anticuerpos (Smith y Lawson, 2001; Roof y cols, 2008).

Como ya se mencionó poco se conoce sobre los estadios iniciales de la patogenia de *Li*, recientemente (Boutrup y cols, 2010) se ha realizado un trabajo en cerdos inoculados experimentalmente y sacrificados 12 horas post-infección y a los 5 días post-inoculación. La bacteria fue localizada a través de técnicas de inmunohistoquímica y de hibridación *in-situ*. A las 12 hs. post-inoculación la bacteria fue encontrada en las células epiteliales de la punta de la vellosidad, indicando infección en una amplia gama de células incluyendo enterocitos maduros y diferenciados. Además, en forma temprana también se observó la invasión del tejido conectivo de la lámina propia por unas pocas bacterias, y posterior se extendió la invasión hasta el día 5 post-inoculación, sugiriendo el rol activo de la lámina propia en el curso de la infección.

A los 6 días, los enterocitos muestran proyecciones globosas que, al romperse, liberan bacterias que colonizan otros enterocitos o se eliminan por heces. Este mecanismo de escape de la vacuola al citoplasma y la inhibición de la formación del fagolisosoma son mecanismos adaptativos que se observan también en otras especies de bacterias intracelulares, tales como: *Shigella*, *Listeria*, *Rickettsia spp.* y *piliforme*, *Clostridium*.

La mitosis de los enterocitos infectados mantiene la infección al transmitir la bacteria a las células hijas (Lawson y Gebhart, 2000). Estas células inmaduras por las que *Li* tiene tropismo, beneficiará al agente por lo menos de dos formas: por un lado al dividirse permiten la proliferación bacteriana y al migrar desde la base de la cripta hasta el epitelio de revestimiento permiten la propagación a todo el epitelio (Lawson y cols, 1993). En estudios *in vitro*, se describe un mecanismo similar, las células infectadas inicialmente se continúan dividiendo y pronto se forma un grupo de células adyacentes infectadas (Lawson y cols, 1993). Esto demuestra una adaptación muy especializada de este agente (Smith y Lawson, 2001). Además, algunos autores afirman que las células que se dividen activamente potencian la capacidad de replicación de la bacteria (Roof y cols, 2008). Asimismo, existen fuerte evidencias que indican que la infección por *Li* aumenta la tasa de división celular, situación que favorece la diseminación de la bacteria (Roof y cols, 2008).

En trabajos realizados en hámsters se observó que la tasa de división celular aumenta hasta 4 veces en las células de las criptas en poco menos de 2 días después de la infección bacteriana. El aumento de la tasa de mitosis de células infectadas es hasta tres veces mayor que la observada en las células de la mucosa normal (Smith y Lawson, 2001).

Diez días después de la inoculación experimental en hámsters, el número de bacterias intracelulares se incrementa y la hiperplasia celular se hace evidente. La fase hiperplásica comienza con elongación de las vellosidades y una proliferación del epitelio de la cripta desde la base de la mucosa a la vellosidad. Alrededor del día 15 a 20 la vellosidad afectada es 2 a 3 veces más larga que lo normal, deformada y enteramente compuesta por epitelio hiperplásico (Lawson y Gebhart, 2000).

El efecto estimulador de las bacterias en la división celular no persiste una vez que la lesión esta plenamente desarrollada, a pesar de presencia de organismos intracelulares (Smith y Lawson, 2001). Si bien, bacterias morfológicamente similares se

observan en la luz de la glándula, comúnmente son antigénicamente diferentes a *Li* (McOrist y cols, 1989; Smith y Lawson, 2001).

La flora intestinal parecería influir en el desarrollo de la enfermedad (Smith y Lawson, 2001). Algunos estudios sugieren firmemente que la flora bacteriana intestinal modifica o promueve la capacidad de *Li* para colonizar el tracto intestinal y que, sin la presencia de estas bacterias comensales, la infección no podría reproducirse (McOrist y cols, 1993; McOrist y cols, 2006c). En otras infecciones intestinales de los cerdos pueden encontrarse similitudes, por ejemplo con *Brachyspira hyodysenteriae*. Sin embargo, todavía no se conoce cuál es el rol de las bacterias comensales en la infección de *Li* (Smith y Lawson, 2001; Rodriguez y cols, 2004).

Algunos cambios en la dieta o en la forma de presentación del alimento pueden alterar el equilibrio ecológico de la flora intestinal o cambiar las condiciones ambientales en el intestino, que pueden favorecer la proliferación y colonización por algunas bacterias patógenas (Jacobson y cols, 2003).

Las células M "microfold", como se denominan en inglés, pueden estar involucradas en la patogenia, ya que en las etapas iniciales de la infección aparecen en mayor número en las Placas de Peyer del intestino (Gebhart y McOrist, 2005). Las células M son células epiteliales especializadas, derivadas de los enterocitos de las criptas que recubren las Placas de Peyer. Estudios han demostrado que las células M son muy eficientes en capturar macromoléculas y partículas, inclusive Ig presentes en la luz intestinal, transportarlas hacia las áreas foliculares, sitio donde ocurre el procesamiento antigénico. Sustancias y microorganismos, que se adhieren selectivamente o no a la superficie de las células M, pueden ser fagocitadas o transportadas de forma rápida y eficiente (McOrist y cols, 1993; Guedes y Franca, 2007).

No se conocen aún los mecanismos bioquímicos por los cuales *Li* induce un aumento de la tasa de mitosis en los enterocitos, fallas en la maduración celular y cambios en el patrón celular. Esta proliferación celular, característica principal de la

Enteritis Proliferativa Porcina, no ha sido reproducida *in vitro*, y la mayoría de los estudios realizados sobre la patogenia se han realizado *in vivo* (Jacobson y cols, 2003).

Por tal motivo, hay diferentes afirmaciones al respecto:

- ✓ La aparición de la hiperplasia esta asociada al aumento de *Li* en el interior de los enterocitos. Mientras que, la remisión de las lesiones aparece estrechamente ligada a la desaparición de las bacterias, lo que indica la correlación entre ambos hechos (Mc Orist y cols, 1996). El mecanismo mediante el cual *Li* provoca la hiperplasia se desconoce. Tanto *in vivo* como *in vitro* no se observan otros efectos citopáticos en los enterocitos infectados. Pero *in vivo*, los enterocitos hiperplásicos muestran una escasa expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH de clase II), y esta pérdida de la función de presentación del antígeno podría ofrecer a la bacteria un entorno seguro donde crecer sin la interferencia del sistema inmunitario (Mc Orist y cols, 1992; Mc Orist y cols, 1995).
- ✓ La reducción temporal de la apoptosis propiciada por la infección de *Li* puede actuar como uno de los mecanismos implicados en la proliferación de los enterocitos (Mc Orist y cols, 1996; Gebhart y McOrist, 2005). En contrario, Riganti y cols (1999), han demostrado a través de IHQ en las criptas hiperplásicas el aumento del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), proteína que actúa como cofactor de la enzima ADN polimerasa asociada al ciclo celular. La marcada expresión de PCNA en las células de las criptas que llegan hasta la vellosidad estaría indicando una alteración en los mecanismos que regulan la proliferación y recambio epitelial normal. En función de los resultados en la expresión de los antígenos de apoptosis, la infección por *Li*, no inhibiría este mecanismo, aunque estos autores indican que más estudios se deberían realizar para aclararlo.
- ✓ También se relaciona la ausencia de la *Li*, con el reinicio de la apoptosis y el aumento de las células epiteliales normales en las lesiones en recuperación

(McOrist y cols, 1996). Otro estudio ha revelado el aumento de la apoptosis en las criptas hiperplásicas y las microvellosidades de los cerdos afectados por la enteropatía proliferativa de aparición natural. Se encontraron criptas hiperplásicas en el íleon, presumiblemente infectados por *Li*, con muchas células en apoptóticas, detectadas por tinción de inmunohistoquímica con caspasa-3. Por lo que, aparentemente, la proliferación celular característica de la EPP, no tiene su origen en la reducción de la apoptosis (Gebhart y McOrist, 2005).

### **1.10- Curso de la enfermedad**

Según Gebhart y Guedes (2001) el período de incubación es de 7-14 días, entonces aparecen las primeras lesiones en el íleon terminal. La eliminación por materia fecal de *Li* comienza entre los 7 y 10 días post inoculación y se mantiene durante 2 a 4 semanas, aunque en algunos animales puede continuar la eliminación en forma intermitentemente hasta la semana 12 post infección. En general los animales seroconvierten alrededor de los 14 días post infección (Guedes y cols, 2002b). El pico de la enfermedad es a los 21 días post inoculación. Los signos clínicos decrecen y las lesiones proliferativas se resuelven a los 28 días, resultando en una demora de por lo menos dos semanas para lograr el peso de faena. La eliminación de *Li* por materia fecal y la seropositividad cesan en algún punto después de la resolución de las lesiones. La información que existe sobre la forma aguda es escasa, tiene un período de incubación similar, pero con signos clínicos agudos (Gebhart y Guedes, 2001; Gebhart y McOrist, 2005; Guedes, 2004).

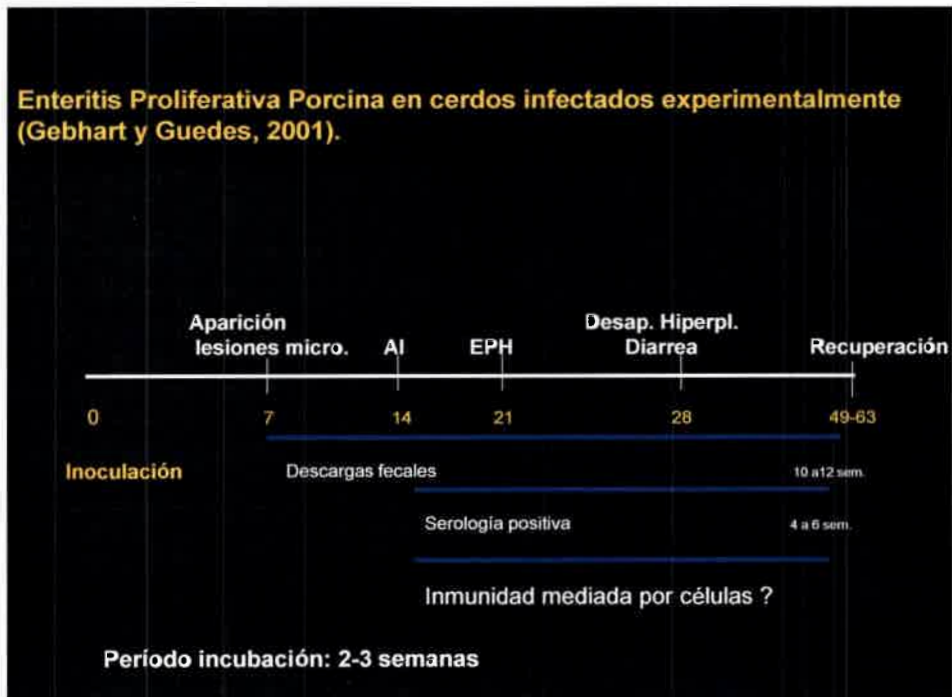
No se conoce el momento en que los cerdos toman contacto a campo con *Li*, esto depende del estado inmunitario de las madres, como consecuencia de que los anticuerpos (Ac) calostrales comienzan a desaparecer, pero generalmente ocurre entre las 8 y 12 semanas de vida (Carvajal y cols, 2005b).

En estudios experimentales en cerdos inoculados, se detectaron las lesiones macroscópicas y lesiones microscópicas como hiperplasia de enterocitos y reducción de las células caliciformes 11 días después de la infección. El antígeno de *Li* se detectó por primera vez en el intestino, mediante Inmunohistoquímica (IHQ), 5 días después de la inoculación. El día 29 se observó tinción positiva, pero no lesiones macroscópicas o microscópicas. Los cerdos sacrificados 35 días después de la inoculación no presentaban lesiones y dieron resultados negativos en la IHQ. Sin embargo, dieron positivo a la técnica de PCR el día 35, lo que demuestra que a pesar de no detectarse la bacteria por inmunohistoquímica, en algunos fragmentos del intestino aún había sitios de infección (Gebhart y McOrist, 2005).

En un estudio realizado en Dinamarca, en 2004, sobre un total de 100 cerdos pertenecientes a 5 granjas, se evaluó la dinámica de infección por *Li* desde el destete, aproximadamente a las 4 semanas de edad, hasta la fecha de faena. Las técnicas utilizadas fueron PCR de tiempo real, para evaluar descargas fecales, e inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar seroconversión. El objetivo era detectar momento de infección, duración de la infección y reinfección a *Li*, pero en ninguno de los animales se detectó a través de inmunoperoxidasa (IPX) de ileon la presencia del agente. La primera descarga fecal de *Li* se dio a las 4 semanas post destete (8 semanas de vida) y se mantuvo por alrededor de 6 semanas con un pico a las 8 semanas post destete. Después de las 14 semanas todos los cerdos se mantuvieron negativos hasta el final de la medición. En cuanto a la seroconversión, todos los cerdos tenían anticuerpos maternos y el primer incremento se detectó a las 6 semanas post destete, pero la mayoría seroconvirtió entre la semana 8 y 10 post destete. Todos los cerdos se mantuvieron seropositivos por el resto del estudio, presentando un desfase de 2 semanas entre la seroconversión y las descargas fecales (Steghe y cols, 2004).

En el siguiente cuadro se resume el curso de Enteropatía Proliferativa Porcina en cerdos infectados experimentalmente (Gebhart y Guedes, 2001).





AI: Adenomatosis Intestinal, EPH: Enteropatía Proliferativa Hemorrágica.

## 1.11- Respuesta inmunitaria específica frente a *Lawsonia intracellularis*

### 1.11.1- Inmunidad celular y humoral

Algunos patógenos consiguen escapar de los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del intestino, otros utilizan esos mecanismos en beneficio propio y algunos producen inmunosupresión en distinto grado, como es el caso de *Li*, donde se demostró una asociación directa entre la presencia de la bacteria y la reducción del número de linfocitos B y T en el tejido linfoide asociado al intestino (MacIntyre y cols, 2003). La ubicación intracelular de este agente lo excluye del proceso inmunológico, esto se manifiesta por la reducción de la expresión del MHC de clase II en los enterocitos infectados, en comparación con la expresión normal de las células epiteliales intestinales, como ya se mencionó en la patogenia de la enfermedad (McOrist y cols, 1992; Mc Orist y cols, 1995). Por lo tanto, la función de presentación antigénica, llevada a cabo por estas células de la mucosa, estaría disminuida. De esta manera *Li* modularía la respuesta inmune (Smith y Lawson, 2001).

Para entender la respuesta inmunitaria asociada a *Li*, es necesario tener en cuenta lo que ya analizamos en cuanto a la patogenia tan singular de este microorganismo. Recordemos, que la bacteria se encuentra asociada al intestino, porque la infección sólo se limita, por su tropismo, a las células inmaduras de las criptas y al no producir una infección o invasión generalizada, la respuesta humoral sistémica resulta poco intensa y de lento desarrollo, lo que explica la escasa actuación de la IgG en la respuesta humoral (Roof y cols, 2008). Es de esperar que los niveles séricos de IgG no participen directamente en la protección (Guedes y cols, 2002b). Cabe destacar que una de las características notables de los animales muertos en las primeras etapas de esta enfermedad es la escasa respuesta inflamatoria, pero con lesiones proliferativas plenamente desarrolladas (Rowland y Rowntree, 1972 en Smith y Lawson, 2001).

*Li* es un enteropatógeno que requiere de la unión mediada por un receptor y la posterior invasión de la célula, lo que induce la respuesta inmunitaria a escala local en la mucosa, generando la forma secretoria que bloquea o reduce futuras infecciones (Roof y cols, 2008).

La IHQ revela gran cantidad de IgA en el citoplasma apical de los enterocitos hiperplásicos (McOrist y cols, 1992; Gebhart y McOrist, 2005) y a los 22 días post exposición a cepas virulentas de *Li* se encontró IgA en lavados intestinales (Gebhart en Roof y cols, 2008). Los cerdos convalecientes, al ser inoculados una segunda vez tras el cese de las descargas fecales, no vuelven a presentar *Li* en las heces ni manifiestan signos clínicos.

Estas bacterias podrían haber sido neutralizadas, antes de su entrada y colonización de la mucosa por esta respuesta humoral local y, como patógeno intracelular estricto desencadena una respuesta celular crucial para eliminar las bacterias y las células infectadas; esto proporcionará además la memoria inmunitaria necesaria en futuros encuentros con el patógeno (Gebhart y Guedes, 2001; Oliveira, 2006; Roof y cols, 2008).

En 2010, Guedes y Gebhart pusieron en evidencia la respuesta inmune mediada por células y la producción de IgA específica local en la mucosa intestinal, contra *Li* en cerdos inoculados experimentalmente, con homogeneizado de mucosa intestinal de cerdos con EPP. Estudios futuros deberán analizar si esta respuesta inmunológica específica determina una protección a la infección por *Li*.

La mayoría de los cerdos con lesiones de Enteropatía Proliferativa Porcina presentan una respuesta humoral basada fundamentalmente en las IgM de corta duración, seguida por un pico de IgG a partir de los 14 días, aunque un alto porcentaje de animales lo presentan recién a los 21 días (Oliveira, 2006; Roof y cols, 2008). En algunas ocasiones, animales sin lesión macroscópica pueden ser encontrados como positivos, por lo que no se presenta una correlación entre la serología y el desarrollo de las lesiones. Algo similar se observó en cerdos adultos con EPH; donde los animales que venían evidentemente afectados no mostraron respuesta humoral hasta que aparecieron los signos clínicos, pero muchos cerdos seroconvirtieron sin mostrar signos de la enfermedad (Lawson y Gebhart, 2000). Esto puede deberse a que los cerdos en crecimiento de una piara pueden mostrar seroconversión a lo largo de un período de pobre crecimiento, pero los Ac persisten por algo menos de dos meses luego de la primera exposición y no parecen perpetuarse de por vida sin una re-exposición o potenciación posterior (Roof y cols, 2008). La respuesta de Ig G e Ig A es menos marcada que la de Ig M (McOrist y cols, 1992; Lawson y Gebhart, 2000; Oliveira, 2006).

La IgG se detecta por primera vez 2 semanas después de la exposición a un cultivo puro de *Li* en cerdos de 5 semanas de edad, alcanzando su máximo hacia el final de la tercera semana y comenzando a decaer gradualmente a partir de este punto hasta la semana 13 en que desaparece, dependiendo de la forma de la enfermedad y de la severidad (Knittel y cols, 1998; Lawson y Gebhart, 2000; Guedes, 2004; Oliveira, 2006). La IgG parece reducirse rápidamente a las 4- 8 semanas después de una afección leve a moderada de Adenomatosis Intestinal, pero podrían ser más elevadas y

persistir después de un cuadro agudo de EPP (Roof y cols, 2008), por lo que es probable que la IgG se comporte de distinta manera ante nuevas infecciones (Gebhart y Guedes, 2001; Oliveira, 2006).

Algunos autores sugieren que la exposición a *Li* en presencia de antibióticos puede evitar, reducir, o demorar la respuesta inmune humoral (Roof y cols, 2008).

La respuesta inmune celular es una característica particular de las infecciones por microorganismos intracelulares, pero es escaso lo que se conoce de ella al igual que sucede con la respuesta humoral (Guedes, 2004; Oliveira, 2006). El interferón gamma (INF- $\gamma$ ) es a menudo un componente esencial del sistema inmunitario para el control de infecciones por bacterias intracelulares y virus. Para evaluar su participación se inoculó a dos grupos de ratones con cepas naturales de *Li*. Los ratones con deficiencia de INF- $\gamma$  mostraron una mayor sensibilidad a la infección, presentaron un aumento paulatino de las criptas infectadas y sufrieron mortalidad asociada a *Li*. Se pudo determinar que el INF- $\gamma$  tiene múltiples posibles papeles en limitar y controlar la infección por *Li* al ejercer su efecto directo sobre las células epiteliales, por regular la inmunidad mediada por células o por una combinación de ambos mecanismos, lo que queda por dilucidar es cómo lo hace (Smith y cols, 2000; Guedes y Gebhart, 2010). Se detectó la producción del INF- $\gamma$  a partir de mucosas afectadas homogeneizadas 22 días después de la inoculación con cultivo puro de *Li* (Guedes y Gebhart 2001 en Guedes y Gebhart, 2003a).

En otro estudio se determinó que la respuesta inmunitaria celular inicial pudo percibirse entre 9-14 días después de la exposición a la vacuna y a la cepa patógena, presentando respuestas detectables el día 28, con niveles máximos en los dos grupos expuestos entre los días 42- 49. En ambos grupos se detectó la respuesta celular hasta 13 semanas después de la exposición (Guedes y Gebhart, 2003a).

La fagocitosis de *Li* por los macrófagos en las lesiones incipientes, probablemente desencadenan una respuesta inmunitaria celular de tipo Th1 en la lámina propia, además se describe una infiltración de macrófagos y linfocitos B

portadores de la estructura del CMH de clase II en las primeras fases de la respuesta inmunitaria (Gebhart y McOrist, 2005, MacIntyre y cols, 2003).

Para la forma aguda de la EPP se describe una respuesta inflamatoria aguda con la presencia de células B e IgM (Smith y Lawson, 2001). Muchos han demostrado la diferencia entre la baja proporción de mortalidad de Adenomatosis Intestinal y la mayor letalidad de Enteropatía Proliferativa Porcina a esta respuesta inmune (MacIntyre y cols, 2003) este autor determinó la respuesta celular en cerdos inoculados experimentalmente. Ya en el tercer día se identificaron las primeras lesiones y fueron caracterizadas por infiltrado neutrofílico en ausencia de hiperplasia. En el día 7 post inoculación los cerdos presentaron una evidente hiperplasia del epitelio criptal en asociación con un infiltrado neutrofílico dentro de las criptas. En el día 14, presentaron extensa hiperplasia de criptas y formación de abscesos criptales e intraepiteliales. En el día 21, la respuesta hiperplásica se estaba resolviendo con el regreso de las células caliciformes en las criptas profundas.

El curso de la recuperación de la morfología normal de las criptas pasa por una etapa de hiperplasia de células caliciformes e hipersecreción. El punto máximo de criptas infectadas, lesiones y cambios en la respuesta inmune se produce el día 14 post-infección. Este día en la lámina propia se observa una reducción significativa de la reacción positiva de las células CD3, al igual que las células CD3 intraepiteliales en la resolución de las lesiones en el día 42 post-infección, lo que sugiere un mecanismo "inmunosupresor" (MacIntyre y cols, 2003; Smith y Lawson, 2001).

#### 1.11.2- Inmunidad materna

El hecho de que la Enteropatía Proliferativa Porcina se desarrolla en una edad avanzada del ciclo de vida de los cerdos en engorde, hace suponer que la inmunidad materna se haya implicada en el control de las infecciones de *Li* durante la lactancia. Varios especialistas han señalado la presencia de anticuerpos específicos en el calostro de las cerdas lactantes y en el suero de los cerdos tras el destete. Pero el nivel

de Ac del suero disminuye rápidamente tras el destete, lo que avala la idea de una transferencia pasiva.

En un estudio realizado recientemente para evaluar los efectos de la inmunidad materna, los lechones nacidos de cerdas inmunizadas y los lechones de las cerdas no inmunizadas fueron comparados después de provocar una exposición al patógeno virulento. En este caso los cerdos nacidos de las hembras inmunizadas presentaron una incidencia significativamente menor de lesiones macroscópicas y microscópicas en el íleon y de lesiones microscópicas en el colon. Estos datos confirman el nivel de protección significativo que la inmunidad materna puede conferir frente a la Enteropatía Proliferativa Porcina a los lechones de las cerdas hiperinmunizadas. Debe señalarse que las cerdas del estudio fueron sometidas a una pauta de vacunación extrema para generar esta inmunidad y que la protección pasiva en los lechones se observó sólo hasta las 6 semanas de edad y cabe esperar que en condiciones reales ésta se reduzca de forma similar, lo que finalmente, en una etapa vital posterior, generaría cerdos sin protección inmunitaria y sensibles al patógeno (Roof y cols, 2008).

### **1.12- Características anatomopatológicas**

La forma crónica se reconoce a la necropsia porque los animales con diarrea moderada presentan: edema de mesenterio, la serosa presenta demarcación de los repliegues de la mucosa y la pared del íleon se ve engrosada con un diámetro global aumentado (Jones y cols, 1993a; Perfumo y cols, 1997).

Como ya se mencionó, la forma crónica está asociada a tres presentaciones macroscópicas bien diferenciadas, aunque todas las presentaciones se localizan en los últimos 50 cm del íleon, el ciego y el tercio proximal del colon (McOrist, 2006).

La forma de presentación más común, la Adenomatosis Intestinal, se caracteriza por presentar una marcada apariencia reticular de la superficie de la serosa y la mucosa que está húmeda pero no mucoide, con pliegues profundos, longitudinales y transversales por lo que se la denomina adenomatosis. Al corte se observa una

mucosa muy engrosada (McOrist y cols, 2007). A veces en casos más leves de la forma crónica las lesiones son pequeñas, de 5 a 10 cm y pueden pasar desapercibidas como zonas aisladas si no se abre todo el intestino (Guedes y cols, 2002a; McOrist y cols, 2007). Las lesiones en el intestino grueso son similares y pueden aparecer extendidas o en forma de placas o pólipos separados por mucosa sana (Smith y Lawson, 2001; McOrist y cols, 2007).

Las demás presentaciones que forman parte de este complejo, tanto en la forma aguda como en la crónica, son cambios adicionales que se superponen a la lesión inicial (Arenas y cols, 2005; McOrist y cols, 2007).

Por su parte, la Enteritis Necrotizante está originada por la necrosis coagulativa de las lesiones de la AI, como consecuencia de infecciones bacterianas secundarias o injurias posteriores (Lawson y Gebhart, 2000; Carvajal y cols, 2005b; Arenas y cols, 2005) con una marcada exudación fibrinosa superficial. Por lo que se encuentra la lesión inicial de AI complicada con exudado fibrinonecrótico de color amarillo-grisáceo estrechamente adherido a la mucosa engrosada, a veces con partículas de pienso (McOrist y cols, 2007).

Anteriormente se menciona que, las lesiones de las criptas remiten con rapidez, tan pronto como las bacterias intracelulares son eliminadas de las células intestinales, de allí se deduce que las lesiones pueden ser transitorias en muchos de los cerdos afectados. Pese a este hecho, los cerdos afectados por la Enteritis Necrótica pueden sufrir lesiones persistentes, lo que se evidencia a través de los intestinos engrosados que presentan estos animales a la edad normal de sacrificio (McOrist y cols, 1996).

La tercera forma, la Ileítis Regional, es la más típica y característica pero también la menos común, se observa el último tramo del intestino delgado contraído, liso y rígido. Cuando se abre la luz intestinal, puede verse disminuida de tamaño debido al engrosamiento de la pared que puede llegar a superar los 0.5 cm. Hay ulceraciones lineales vecinas a zonas de mucosa normal (McOrist y cols, 2007). El

tejido de granulación puede ser prominente, pero el rasgo más llamativo es la hipertrofia de las capas musculares externas (McOrist y Gebhart, 1999; Carvajal y cols, 2005b). En general se da en animales que han sobrevivido a episodios de Enteritis Necrótica (Lawson y cols, 2000; Carvajal y cols, 2005b). A la necropsia es frecuente encontrar animales en vías de recuperación, por lo que se ve limitado el valor diagnóstico de la inspección macroscópica post-mortem (Arenas y cols, 2005).

La lesión asociada a la EPH es una enteropatía hemorrágica aguda; donde particularmente el íleon terminal y menos frecuentemente el colon, aparecen distendidos y con el diámetro engrosado, con presencia de un exudado fibrino-hemorrágico, presencia de coágulos que ocupan la luz del intestino, sin que se observen úlceras y a veces con edema subseroso (Lawson y Gebhart, 2000; MacIntyre y cols, 2003; McOrist y cols, 2007).

El recto contiene heces negras, alquitranadas, mezcladas con alimento digerido. El motivo por el cual se produce la diarrea hemorrágica se desconoce, pero se ha observado en cerdos sometidos a estrés agudo que presentaron degeneración y descamación extensa de células epiteliales y filtraciones del lecho capilar (Rowland y Lawson, 1992).

La EPP se ha reproducido en cerdos adultos tratados con antibióticos durante periodos prolongados después del destete, tratamiento que impidió la exposición o el desarrollo de inmunidad frente a la ileítis. Tras retirar el tratamiento antibiótico, la exposición repentina a una dosis relativamente elevada del patógeno propició la aparición del cuadro. La patogenia de esta lesión no ha sido dilucidada totalmente, pero podría ser el reflejo de una alteración local anómala de las aminas vasoactivas, como la producción del TNF $\alpha$  (McOrist y cols, 2007).

### **1.13- Características histopatológicas**

Tanto la forma crónica AI, como la aguda EPP, tienen un rasgo histológico típico, que es la proliferación de las células epiteliales intestinales con la presencia de



muchas bacterias curvas intracelulares dentro de las células proliferadas las cuales solo se hacen evidentes con tinciones especiales de sales de plata (Lawson y Gebhart, 2000; Gebhart y Guedes, 2001). Se describe que la arquitectura normal de la vellosidad se pierde (atrofia de vellosidades) y que la mucosa se compone por criptas agrandadas y ramificaciones tapizadas por células epiteliales inmaduras y por pocas o casi ninguna célula caliciforme (Lawson y Gebhart, 2000; MacIntyre y cols, 2003; Huerta y cols, 2003; Guedes y Gebhart, 2003b; Rodríguez y cols, 2004; Arenas y cols, 2005). Las células que recubren las glándulas hiperplásicas se hacen en la pared y se observan dos tipos de núcleos basales, los vesiculares de coloración basofílica oscura y otros con forma de huso (Smith y Lawson, 2001). Son muy evidentes y numerosas las figuras mitóticas que se ven en las criptas (McOrist y cols, 1993; Lawson y cols, 2000; MacIntyre y cols, 2003; Huerta y cols, 2003; McOrist, 2006;). Comparando con las criptas normales, las criptas afectadas contienen a menudo de 5 a 10 capas celulares densas (McOrist y cols, 1993; McOrist, 2006).

En la lámina propia se observa un predominio de células mononucleares (Rodríguez y cols, 2004), incluyendo un gran número de histiocitos comúnmente positivos al antígeno de Li. Además hay necrosis de los folículos linfoides en las placas de Peyer y un elevado número de histiocitos positivos al antígeno de Li. En estudios realizados por Jensen y cols, (2006) encontró en dos animales, en la zona interfolicular células gigantes multinucleadas positivas al antígeno de *Li* en placa de Peyer y en dos casos con enterocolitis crónica la *Li* fue detectada solo en los histiocitos.

Las lesiones tempranas y la forma crónica de AI presentan poco infiltrado inflamatorio o aspecto normal en el caso que no se presenten complicaciones, esta es una característica marcada de la enfermedad (Lawson y Gebhart, 2000; MacIntyre y cols, 2003; McOrist y cols, 2007). En cambio, las lesiones más avanzadas pueden mostrar en la lámina propia un infiltrado mononuclear, principalmente CD8 (McOrist y cols, 1992).

En la Enteritis Necrotizante, además, se presenta una necrosis coagulativa claramente definida, con depósitos de fibrina y células inflamatorias con cambios degenerativos (MacIntyre y cols, 2003) que se extiende en profundidad en la lámina propia, en caso de que solo involucre el ápice de la vellosidad debe considerarse una lesión inespecífica (Rodríguez y cols, 2004).

En la Ileítis Regional, hay una infiltración de tejido de granulación y una hipertrofia muscular (MacIntyre y cols, 2003; Rodríguez y cols, 2004; McOrist y cols, 2007).

En la Enteritis Proliferativa Porcina, se observa una marcada degeneración del epitelio proliferado, cubierto por membranas de fibrina, debajo de las cuales queda atrapada la sangre fresca (MacIntyre y cols, 2003) y en la luz de las criptas afectadas se observa acumulo de restos celulares con bacterias (Arenas y cols, 2005).

Algunas veces, además, se encuentran bacterias en los macrófagos de la lámina propia y submucosa y en el epitelio capilar y linfático. Los capilares de la mucosa presentan también congestión y áreas hemorrágicas, sin lesiones específicas en la pared vascular (McOrist y cols, 2007). Una respuesta inflamatoria aguda es evidente en contraste con la Adenomatosis Intestinal (MacIntyre y cols, 2003).

#### **1.14- Regeneración del tejido intestinal**

Poco se sabe de los mecanismos que participan en la eliminación de la infección de células basales en una cripta infectada del intestino.

En la forma no complicada de la Adenomatosis Intestinal, la desaparición de las bacterias está asociada a la resolución de las lesiones como la hiperplasia, al parecer la resolución de las lesiones está estrechamente relacionada con la desaparición de los microorganismos intracelulares, lo que indica una estrecha asociación entre los dos eventos (Lawson y Gebhart, 2000; Smith y Lawson, 2001). Las células normales se regeneran desde la base de la cripta y la multiplicación epitelial reforma la estructura de la cripta hasta la normalidad. La regeneración se caracteriza por la degeneración de las

células epiteliales afectadas, la apoptosis de los macrófagos y la reaparición de las células caliciformes (Smith y Lawson, 2001; MacIntyre y cols, 2003; McOrist y cols, 2007).

### **1.15- Formas de diagnóstico de *Lawsonia intracellularis***

#### **1.15.1- Diagnóstico Ante mortem**

El cuadro clínico es insuficiente para el diagnóstico de EPP, es más común la forma crónica que se caracteriza por la dramática variación en la ganancia de peso entre cerdos de la misma edad. La forma aguda puede, en cambio, orientar mejor el diagnóstico, salvo cuando los cerdos mueren de forma brusca sin manifestar signos clínicos. Por lo que el diagnóstico de certeza debe ser laboratorial, pudiendo ser directo o indirecto (Roberts y cols, 1980; Lawson y Gebhart, 2000; Carvajal y cols, 2005b; McOrist y cols, 2007).

La respuesta humoral desarrollada por los cerdos frente a esta bacteria es débil y de corta duración (4-6 semanas) como ya se ha dicho, por lo que el diagnóstico serológico resulta bastante difícil (Huerta y cols, 2003; Rodríguez y cols, 2004; Arenas y cols, 2005). Su inconveniente radica en el hecho de que sólo indican la exposición al agente patógeno *Li* y no permiten saber si el cerdo seropositivo sufre en esos momentos una infección aguda o se trata de un contacto previo (Lawson y Gebhart, 2000), tampoco indica la susceptibilidad a la enfermedad o si esta eliminando la bacteria (Valdez y cols, 2002).

Además, los ensayos serológicos disponibles en la actualidad no permiten distinguir los anticuerpos generados por la administración de la vacuna de los generados por la exposición natural. Durante el proceso de inmunización, la vacuna estimula la respuesta humoral y celular a partir de las 5 semanas, a veces en valores poco detectables, aunque con capacidad protectora. Estas repuestas siguieron detectables 13 semanas después de la vacunación (Guedes y Gebhart, 2003a; Ohlinger, 2008).

La IFI y la IPX tienen el inconveniente de que se necesitan células infectadas, si bien tienen alta sensibilidad a veces tienen baja especificidad, siendo difíciles de reproducir y repetir, dependen de una interpretación subjetiva y son caras considerando el tiempo que requieren (Guedes y cols, 2002a; Carvajal y cols, 2005a). Knittel y cols (1998) al comparar un test serológico y la detección del DNA de *Li* por PCR, revelaron una mayor sensibilidad del mismo en comparación con la PCR, ya que no todos los animales infectados por *Li* eliminan en forma constante el microorganismo por las heces. La prueba serológica IPMA ha demostrado una especificidad del 100% y una sensibilidad del 89%, por lo que es una buena herramienta para establecer la prevalencia de *Li* (Guedes 2002 en Guedes y Gebhart, 2003a). Guedes y cols (2002a) indicaron que los anticuerpos circulantes contra *Li* pueden ser detectados por un corto período de aproximadamente 5 semanas.

La eliminación fecal de *Li* puede ser determinada por diferentes técnicas. El microorganismo puede ser detectado en las descargas de casos de EPP por Ac monoclonal o IFD (Mc Orist y cols. 1989b en Lawson y Gebhart, 2000). Sitjar en 2007 determinó la presencia de *Li* al reaccionar con un anticuerpo monoclonal específico usando la técnica de fluorescencia directa en materia fecal. En un estudio realizado en dos grupos de cerdos, uno inoculado con *Li* patógena de un aislamiento y otro inoculado con la vacuna avirulenta, se pudo determinar el inicio y la duración de la eliminación fecal a través de PCR. La eliminación se detectó por primera vez una semana después de la exposición y duró, de manera intermitente, por 12 semanas en el grupo de *Li* patógena y se inició a las dos semanas post-exposición en el grupo de la vacuna y duró discontinuamente por nueve semanas. El pico de descargas se produjo dos semanas después de la exposición en el primer caso (Guedes y Gebhart, 2003a).

En un trabajo realizado por McOrist y cols. en 1997 (en Guedes y Gebhart, 2003a), las descargas se detectaron 10 semanas después del desafío con un cultivo puro. Las descargas se mantuvieron hasta 12 semanas después del primer PCR

positivo en un brote agudo de Enteropatía Proliferativa Porcina (Guedes y cols. 2002b en Guedes y Gebhart, 2003a).

Sin embargo, la PCR en muestras de materia fecal ha demostrado tener algunas limitaciones, la sensibilidad varía entre un 25 y un 70% según diferentes estudios, por lo que se considera una baja sensibilidad para una técnica diagnóstica, aunque la especificidad sea considerada del 100% (Guedes y cols, 2002a). Las variaciones se deben probablemente a descargas intermitentes de *Li* (Guedes y Gebhart, 2003b) o por factores inhibidores en heces, detectados por Wilde y col. en 1990 en (Guedes y cols, 2002a; Ladinig y cols, 2009); tal inhibición, se cree, está causada por la inhibición de la ADN polimerasa, degradación o captura del ácido nucleico, o por interferencia con la lisis celular (Lantz y cols, 2000). La técnica de PCR aparece como confiable para detectar bacterias en heces de animales clínicamente afectados pero no es suficientemente sensible para detectar el microorganismo en heces de animales afectados subclínicamente, debido a la descarga intermitente de *Li* en las heces (Gebhart y Guedes, 2001).

Para salvar la deficiencia de la técnica es que se realizan varios estudios focalizados en incrementar el límite de detección del PCR, utilizando nested PCR con 15 ciclos de amplificación sin modificar la especificidad, llegando la sensibilidad en muestras de mucosa intestinal hasta el 94.1% y en muestras de materia fecal hasta el 88,2%, contra un 76,4% por observación microscópica convencional (Dong-Kyun Suh y cols, 2000). La agrupación de las muestras para la PCR reduce los costos pero disminuye la sensibilidad del ensayo (Ohlinger, 2008).

Guedes y Gebhart, (2003a) pudieron determinar que un cerdo expuesto a la vacuna comercial atenuada, mantuvo la eliminación de *Li* avirulenta en las heces hasta nueve semanas, permitiendo la exposición de cerdos susceptibles sin causar signos clínicos, a pesar de que el Ag de *Li* fue determinado en secciones de íleon en la tercer semana post-exposición, esto demuestra que las células son infectadas por la bacteria avirulenta vacunal.

La ventaja de vacunar radica en que los cerdos se exponen de una manera homogénea en el tiempo y permite disminuir el número de cerdos susceptibles del grupo (Guedes y Gebhart, 2003a). Como consecuencia de esto, una desventaja de utilizar la vacuna es la imposibilidad de diferenciar entre el ADN patógeno y el ADN de la vacuna, utilizando la técnica de PCR como diagnóstico (Guedes y Gebhart, 2003a; Ohlinger, 2008).

#### 1.15.2- Diagnóstico Post mortem

Por muchos años el diagnóstico clínico de EPP, se limitó a necropsia y microscópico del tejido. Las lesiones severas de EPP pueden diagnosticarse a la necropsia, pero las lesiones moderadas y leves, que son más comunes, son también más difíciles de diagnosticar en el estudio macroscópico.

Además, muchos de los cerdos afectados es probable que permanezcan sin ser detectados, debido a que las lesiones de AI ya se han resuelto al momento del sacrificio y, además, puede haber engrosamiento ileal sin estar asociado con EPP en muchos animales (Cristensen y cols, 1990 en Lawson y Gebhart, 2000), como se describe en el punto siguiente (1.15. 3) referido a diagnóstico diferencial.

La observación de las lesiones macroscópicas por si sola no permite un diagnóstico exacto, aún siendo algunas muy significativas. A diferencia, de la asociación entre un intestino macroscópicamente engrosado, la presencia de cambios proliferativos y el microorganismos intracelulares que es altamente significativa, aún más, si el edema también está presente (Jones y cols, 1993a).

Este diagnóstico depende de la caracterización de las lesiones típicas de engrosamiento y el examen histológico de las lesiones de tejido con HE. Sin embargo, tales métodos no detectan los casos donde las lesiones se están resolviendo y las bacterias están confinadas principalmente en la lámina propia y en la submucosa (Ladinig y cols, 2009). El engrosamiento del intestino no siempre es evidente y es a menudo pasado por alto. Las lesiones son más comúnmente observadas en el ileon,

cerca de la unión íleo-cecal, y aparecen como un engrosamiento de la mucosa. La enfermedad más crónica resulta en enteritis necrótica o un engrosamiento de la capa muscular externa. En la EPH, una gran cantidad de sangre no digerida se ve en la luz del intestino delgado (Gebhart y Guedes, 2001).

Histopatológicamente, el diagnóstico puede ser hecho por la demostración de la proliferación de enterocitos por la coloración de HE, pero la evaluación es subjetiva y queda restringida a los casos que presentan una evidente proliferación de enterocitos, presentes en casos moderados y severos de EPP y a la hiperplasia de las criptas hacia las Placas de Peyer y la lámina propia en el ileon terminal (Roberts y cols, 1980, Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2002a, Jacobson y cols, 2003).

La tinción de secciones histológicas con Nitrato de Plata, técnica de WS revela la presencia de numerosos organismos intracelulares de forma curvada y estos organismos deben estar localizados dentro del citoplasma apical de células epiteliales de las criptas para que el diagnóstico pueda ser considerado positivo (Young, 1968; Roberts y cols, 1980, McOrist y cols, 1993; Guedes y cols, 2002a;). Esta tinción tiene la particularidad de que la plata precipita sobre la pared de la bacteria haciendo que esta se observe mas gruesa de lo normal. Es una técnica utilizada habitualmente para poner en evidencia la presencia de un gran número de agentes bacterianos, principalmente estructuras espiroquetales en tejidos parafinados por lo que no constituye un método específico para *Li* (Faine, 1965; Woods and Ellis 2000, Illanes y cols, 2008). A veces, no sirve para detectar al microorganismo en tejido necrótico o autolisado, lo que representa una desventaja (Gebhart y Guedes, 2001; Ladinig y cols, 2009) y además requiere de experiencia (Lawson y Gebhart, 2000).

Los dos métodos más específicos y sensibles son la IHQ de secciones de tejido parafinados usando Ac mono o policlonales específicos y la PCR de mucosa ileal, usando iniciadores específicos, aún en casos sospechosos EPP sin engrosamiento o cambios histopatológicos leves o poco evidentes (Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2002a; Ladinig y cols, 2009).

Entre los métodos histoquímicos la IPX y la IF son más sensibles que la tinción de plata por la especificidad de los anticuerpos monoclonales contra la proteína de membrana externa 21 KD de *Li*, según lo expresado por McOrist y cols (en Guedes y cols, 2002a). Estas técnicas no solo revelan al organismo en unas pocas criptas en una etapa temprana de la infección, sino que son capaces de detectarla en casos severos con necrosis en la mucosa e incluso dentro de macrófagos de la lámina propia durante la etapa de recuperación de la enfermedad. Además nos permiten relacionar la presencia del agente con la lesión y así reconocer la etapa en que se encuentra el curso de la enfermedad (Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2002a; MacIntyre y cols, 2003; Guedes, 2004; Ladinig y cols, 2009).

En un estudio realizado por Machuca y cols, (2009), en Argentina, se indicó que la IHQ detectó el Ag de *Li* en algunos pocos enterocitos y macrófagos en muestras de intestino sin lesión microscópica aparente, lo que puede indicar infección previa y que además, podrían ser considerados cerdos infectados que podrían mantener la infección en las granjas en calidad de reservorio y de eliminador intermitente de la bacteria.

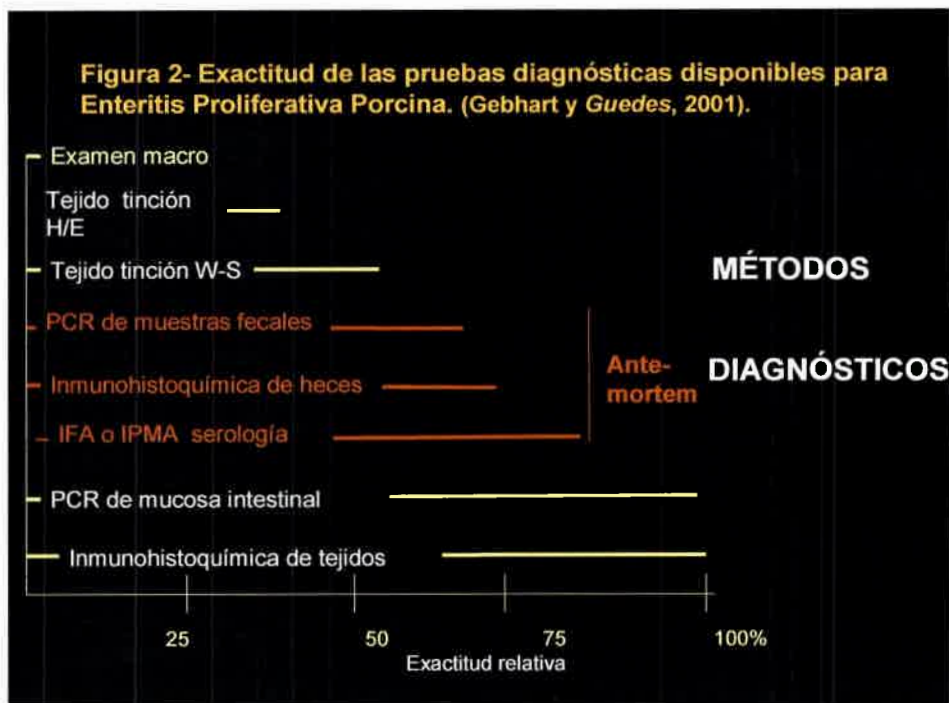
La sensibilidad de la IPX es del 87% mientras que la sensibilidad de la HE es del 37% y la tinción de plata es del 50% (Guedes, 2004).

La técnica de PCR detecta la presencia del genoma bacteriano, sin embargo, puede dar resultados positivos clínicamente irrelevantes en animales en recuperación que ya no están infectados con un número significativo de bacterias. Para estudios epidemiológicos es una poderosa herramienta de diagnóstico, capaz de detectar infecciones subclínicas (Ladinig y cols, 2009). Por el contrario, Jacobson y cols en 2004 (en Jacobson y cols, 2010) afirman que la PCR tiene una buena sensibilidad cuando es aplicada en muestras de tejido o heces de animales con enfermedad evidente, pero detecta *Li* pobremente en muestras de heces tomadas de cerdos con infección subclínica.



Jones y cols (1993a), McOrist y cols (1994) y Guedes y cols (2002a) indicaron que son necesarias tan solo 10 microorganismos para que sean detectadas a través de PCR de mucosa infectada, por lo que presenta una alta sensibilidad y especificidad.

La siguiente figura muestra la exactitud de las pruebas diagnósticas disponibles para Enteropatía Proliferativa Porcina (Gebhart y Guedes, 2001).



### 1.15. 3- Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial incluye una serie de enfermedades crónicas caracterizadas por diarrea, entre las que se mencionan la Gastroenteritis Transmisible Enzootica (o TGE), Spirochetosis (causada por *Brachyspira pilosicoli*), la Disentería Porcina (*B. hyodysenteriae*), Salmonelosis (causada por *Salmonella typhimurium*), Colibacilosis (infección por *Escherichia coli*) y la hipersensibilidad a la soja (Guedes, 2003 en França, 2007).

Sin embargo, la importancia y la interacción de algunos de estos organismos en la enfermedad clínica aún deben aclararse.

Jacobson y cols, (2003) estudiaron la presencia de patógenos sospechosos o conocidos en cerdos en crecimiento con diarrea, y relacionaron estos hallazgos con la

enfermedad clínica y con las lesiones presentes en el intestino. A pesar de que se encontraron varios agentes patógenos, incluso en un mismo animal, su sola presencia no determinó ni las lesiones patológicas compatibles con la enfermedad clínica, ni el mal rendimiento de los rebaños.

Tanto *Brachyspira pilosicoli* como *Li* fueron los agentes mayormente asociados con enfermedades entéricas en cerdos en crecimiento, pero estas infecciones pudieron manifestarse subclínicamente. Solo se hicieron evidentes en aquellos cerdos con infección concomitante entre ambos agentes, con una alta correlación entre las lesiones y la pobre tasa de crecimiento (Jacobson y cols, 2003).

También esta descrita la infección por *Li* y Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), se asocian con retardo en el crecimiento, desmejoramiento, incremento en la mortalidad y diarrea en cerdos post-destete (Jensen y cols, 2006; Segales y cols, 2001).

Entre los diagnósticos diferenciales para la forma aguda, es importante considerar la úlcera gástrica, vólvulo intestinal, Salmonelosis y la Disentería Porcina (causada por *B. hyodysenteriae*) (Guedes y cols, 2002b).

Los vólvulos o torsiones intestinales son frecuentes, importantes y habitualmente resultan mortales en cerdos de engorde y cerdos adultos. En ocasiones reciben el nombre de "síndrome intestinal hemorrágico", aunque en esta afección no se encuentre implicada una respuesta inflamatoria. El enrojecimiento intenso de las asas intestinales involucradas en la torsión es el resultado de la congestión pasiva (Ohlinger, 2008).

## **CAPITULO II**

### **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## **2.1- Hipótesis de trabajo**

Las lesiones macroscópicas, microscópicas y la ubicación específica de *Lawsonia intracellularis* en las células epiteliales intestinales permitirá dar el diagnóstico certero de la Enteritis Proliferativa Porcina.

## **2.2- Objetivos**

### **2.2.1- Objetivo general**

Mediante diferentes técnicas de diagnóstico se determinará la presencia de *Lawsonia intracellularis* y se caracterizarán las lesiones macroscópicas, microscópicas de la Enteropatía Proliferativa Porcina en los criaderos confinados de cerdos con diarrea de la Argentina.

### **2.2.2- Objetivos Particulares**

- Caracterizar las diarreas y las lesiones macroscópicas halladas en los cerdos necropsiados.
- Caracterizar la presencia de la enfermedad a través de las lesiones microscópicas.
- Corroborar a través de las técnicas de histoquímica la relación entre las lesiones microscópicas encontradas y la presencia del agente.
- Determinar, a través de técnicas de Inmunohistoquímica, PCR de mucosa, PCR de materia fecal y Microscopía Electrónica, la presencia de *Lawsonia intracellularis*.
- Comparar la asociación entre las distintas pruebas diagnósticas.

**CAPITULO III**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1- Población a estudiar**

El estudio se realizó sobre un total de 21 establecimientos intensivos pertenecientes a 8 provincias de la República Argentina. El muestreo se realizó en un territorio muy amplio, con una gran variabilidad en cuanto a clima y condiciones ambientales; se visitaron las provincias de: Tucumán, Entre Ríos, La Pampa, San Juan, San Luis, Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires.

Los establecimientos están distribuidos de la siguiente manera: 8 criaderos en la provincia de Córdoba, 5 en Buenos Aires, 2 en Santa Fe y Entre Ríos, y 1 establecimiento en las provincias de La Pampa, San Luis, San Juan y Tucumán.

Estos criaderos se caracterizaron por ser de ciclo completo, confinados, con gran variación en cuanto a las medidas de bioseguridad y al tamaño, con un rango bastante amplio que varió desde 100 hasta 4500 cerdas madres.

En la visita o consulta previa a los establecimientos, los encargados manifestaron que los animales tenían cuadros de diarrea e importante deterioro del estado corporal.

El número de animales a muestrear estuvo condicionado por la voluntad económica de los propietarios de ceder animales para la necropsia.

### **3.2- Selección de los animales**

Criterio de inclusión: Se realizó un muestreo no probabilístico de conveniencia (Thrusfield, 1990) dirigido. En cada establecimiento se seleccionaron 3 animales de entre 8 y 21 semanas de edad, con diarrea y con disminución de su condición general, presentara o no lesiones anátomo-patológicas compatibles con Enteropatía Proliferativa Porcina a la necropsia. Para tal fin, se recorrieron las distintas salas de destete, recría, crecimiento y terminación y se determinó la presencia del evento diarrea, procediendo entonces a la elección de los 3 cerdos a muestrear de una misma categoría.

El muestreo incluyó: necropsia, observación de diarreas y de lesiones macroscópicas presentes, protocolización y toma de muestras de tejido y de materia fecal para las distintas técnicas. El n total fue de 61 cerdos.

Criterio de exclusión: no se realizó la necropsia de animales que ya estuvieran muertos, por las limitaciones que presentan algunas técnicas de HQ, como la técnica de WS cuando es aplicada en muestras que presentan necrosis o autólisis (Gebhart y Guedes, 2001; Ladinig y cols, 2009).

### **3.3- Abordaje de la cavidad abdominal y sitio para la toma de muestras**

La necropsia fue dirigida solo a la cavidad abdominal, se abordó el intestino a la altura del ciego. Una vez individualizada la válvula ileocecal, se midieron aproximadamente unos 10 cm de íleon por delante de la válvula con lo que se determinó la porción de íleon a estudiar. En primer lugar sobre este trozo del íleon terminal se observaron y protocolizaron las lesiones macroscópicas que se encontraron en mesenterio y linfonódulos mesentéricos (Anexo 1). Posteriormente se realizó un corte longitudinal en el íleon por su borde de inserción mesentérica a lo largo de la porción antes descrita y se observó el contenido intestinal y la mucosa y se protocolizó (Anexo 1). Esta zona del íleon se eligió en función de que diferentes autores la describen como uno de los sitios más probables de asiento de las lesiones de Enteritis Proliferativa Porcina crónica y subclínica (McOrist, 2006).

### **3.4- Toma de muestras**

De cada animal necropsiado se tomaron muestras para realizar distintas técnicas diagnósticas postmortem: muestras de tejido en formol al 10% bufferado para histoquímica (HQ) e inmunohistoquímica (IHQ), muestras de materia fecal para PCR MF, muestras de raspado de mucosa intestinal para PCR M, muestras de tejido para ME y muestras de colon para determinar color y consistencia.

#### 3.4.1- Procedimiento para obtención de muestras para Histoquímica e Inmunohistoquímica

Se tomó por cada animal 1 trozo de íleon (2 cm) 10 cm por delante de la válvula ileocecal debidamente identificado. Las porciones de intestino muestreadas fueron de dos cm de largo, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión antes mencionados. A las muestras se les realizó un corte longitudinal por el borde mesentérico para que al colocarlas en el fijador quedaran bien estiradas.

Las muestras de cada animal, se remitieron al laboratorio de histopatología del Departamento de Patología Animal; por separado en un envase hermético debidamente identificado con el número de animal y establecimiento junto al protocolo de necropsia correspondiente.

#### 3.4.2- Procedimiento para obtención de muestras para PCR de materia fecal

Se tomó con espátula de plástico estéril aproximadamente 1,5 ml de contenido intestinal del íleon y se colocó dentro de un tubo eppendorf estéril identificado adecuadamente. Se realizó con los cuidados recomendados, como para bacteriología para evitar contaminaciones con ADN extraño (Huerta y cols, 2003; Segales y cols, 2001). Las muestras se transportaron refrigeradas a 7° C en conservadora hasta el laboratorio y antes de las 12 a 24 hs de obtenidas, se colocaron en el freezer de - 20° C hasta su procesamiento.

#### 3.4.3- Procedimiento para obtención de muestras para PCR de mucosa

Luego de obtener la muestra de contenido intestinal se procedió a lavar la mucosa con solución fisiológica estéril a los fines disminuir potenciales inhibidores que se encuentran en la materia fecal (Ladinig y cols, 2009). Posteriormente con espátula de plástico estéril se raspó la superficie de la mucosa hasta obtener una muestra de aproximadamente un 1 cm<sup>3</sup> y se colocó en tubo eppendorf estéril, debidamente identificado, conteniendo PBS estéril para evitar la deshidratación y se transportó



refrigerada a 7°C hasta el laboratorio. Antes de las 12 a 24 hs de obtenidas se colocaron en freezer de - 70°C debidamente identificadas hasta la extracción del ADN (Huerta y cols, 2003).

#### **3.4.4- Procedimiento para obtención de muestras para Microscopía Electrónica**

Se obtuvieron trozos de 2mm<sup>3</sup> de mucosa de la porción terminal del ileon, los cuales se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en S-Collidina 0,2 M, pH 7,4 por un mínimo de 3 horas y se remitieron identificadas y refrigeradas a 4°C al Área de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología Animal (Merkis y Cristofolini, 2009).

### **3.5- Procesamiento de las muestras en el laboratorio de histopatología**

#### **3.5.1- Preparación de los tejidos destinados a Histoquímica e Inmunohistoquímica**

Las tres muestras obtenidas por cada establecimiento se procesaron para histopatología de la siguiente manera: se mantuvieron por 48hs en el fijador, se deshidrataron en una serie de alcoholes en gradaciones crecientes desde el 70% hasta llegar al 90% (se mantuvieron 15 minutos en cada uno a 50°C a Baño María), luego pasaron a la aclaración con tres baños de xilol puro (15 minutos en cada uno a 50°C a Baño María). Se impregnaron e incluyeron en parafina y se realizaron tres cortes de 3-5µm de espesor por cada muestra, con un micrótopo Jung®, modelo 2065 SUPERCUT de Leica®. Posteriormente se montaron en portaobjetos debidamente identificados, utilizando un adhesivo sintético adecuado para IHQ (Voligoma).

Posteriormente, las secciones fueron desparafinadas con dos baños de Xilol (de 5 minutos cada uno) y se rehidrataron con una serie de Alcoholes en gradaciones decrecientes (3 minutos en cada uno) hasta llegar a un baño de agua bidestilada (por 3 minutos).

Una vez rehidratadas las muestras de cada animal, fueron coloreadas una con HE, otra con Tinción de Plata de WS y la tercera con IPX. Para esta última se utilizaron controles positivos y negativos.

Para la toma de imágenes histoquímica e inmunohistoquímica se utilizó un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss) y las imágenes se adquirieron mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.

### 3.5.2- Protocolo de tinción de Hematoxilina Eosina

Para este protocolo se utilizó Hematoxilina Activada (Biopur®) lista para usar, Eosina Amarillenta (Anedra®) que se preparó como se detalla en el (Anexo 2). La búsqueda de las lesiones histopatológicas típicas descritas por McOrist y cols (1996), se realizó a través de la observación de las láminas de HE en un microscopio óptico Nikon modelo Eclipse E 400 con un aumento de 10 y 40x al igual que las observaciones realizadas para IPX.

### 3.5.3- Protocolo de tinción de Warthin Starry

Este protocolo de tinción se desarrolló según lo expresado por Faine en 1965, Luna en 1968, y con las modificaciones hacia la técnica realizadas por Youngs en 1969 y Woods y Ellis en 2000 (Huerta y cols, 2003; Stevens, 2005) y para ello se utilizó Nitrato de Plata (Cicarelli®) (Anexo 3).

Para la observación óptica se utilizó un microscopio marca Nikon modelo Eclipse E 400 con un aumento de 100x con aceite de inmersión según lo recomendado (Rodríguez y cols, 2004). Para la observación de las *Li* por la técnica de WS se utilizó el mismo microscopio en un aumento de 100x con aceite de inmersión según lo recomendado (Rodríguez y cols, 2004). Cabe aclarar que se consideró Negativo: la observación de bacterias con forma de S sigmoidea similar a *Li* presentes en la luz

glandular, ya que han sido descritas como antigénicamente diferentes por McOrist y colaboradores en 1989.

#### **3.5.4- Protocolo de Inmunoperoxidasa**

La técnica se llevó a cabo según lo recomendado por el Universal Dako Cytomation LSAB®+Kit, peroxidase (LSAB®+Kit, HRP) peroxidasa, catálogo número K0679 que incluye DAB+cromógeno para ser utilizado con anticuerpos primarios producidos en conejo, rata y oveja; y además, teniendo en cuenta las indicaciones de la Proteinasa K de Dako Cytomation catálogo número S3004 y las Instrucciones Generales para la tinción de Inmunohistoquímica disponibles en: [www.dakocytomation.com](http://www.dakocytomation.com) (Anexo 4).

#### **Características del anticuerpo primario**

Se utilizó un anticuerpo primario policlonal hecho en conejo producido por Roberto Guedes y su equipo de trabajo de la Universidad Federal de Pelotas (Brasil), a una dilución de 1/30000, según lo recomendado por este autor.

#### **3.6- Procesamiento de las muestras en el laboratorio de PCR**

Para la estandarización de la PCR y como control positivo, se utilizó ADN extraído de una vacuna viva de *Lawsonia intracelularis* (ENTERISOL ® Ileitis, Boehringer Ingelheim, Argentina).

Para la extracción de ADN de las muestras de mucosa se utilizó el kit comercial Wizard SV 96 Genomic DNA purification (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 5). El ADN resultante fue guardado a -20°C hasta el momento de su procesamiento por PCR.

Las muestras de ADN de materia fecal fueron extraídas utilizando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del

fabricante (Anexo 6). El ADN obtenido fue guardado a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Para la amplificación se usaron los cebadores descritos por Jones y col (1993b), amplificando parte del gen Lyase-like, obteniendo productos de 319 pb (Anexo 7). Con el fin de reducir el riesgo de falsos positivos, cada etapa del proceso fue realizada en salas separadas (extracción de ADN, amplificación y visualización). Nunca se procesaron hasta 30 muestras a la vez. Cada 10 muestras fue incluido un control negativo (mezcla sin ADN), y el control positivo era incluido en la última posición.

### **3.7 - Procesamiento de las muestras en el área de Microscopía Electrónica**

Las muestras permanecieron a 4°C durante 24 horas para su adecuada fijación y se procesaron como se detalla en el Anexo 8 según el protocolo convencional con modificaciones de Merkis y Cristofolini, 2009. Todos los reactivos utilizados fueron de Electron Microscopy Science. La observación de la ultraestructura del tejido intestinal se realizó a través de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Elmiskop 101 (Siemens) y la adquisición de imágenes mediante el microscopio electrónico de transmisión LEO (Carl Zeiss).

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados y la discusión se presentarán conjuntamente para cada uno de los diferentes ítems estudiados, de esta manera se llevará un orden con el objetivo de simplificar su comprensión.

La mayoría de los cerdos con diarrea mostraron una importante disminución de su condición corporal en la mayoría de los establecimientos muestreados (Foto1).



Foto 1. Cerdo de 8 semanas de edad con retardo en el crecimiento y diarrea.

En primer lugar se detallarán las lesiones anátomo-patológicas observadas en el mesenterio, linfonódulos mesentéricos e íleon, y posteriormente los datos sobre el color y la consistencia de las heces en el colon.

#### **4.1- Observación de lesiones anátomo-patológicas en mesenterio, linfonódulos mesentéricos e íleon**

Las lesiones más significativas que se observaron a nivel del mesenterio de 61 cerdos fueron hiperemia (49%) y edema (16%) (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de lesiones macroscópicas halladas en mesenterio.

Lesiones en mesenterio	Presente		Ausente		Total	
	N	%	N	%	N	%
Hiperemia	30	49	31	51	61	100
Edema	10	16	51	84	61	100

De estos animales con lesiones anatómo-patológicas en mesenterio se obtuvo la siguiente distribución: 28 animales presentaron solo una lesión, de los cuales 24 cerdos tuvieron hiperemia y cuatro edema. Seis cerdos presentaron ambas lesiones juntas. En la foto 3 se observa que el mesenterio ha perdido su transparencia habitual debido al edema y además se aprecia marcada hiperemia.

En la observación externa del íleon se determinaron lesiones en 46 cerdos, que correspondieron a hiperemia de la serosa intestinal en 28 de estos animales (46%) y engrosamiento de la pared intestinal en 33 de ellos (54%), presentando pliegues longitudinales y transversales engrosados, de aspecto reticular de la serosa, edematosos e hiperémicos (Foto 2).

En el análisis de la distribución de las lesiones en el íleon se determinó que 13 cerdos presentaron solo hiperemia, mientras que 18 cerdos solo presentaron engrosamiento de la pared y otros 15 presentaron las dos lesiones juntas.

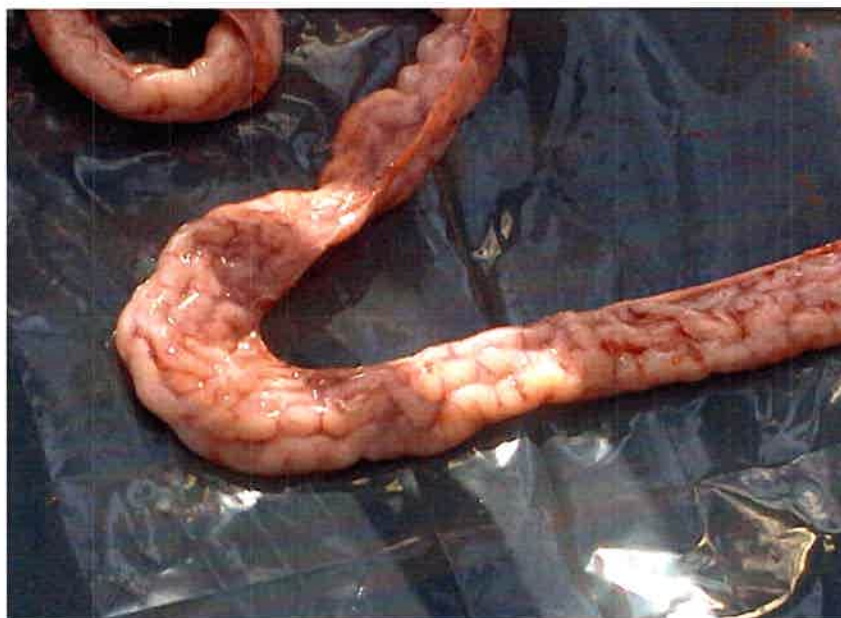


Foto 2. Aquí se observa el íleon sin abrir. La superficie de la serosa se observa reticulada, edematosa y algo hiperémica.

Además, se observaron lesiones en los linfonódulos mesentéricos, de cincuenta y tres cerdos. Entre las más destacadas se encontraban: edema, hiperemia y aumento de tamaño de linfonódulos (Foto 3 y Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de lesiones macroscópicas en linfonódulos mesentéricos

Lesión en linfonódulos mesentéricos	Presente		Ausente		Total	
	N	%	N	%	N	%
Edema	41	67,21	20	32,79	61	100
Hiperemia	18	29,50	43	70,50	61	100
Aumento de tamaño	43	70,50	18	29,50	61	100

De estos 53 cerdos, 14 animales solo presentaron una lesión, 29 animales presentaron 2 lesiones y los 10 restantes las tres lesiones mencionadas.



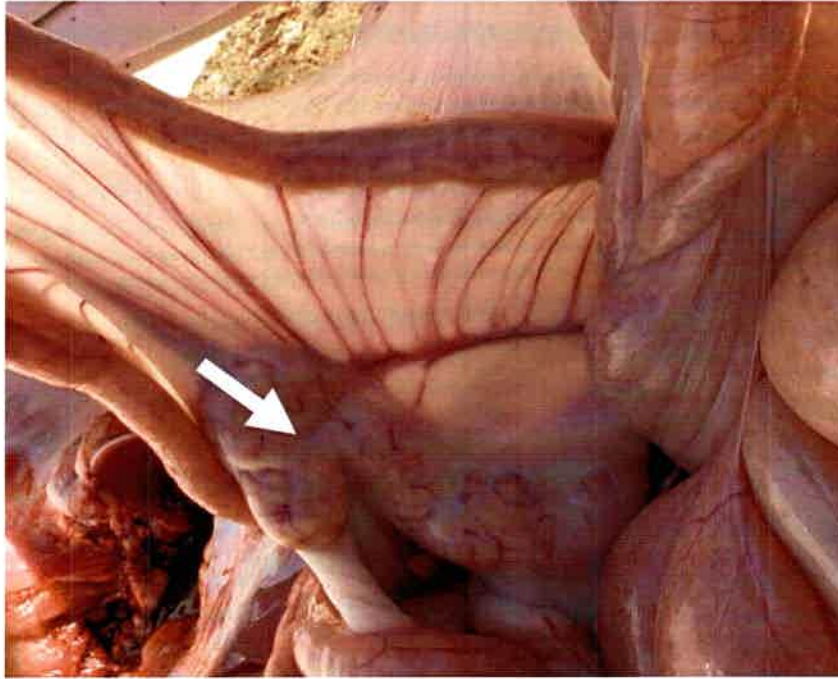


Foto 3. Mesenterio con edema e hiperemia y aumento de tamaño de la cadena de linfonódulos (Flecha)

Hay autores que describen estas mismas lesiones en brotes de EPP en cachorras de reposición, en las que se observó engrosamiento difuso de la porción terminal del íleon con apariencia reticular de la serosa y sin lesiones evidentes en la mucosa, salvo un marcado engrosamiento de los repliegues normales (Perfumo y cols, 1997). Otros autores también han descrito sólo una marcada apariencia reticular de la superficie de la serosa ileal en cerdos que padecen esta enfermedad (Wilson y cols, 1986; Lawson y Gebhart, 2000; Guedes y cols, 2002b; McOrist y cols, 2007).

En este trabajo al momento de realizar la necropsia, nos llamó la atención en algunos animales el aspecto del mesenterio; engrosado, blanquecino y que al corte resumía líquido. Con respecto a esto algunos autores como Perfumo y cols (1997), Gebhart y Guedes (2001) Guedes y cols (2002b), Jones y cols (1993a) mencionan que no solo está presente en EPP, sino que además la presencia de edema de mesenterio asociado con engrosamiento del íleon es un valioso indicativo de Enteritis Proliferativa. También se ha comunicado en casos de EPP la hiperplasia de la cadena ganglionar linfática mesentérica y, en algunos casos, edema de estos linfonódulos (Wilson y cols, 1986; Perfumo y cols, 1997).

La presencia de lesiones en la mucosa del íleon se analizó, cortándolo longitudinalmente y exponiendo su contenido. Se caracterizó la apariencia de la mucosa, la consistencia y aspecto del contenido y la superficie de la mucosa luego de lavarla cuidadosamente (Tabla 3). La apariencia de la mucosa ileal presentó pliegues longitudinales y transversales denominándose mucosa “corrugada” (Fotos 4 y 5), en otros casos los pliegues fueron de mayor espesor, y se los denominó aspecto “cerebroide”, también se observó hiperplasia de las Placas de Peyer, a lo que se denominó aspecto de “toalla” (Foto 6). La mucosa con apariencia normal se observa en la foto 7.

Tabla 3. Características anatómo-patológicas del íleon.

Apariencia de la mucosa	Superficie de la mucosa		Consistencia y aspecto del contenido ileal				Total			
	N	%	N	%	N	%	N	%		
Normal	21	34,43	Edema	20	32,79	Acuoso	45	73,77	61	100
Corrugada	28	45,90	Moco	6	9,84	Sangre digerida	3	4,92	61	100
Cerebroide	8	13,11	Necrosis superficial	0	0	Sangre fresca	2	3,28	61	100
Toalla	4	6,56	Fibrina	0	0	Alimento no digerido	4	6,56	61	100
			Sin particularidad	35	57,38	Cre moso	5	8,20	61	100
						Pastoso	2	3,28	61	100



Foto 4. Mucosa ileal engrosada, con pliegues longitudinales, y brillante. Foto 5. Mucosa ileal corrugada, brillante e hiperémica con restos de alimento sin digerir.



Foto 6. Mucosa ileal brillante con aspecto de toalla, debido a la hiperplasia de las Placas de Peyer. Foto 7. Mucosa ileal con aspecto normal.

La superficie de la mucosa del íleon se observó edematosa en 20 animales (32,79%) (Foto 8) y con presencia de mucus en 6 cerdos (9,84%), sin necrosis superficial ni fibrina. En 35 animales la mucosa ileal no presentó particularidades anormales (57,38%).



Foto 8. Mucosa ileal corrugada y con edema en su superficie.

Según autores como Rodríguez y cols (2004) las lesiones macroscópicas encontradas en los intestinos evaluados en sus estudios fueron pliegues transversales y longitudinales de la mucosa en el 74,44% de los casos. Estas lesiones se correspondieron histológicamente, en un 18,88%, con el cuadro lesional de la AI porcina con hipertrofia de la capa muscular. En nuestro estudio, si bien se observó la mucosa con pliegues más o menos gruesos, nunca se observó la manifestación llamada "intestino en manguera" o hipertrofia de la capa muscular como vulgarmente se la denomina a la ileitis regional. De esta manera lo describen los autores mencionados.

Otros autores además de los pliegues y la mucosa engrosada indican, que la mucosa se encuentra húmeda pero no mucoide (McOrist y cols, 2007; Carvajal y cols, 2005a; Gebhart y Guedes, 2001) o que predomina el edema en las diferentes capas de la pared del íleon (Wilson y cols, 1986), características que también se observaron en los intestinos afectados con lesiones típicas de Adenomatosis intestinal. Pero no se

encontró exudado inflamatorio adherido en la superficie de la mucosa ni necrosis coagulativa como se reporta en la enteritis necrotizante (Wilson y cols, 1986; Guedes y cols, 2002b; Carvajal y cols, 2005a). En cambio McOrist y cols (1993), solo han observado un leve engrosamiento de la mucosa ileal, particularmente en la mucosa cercana a las Placas de Peyer.

Muchas de estas lesiones macroscópicas no son patognomónicas y pueden confundirse con otros procesos que causan lesiones similares (Jensen y cols, 2006; Zlotowski y cols, 2008). Hay que tener en cuenta que las lesiones de engrosamiento pueden ser diagnosticadas a la necropsia en los casos severos, pero las lesiones moderadas a leves, más frecuentes de encontrar son las más difíciles de diagnosticar (Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2002a).

Varios estudios indican que el examen macroscópico post mortem tiene un valor limitado para el diagnóstico de *Li* (Huerta y cols, 2003; Ladinig y cols, 2009).

Por lo observado en este estudio, en coincidencia con Carvajal y cols (2005a) y Gebhart y Guedes (2001), se estima que se hace necesaria la visualización microscópica de los trastornos proliferativos presentes en casos de EPP para arribar a un diagnóstico presuntivo.

En cuanto a la consistencia y el aspecto del contenido a nivel de íleon, se observó que el contenido fue acuoso en 45 casos (73,77%), presentó sangre digerida en 3 animales (4,92%) y sangre fresca en 2 cerdos (3,28%). Además, 4 intestinos presentaron alimento sin digerir (6,56%), 5 fueron cremosos (8,20%) y solo 2 fueron pastosos (3,28%) (Tabla 7).

Por último, en la tabla 4 se detallan la consistencia y color de las heces obtenidas a nivel rectal.

Tabla 4. Consistencia y color de las heces a nivel de recto.

	Consistencia		Color		Total		
	N	%	N	%	N	%	
Normal	0	0	Amarillo	4	6,56	61	100
Pastosas	7	11,48	Amarillo verdoso	22	36,07	61	100
Cremosas	26	42,62	Beige	5	8,20	61	100
Líquidas	28	45,90	Gris verdoso	13	21,31	61	100
			Gris cemento	10	16,39	61	100
			Rojo	0	0	61	100
			Chocolate	7	11,48	61	100



Foto 9. Se observaron diarreas con heces blandas, pastosas y en algunos casos líquidas, grises, parecidas a cemento húmedo.



Foto 10. Cerdo con periné y patas sucias con heces de aspecto similar al cemento húmedo

En este estudio se pudo ver una gran variedad de consistencias y colores de las heces en recto. Las diarreas que más predominaron fueron las líquidas de color amarillo verdoso, las cuales no se describen como características de *Li*, en el resto de las diarreas predominó la consistencia líquida o cremosas y los colores gris verdoso, gris cemento y el color chocolate.

Ciertos colores en la materia fecal son manifestaciones comunes en la EPP, así lo afirman Carvajal y cols (2005a) quienes describen diarreas moderadas con heces blandas, pastosas, de color normal o parecidas a cemento húmedo. En algunos casos se observaron restos de ración no digerida en las heces, pero nunca moco o sangre. En los casos más graves las heces pueden ser bastante líquidas. En cambio, Guedes y cols, (2002b) describen, para la EPP, heces pastosas y de color rojo oscuro a negro, que se corresponde con sangre digerida. Otros autores la caracterizan como una diarrea crónica intermitente y no específica (Wilson y cols, 1986; Guedes y cols, 2002a).

En este sentido los resultados de este trabajo son variados, y esto podría ocurrir por diversas causas: varios agentes patógenos pueden estar presentes como causales

de estas diarreas, pudiendo existir infecciones concomitantes que modifiquen el color original de la diarrea, así mismo las úlceras gástricas, presencia de diarreas de origen alimentario o la utilización de algunos aditivos, como el Zinc, en la ración pueden también modificar el color primario de este signo clínico. Por todos estos motivos se hace muy difícil caracterizar la causa de la diarrea de estos animales por el color de la materia fecal en condiciones de campo.

#### **4.2- Observación de lesiones histopatológicas con tinción de Hematoxilina**

##### **Eosina en íleon**

A continuación se describen las lesiones microscópicas halladas en la observación de las 60 muestras de íleon tomadas a 10 cm por delante de la válvula ileocecal:

- Atrofia de vellosidades, se observó la relación cripta de Lieberküm-vellosidad muy alterada. La mucosa ileal tenía la apariencia de la mucosa colónica (Foto 11). Por lo general, salvo que se hubiera producido necrosis coagulativa de la punta de las vellosidades, el epitelio se mantuvo intacto

- Hiperplasia del epitelio de las criptas, la cantidad de células epiteliales cilíndricas simples que componían el epitelio superó las 5 capas o más (Foto 12).

- Criptas alargadas y ramificadas, se observaron aumentadas de tamaño debido a la gran cantidad de enterocitos inmaduros que contenían (Foto 13 y 14).

- Ausencia de células caliciformes, se presentó en aquellas criptas con células cilíndricas bajas indiferenciadas que proliferaban desde la base de la cripta (Fotos 15 y 16).

- Infiltrado mononuclear, se observaron acumulos de linfocitos intraepiteliales y también diseminados en la lámina propia, macrófagos, macrófagos activados y células gigantes, en la lámina propia y en el tejido linfoide de las Placas de Peyer (Fotos 17, 18, 19, 20 y 21).



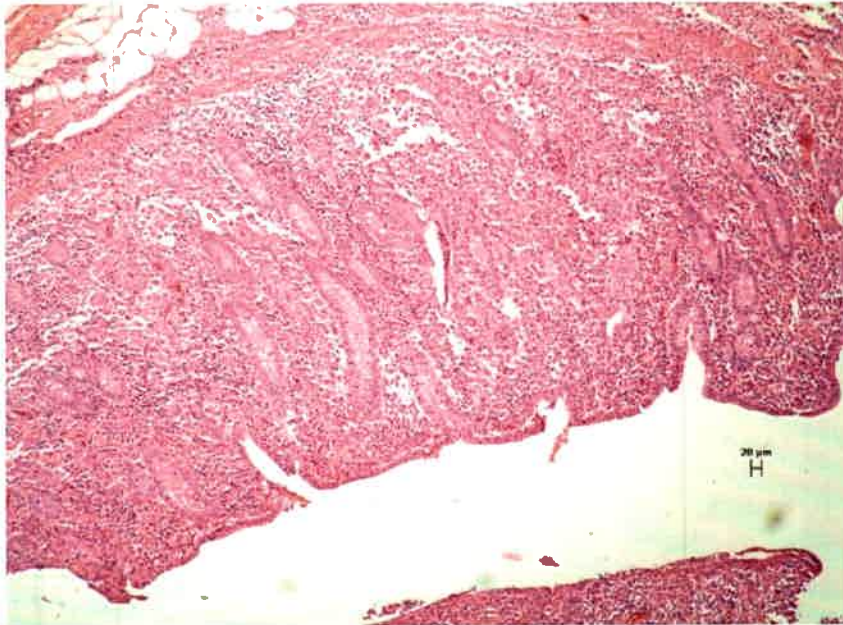


Foto 11. Ileon con atrofia de vellosidades, epitelio luminal intacto, criptas alargadas y un importante infiltrado en la lámina propia, HE 10X.

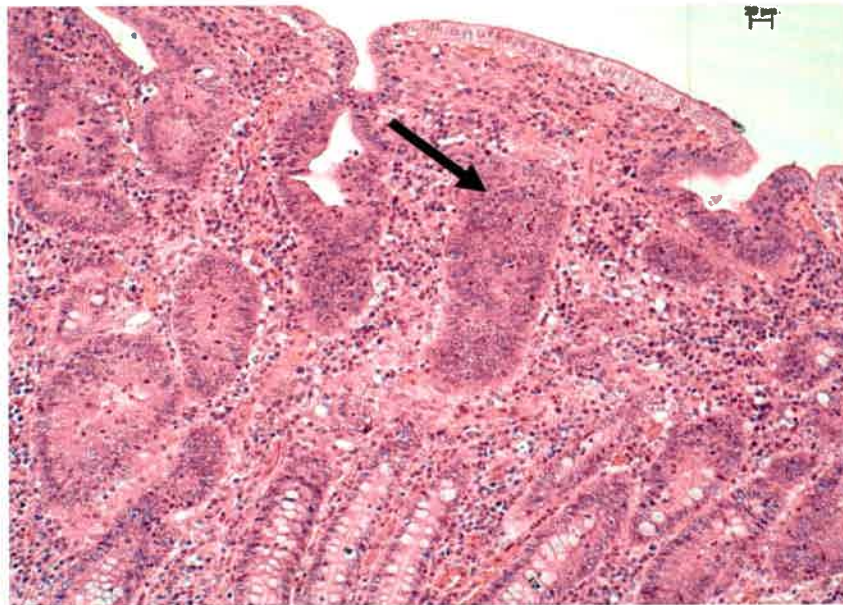


Foto 12. Atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas y ausencia de células caliciformes en las criptas afectadas (Flecha), HE 40X.

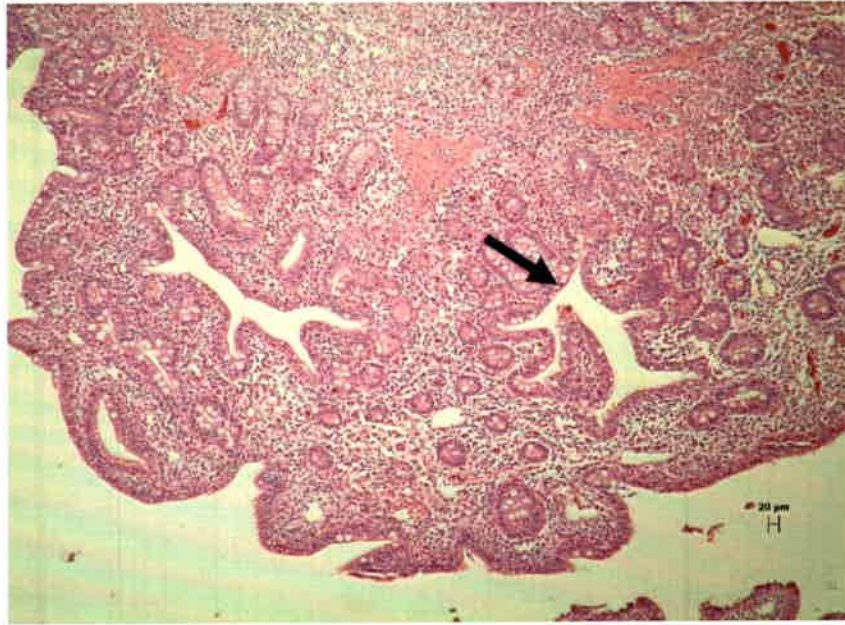


Foto 13. Criptas alargadas y ramificadas (Flecha), HE 10X.

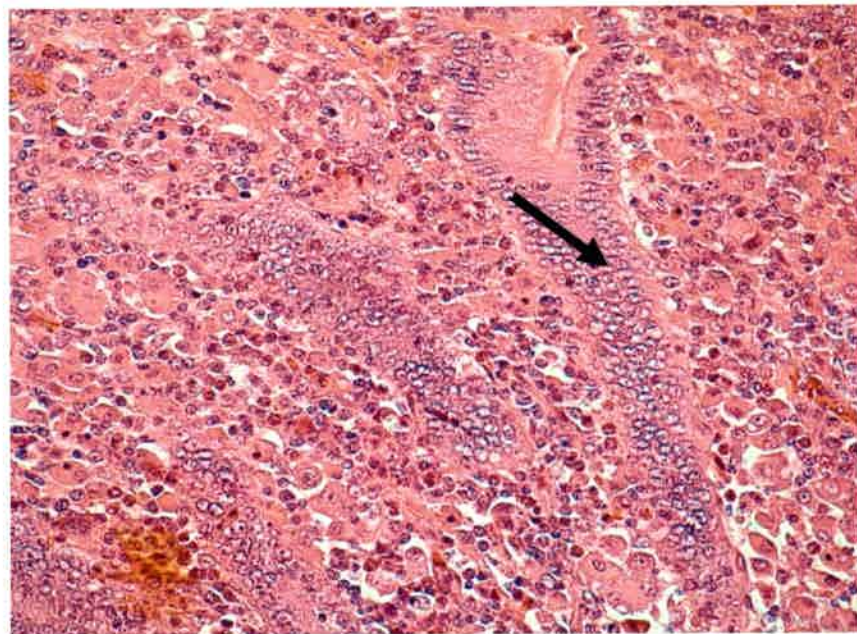


Foto 14. Criptas alargadas con hiperplasia de enterocitos inmaduros (Flecha), ausencia de células caliciformes y un importante infiltrado mononuclear en la lámina propia, HE 40X.

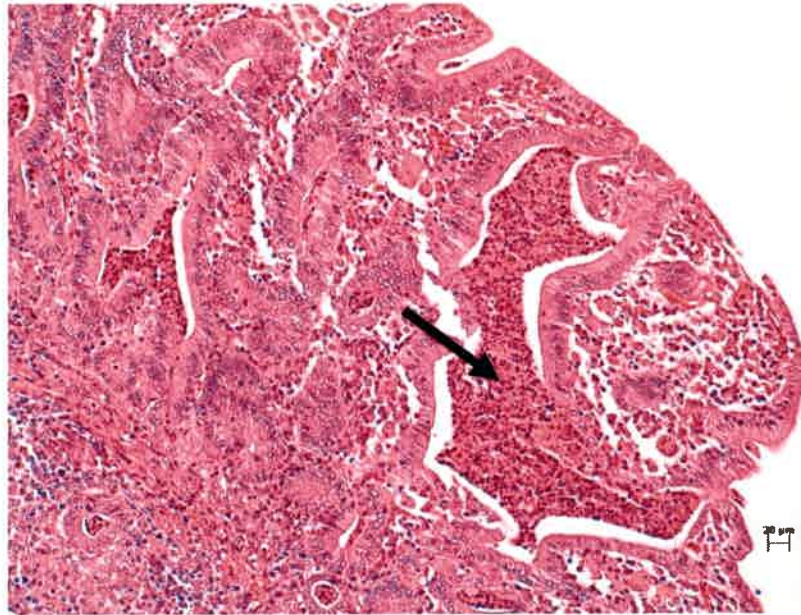


Foto 15. Ausencia de células caliciformes, criptas ramificadas con hiperplasia epitelial y exudado polimorfonuclear en la luz de las criptas (Flecha), HE 10X.

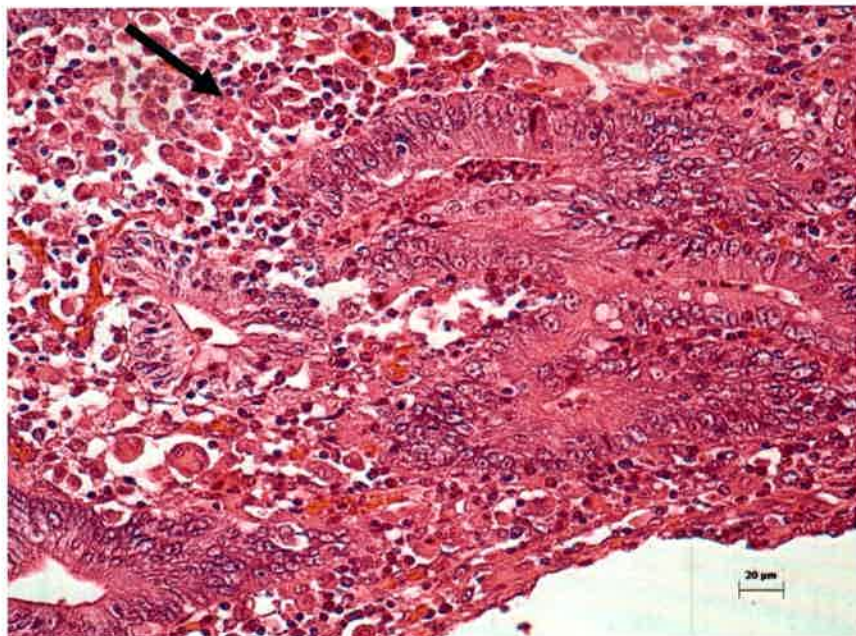


Foto 16. Ausencia de caliciformes, cripta ramificada tapizada por varias capas de enterocitos inmaduros y ausencia de células caliciformes, además se observa el infiltrado mononuclear en la lámina propia (Flecha), HE 40X.

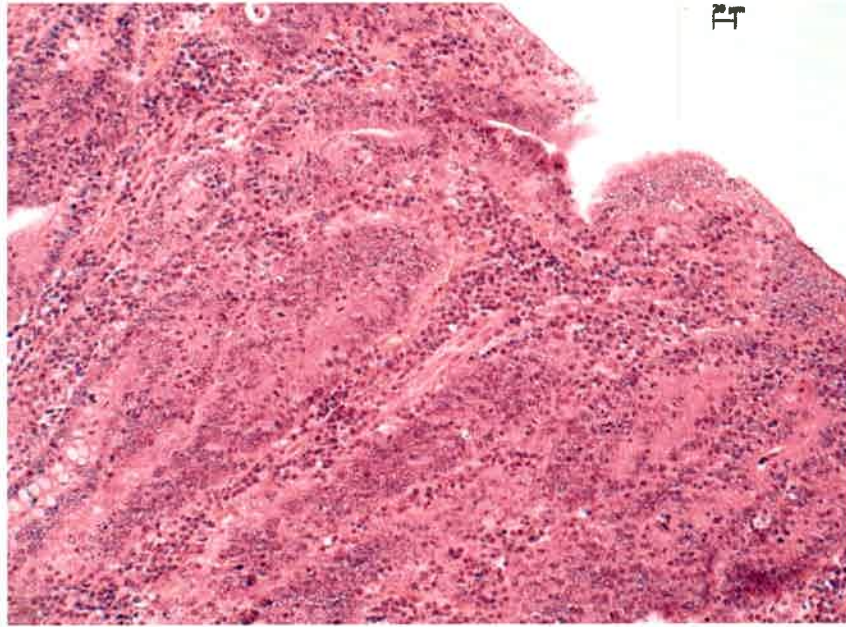


Foto 17. Infiltrado mononuclear, en la lámina propia entre las criptas con hiperplasia epitelial, HE 10x.

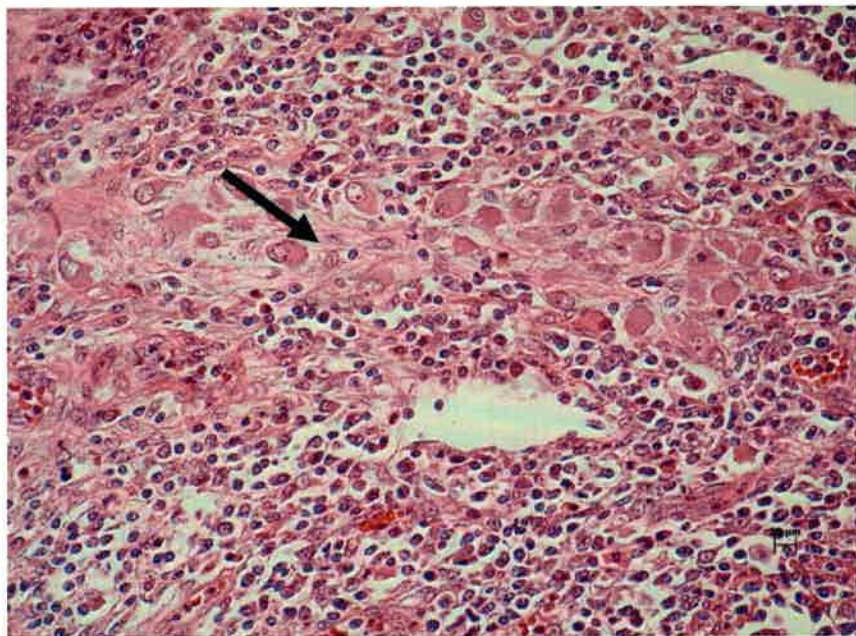


Foto 18. Infiltrado mononuclear, linfonódulo con depleción linfoidea y gran cantidad de macrófagos activados infiltrados (Flecha), HE 40X.

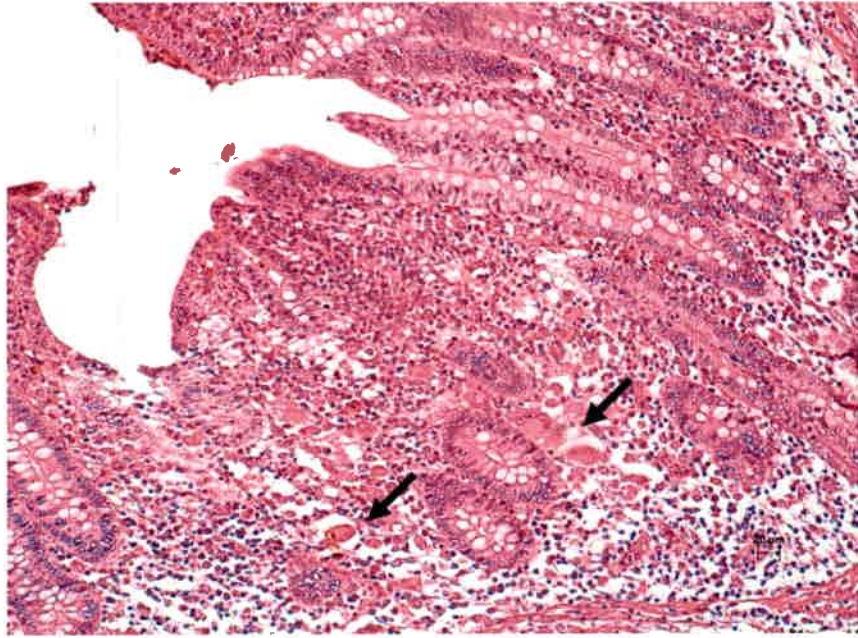


Foto 19. Células gigantes (Flechas), junto a macrófagos infiltrados en la lámina propia, HE 10X.

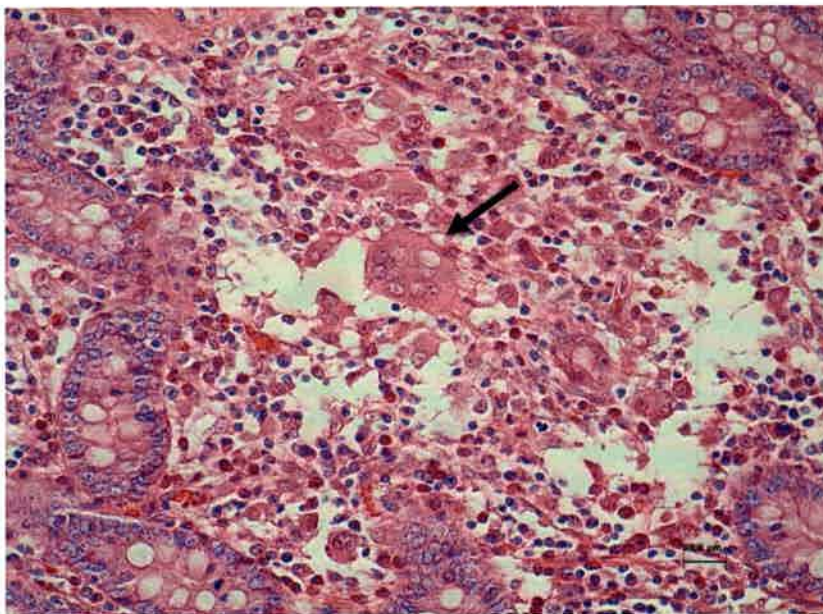


Foto 20. Células gigantes (flecha), macrófagos y linfocitos infiltrados entre las criptas en vías de recuperación, HE 40X.

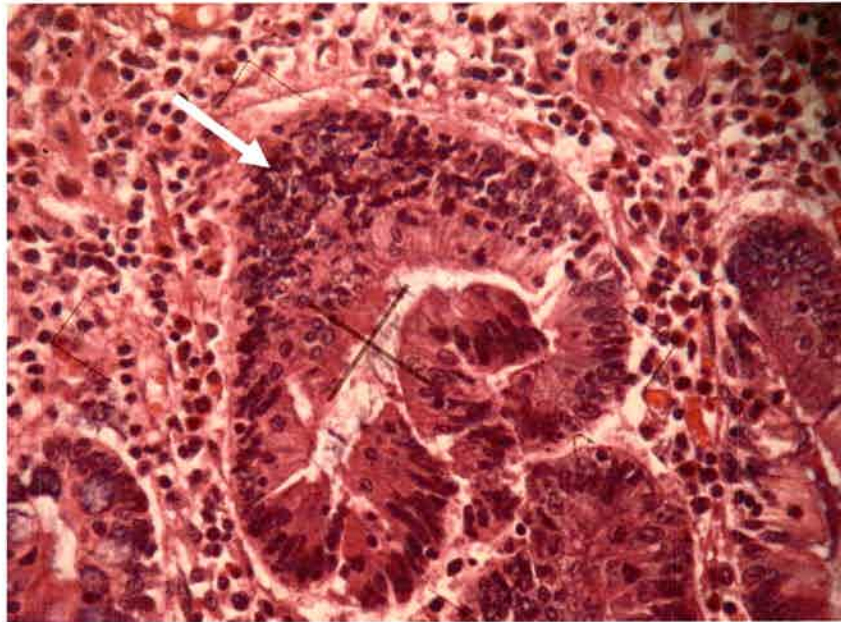


Foto 21. Linfocitos intraepiteliales infiltrados entre los enterocitos hiperplásicos de una cripta (Flecha), HE 40X.

De los animales examinados microscópicamente solo dos no presentaron ninguna de las lesiones microscópicas anteriormente detalladas y no se pudo procesar la muestra de un animal. En la Tabla 5 se detallan las frecuencias de las lesiones microscópicas en íleon.

Tabla 5. Frecuencia de lesiones microscópicas en íleon

Lesiones en íleon	Presente		Ausente		Total	
	N	%	N	%	N	%
Atrofia de vellosidades	23	38,33	37	61,66	60	100
Hiperplasia del epitelio de las criptas	40	66,66	20	33,34	60	100
Criptas alargadas y ramificadas	31	51,67	29	48,33	60	100
Ausencia de células caliciformes	2	3,33	58	96,66	60	100
Infiltrado mononuclear*	50	83,33	10	16,67	60	100

\* De los cuales 14 presentaron además, macrófagos activados y 4 presentaron células gigantes.

En la tabla 6 se muestra la distribución de las lesiones que se observaron en íleon, describiendo en primera instancia la frecuencia de aparición de solo una lesión en los animales muestreados, en segundo lugar la distribución de dos lesiones juntas,

tres y cuatro lesiones al mismo tiempo. Cabe destacar que solo un animal presentó las 5 lesiones juntas.

Tabla 6. Distribución de las lesiones microscópicas en el ileon

	1 lesión	2 lesiones	3 lesiones	4 lesiones	5 lesiones	N			
	N	N	N	N	N	N			
AV	1	AV e HEC	0	AV, HEC Y CAR	1	AV, HEC, CAR Y ACC	0	AV, HEC, CAR, ACC e IM	1
HEC	3	AV y CAR	0	AV, HEC Y ACC	0	AV, HEC, CAR E IM	6	ACC e IM	
CAR	0	AV y ACC	0	AV, HEC e IM	8	HEC, CAR, ACC E IM	0		
ACC	0	AV e IM	2	HEC, CAR y ACC	0	AV, HEC, ACC E IM	1		
IM	7	HEC y CAR	3	HEC, CAR E IM	12				
		HEC y ACC	0	CAR, ACC e IM	0				
		HEC e IM	5	AV, CAR E IM	3				
		CAR e ACC	0						
		CAR e IM	5						
		ACC e IM	0						
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>TOTAL</b>	<b>24</b>	<b>TOTAL</b>	<b>7</b>	<b>TOTAL</b>	<b>1</b>

AV (Atrofia de vellosidades), HEC (Hiperplasia del epitelio de las criptas), CAR (Criptas alargadas y ramificadas), ACC (Ausencia de células calciformes) e IM (Infiltrado mononuclear).

Además de estas lesiones microscópicas compatibles con EPP, se observaron otras lesiones que son de destacar a la hora de caracterizar la presencia de la enfermedad a través de las lesiones microscópicas.

Entre ellas encontramos hiperplasia de las criptas de Lieberkühn (AI) (Foto 22), donde además de la hiperplasia del epitelio hay mayor cantidad de criptas y abscesos de las criptas (Foto 23), dichos abscesos están compuestos por exudado de células inflamatorias polimorfonucleares en la luz de las criptas, en forma conjunta se observa infiltrado mononuclear en la lámina propia.

También se observaron intestinos con criptas alargadas y ramificadas, con hiperplasia del epitelio en algunos sectores de la pared de la cripta y con hiperplasia de células calciformes al mismo tiempo en otro sector de la misma glándula indicando signos de recuperación, (Fotos 24 y 25).

En las fotos 23 y 24 pueden observarse células gigantes en la lámina propia de intestinos con lesiones típicas de EPP, junto con una gran cantidad de macrófagos activados e histiocitos.

Por último, se observó depleción de linfocitos en los folículos linfoides de las Placas de Peyer (Foto 26 y 27), con proliferación de linfoblastos, macrófagos y macrófagos activados.

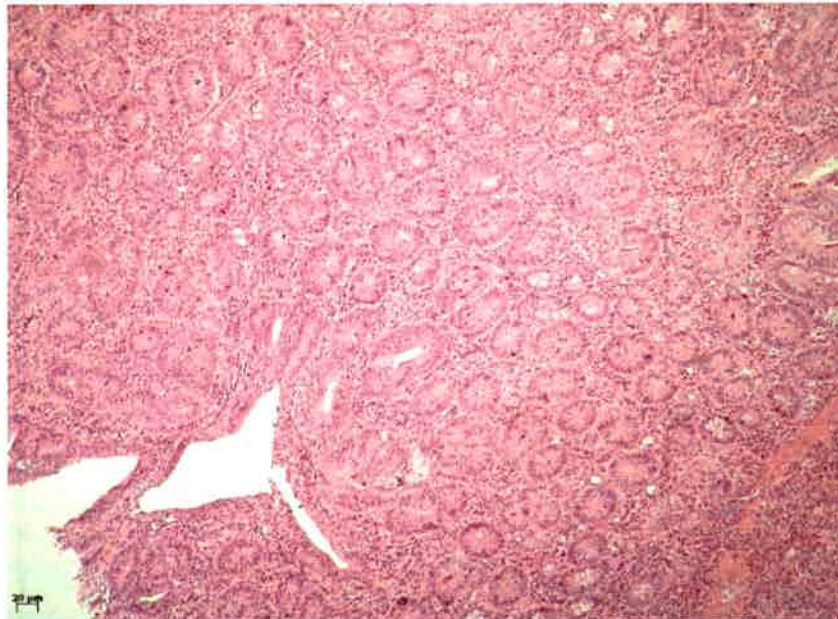


Foto 22. Hiperplasia de criptas, hiperplasia de epitelio e hiperplasia de criptas de Lieberkühn de la lámina propia (AI).



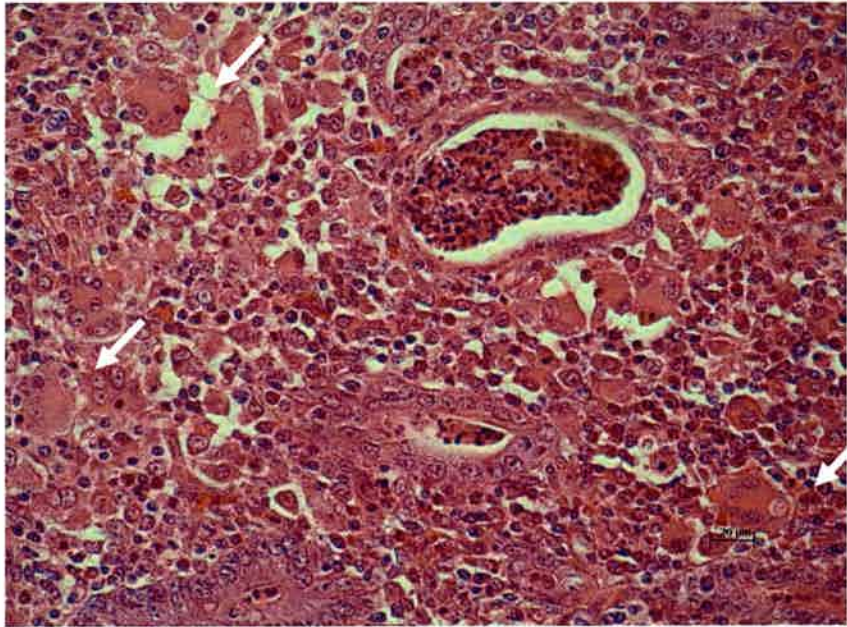


Foto 23. Abscesos de criptas: se observó en la luz de las criptas de Lieberkühn, un exudado de polimorfonucleares, junto a infiltrado mononuclear y células gigantes en la lámina propia (Flechas), HE 40X.

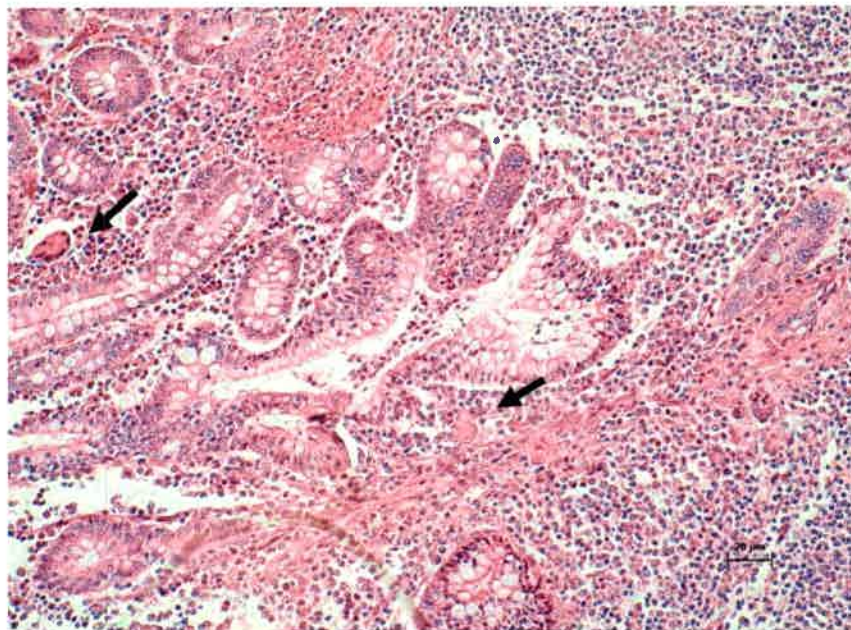


Foto 24. Cripta ramificada con parte del epitelio aún hiperplásico y el resto con hiperplasia de células caliciformes, indicativo de recuperación y células gigantes en lámina propia (Flechas), HE 10X.

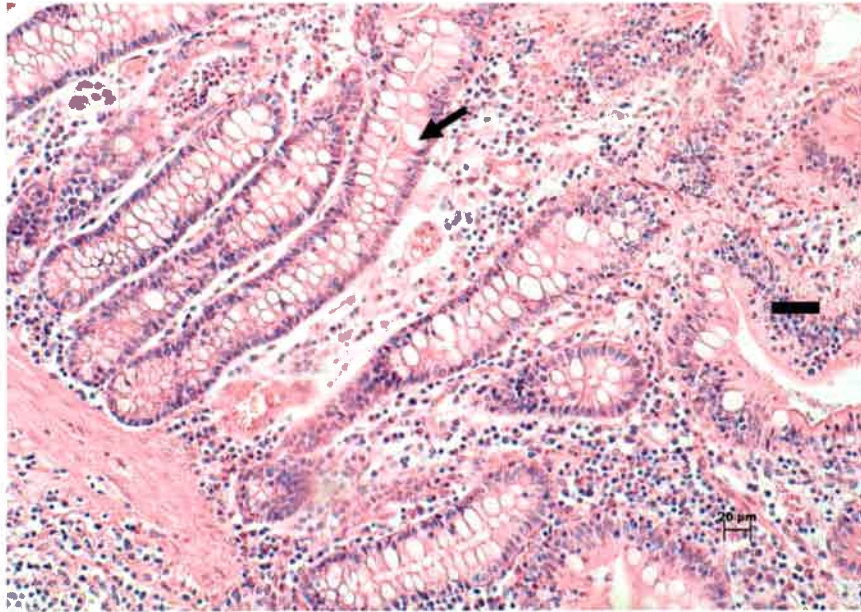


Foto 25. Criptas alargadas con hiperplasia de células caliciformes (flecha) y otras aún con hiperplasia de enterocitos (barra), HE 40X.

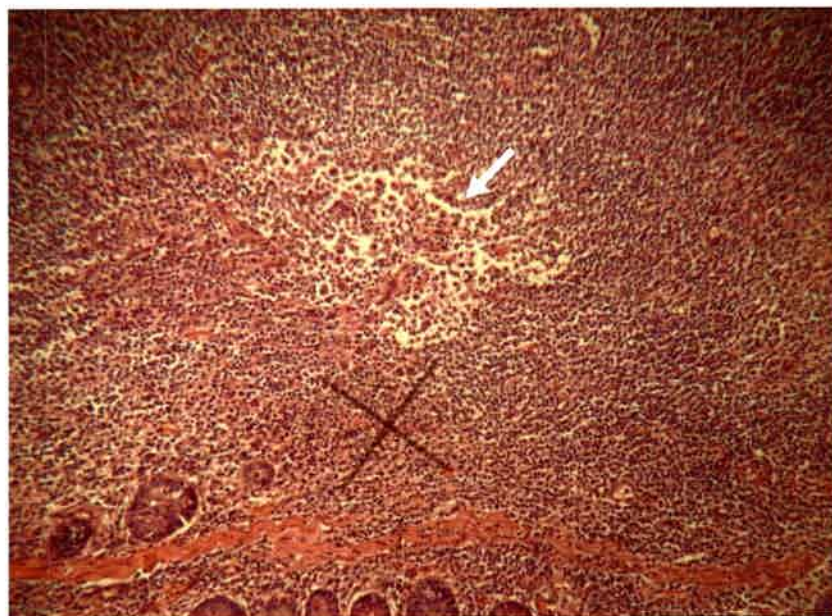


Foto 26. Depleción linfoidea en centro folicular en Placa de Peyer (Flecha), HE 10X.

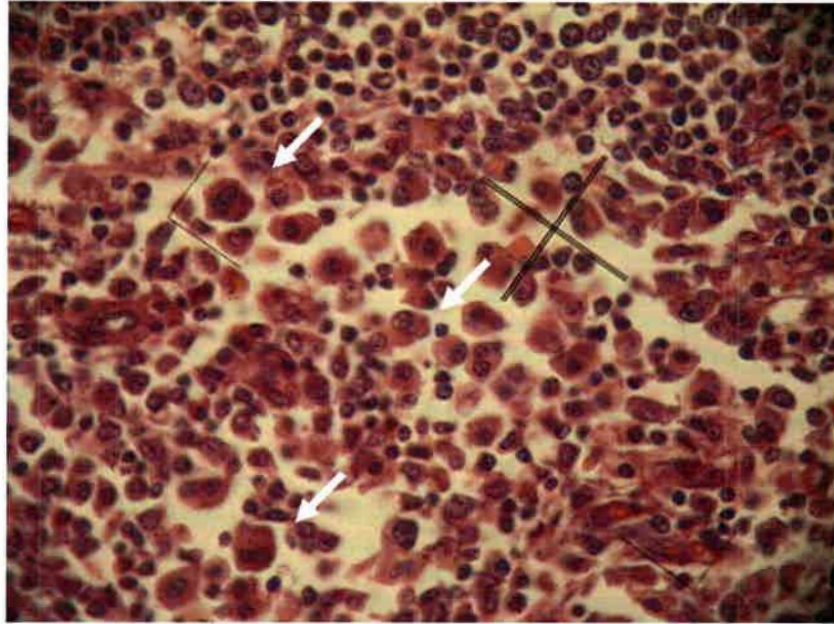


Foto 27. Depleción linfoidea, con proliferación de macrófagos activados en centro folicular en Placa de Peyer (Flecha), HE 40X.

Los principales hallazgos histopatológicos observados en las criptas ileales coinciden con los encontrados en otros trabajos que incluyeron: hiperplasia epitelial, moderada disminución en el número de células caliciformes, figuras mitóticas, histiocitos en la mucosa y el agotamiento de las placas de Peyer asociadas con histiocitos. Las criptas ileales se mostraron dilatadas y conteniendo células inflamatorias, principalmente neutrófilos y restos celulares (McOrist y cols, 1993; McOrist y cols, 1996; Lawson y Gebhart, 2000; Guedes y cols, 2002b; Zlotowski y cols, 2008).

Se pudieron caracterizar histopatológicamente dos cuadros muy diferentes; por un lado los animales que presentaban la infección por *Li* en ese momento, con todas las lesiones típicas de EPP y por otro aquellos que evidenciaban signos de recuperación. Cabe destacar que en ambos casos se pudo diagnosticar de manera presuntiva la patología por la tinción de rutina de HE; aún en casos en que la hiperplasia de enterocitos era leve. Sin embargo, algunos autores como Gebhart y Guedes (2001) y Guedes y cols (2002a) indican que la evaluación de la proliferación es subjetiva y que solo los casos con proliferación de enterocitos moderada a severa

pueden ser diagnosticados, situación con la que no coincidimos. Estos autores, además, indican que la resolución de las lesiones puede contribuir a la baja sensibilidad de la técnica de HE, pero en función de los resultados de este trabajo, más la exhaustiva revisión bibliográfica que fue realizada, consideramos que los signos de recuperación no son difíciles de reconocer para un patólogo que conozca las diferentes etapas de la patogenia de la enfermedad.

Hay que destacar, como lo menciona Jacobson y cols (2003) que, en general, todos los cerdos tuvieron algún cambio microscópico en íleon (atrofia de vellosidades y fusión por ejemplo) y se consideran modificaciones frecuentes en cerdos sanos de piaras confinadas.

Otro hallazgo microscópico que se presentó frecuentemente fue la hiperplasia de las células epiteliales inmaduras, que no constituyeron ramificaciones de las glándulas intestinales con una estructura adenomatosa típica; que en nuestro caso se consideraron como trastorno proliferativo pero sin significar que estemos diagnosticando AI como lo manifiesta Rodríguez y cols (2004). Estos autores mencionan que posiblemente se deban a la presencia de otros agentes inespecíficos, de carácter infeccioso o nutricional, que agreden la mucosa intestinal. Por otro lado, se debe considerar que las hiperplasias mencionadas pueden corresponder a la fase inicial del proceso de patogénesis de Adenomatosis intestinal, y resaltan que en las muestras que presentan únicamente esta lesión no se observa la presencia de bacterias intracelulares. Tanto la hiperplasia de las células epiteliales inmaduras no constituyendo ramificaciones de las glándulas, como la necrosis de los extremos de las vellosidades fueron observadas en este estudio y se consideraron como lesiones inespecíficas en coincidencia con estos autores.

En este trabajo se demuestra que mediante la observación de muestras con tinción de HE es posible pronosticar un resultado positivo a PCR de mucosa y/o IPX en casos típicos de EPP y en animales en vías de recuperación, en desacuerdo a lo manifestado por Huerta y cols (2003) que sostienen que la HE presenta una gran

cantidad de animales falsos negativos. Otros reportes indican, en cambio, que algunos animales con lesiones microscópicas muy parecidas a EPP, podrían estar diagnosticándose erróneamente como positivos y que se deberían a una infección por PCV-2 (Segales y cols, 2001; Jensen y cols, 2006; Zlotowski y cols, 2008; Machuca y cols, 2008; Ladinig y cols, 2009; Machuca y cols, 2010 e incluso algunos estudios hablan de coinfecciones entre ambos agentes (Segales y cols, 2001).

Como se mencionó, los animales analizados presentaron casi todas las lesiones microscópicas que se buscaron como típicas de EPP, pero el epitelio de las criptas estuvo conformado por hiperplasia de enterocitos inmaduros, encontrándose en algunos casos sustituido por una hiperplasia de células caliciformes. Esta lesión lleva a suponer una posible acción de *Brachyspira hyodysenteriae*, sin embargo autores como McOrist y cols (1996) plantean que se trata de animales que están en la etapa de recuperación y que las células epiteliales pálidas y de mayor tamaño, que sobresalen hacia la luz de las criptas como las que se describen en este trabajo, no son otra cosa que la reaparición de células caliciformes a consecuencia de la reanudación de los eventos apoptóticos cercanos al día 21 pos infección (MacIntyre y col 2003).

Otro hallazgo que se manifestó con frecuencia, sobretodo en el epitelio de las vellosidades, fue la presencia de infiltrado de linfocitos intraepiteliales, aunque también se presentó entre el epitelio hiperplásico de las criptas. MacIntyre y cols (2003) expresan haber observado la pérdida de las células T del compartimiento intraepitelial a través de IPX. En cambio, algunos autores describen un marcado incremento en la proliferación y diferenciación de los linfocitos intraepiteliales e incluso hablan de hiperplasia de las placas de Peyer (McOrist y cols, 1993; Rodríguez y cols, 2004; McOrist y cols, 2006).

En este estudio la respuesta inflamatoria fue netamente mononuclear, en la lámina propia, pero también se observaron eosinófilos tal como lo describe McOrist y cols (1993). En la luz de las criptas de Lieberkühn fue común encontrar restos de enterocitos descamados, macrófagos y neutrófilos exudados constituyendo lo que se

denominan abscesos cristalinos, según lo descrito por Segales y cols (2001) y MacIntyre y col (2003).

Además de los histiocitos y de los macrófagos activados o reactivos, se observó una importante reacción granulomatosa que, además, incluyó células gigantes multinucleadas entre las criptas en la lámina propia, tal como lo expresan Machuca y cols (2010), en algunos casos una importante depleción en las placas de Peyer en acuerdo con Smith y Lawson (2001), Segales y cols (2001), McIntyre y cols (2003) y Jensen y cols (2006).

Se vio que no solo las criptas se encontraban alargadas y ramificadas por la hiperplasia de enterocitos sino que además era notable la hiperplasia de criptas, que contribuían de una manera muy importante al engrosamiento de la mucosa, como lo expresan Roberts y cols (1980), Lawson y Gebhart (2000) y Jensen y cols (2010), incluso algunos describen que la proliferación de las glándulas invaden la placa de Peyer a lo que denominan Adenomatosis intestinal.

#### **4.3- Observación de *Lawsonia intracellularis* con tinción de Warthin Starry en íleon**

Se consideraron positivos a la técnica de WS, los intestinos que presentaron numerosos microorganismos intracelulares de forma curva de color negro en el interior de los enterocitos, en la porción apical del citoplasma, mientras que el background se observó de color marrón o amarillo (Foto 28). Los intestinos que presentaban bacterias con tamaño y morfología similar a *Li* de color negro sueltas en la luz de las criptas se consideraron negativos.

De los 60 animales muestreados, solo 2 fueron positivos a la tinción de WS (3,33%), solo una muestra no pudo ser procesada.

Al considerar la distribución de las lesiones en los animales positivos a WS, se observó que los dos presentaron lesiones microscópicas. Una muestra presentó tres lesiones, atrofia de vellosidades, criptas alargadas y ramificadas e infiltrado

mononuclear y la otra presentó las cinco lesiones, atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas, ausencia de células caliciformes e infiltrado mononuclear.

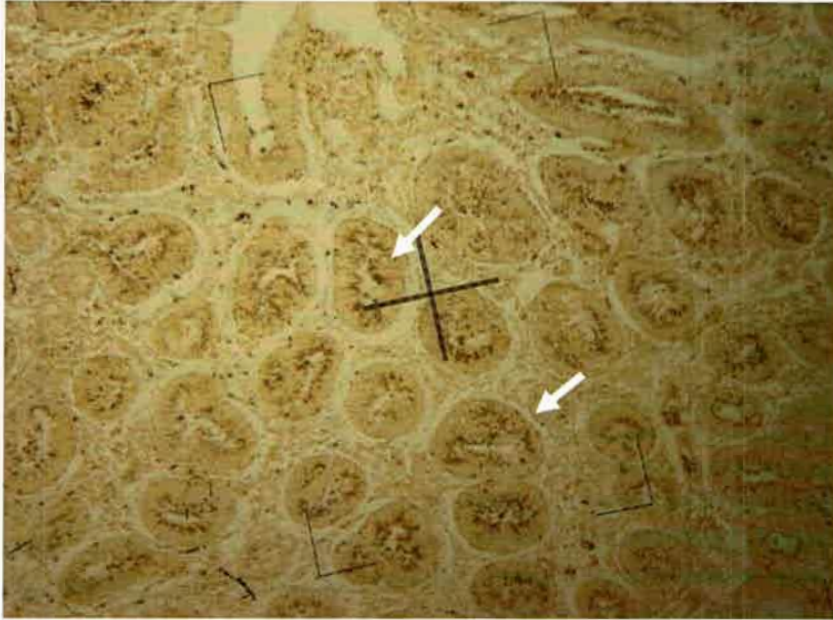


Foto 28. Tinción de Warthin Starry. Obsérvese la mucosa con hiperplasia de criptas y la reacción positiva en el citoplasma apical de los enterocitos de las criptas (Flecha), WS 10X.

Como ya se mencionó *Li* es una bacteria muy pequeña, por lo que, para afirmar que un animal presenta la bacteria, debemos no solo observar la ubicación típica de la reacción en el citoplasma apical de los enterocitos inmaduros de las criptas (Foto 29), sino también debemos observar la forma característica curva o sigmoidea. Para lo cual se hace necesario observar los preparados en un aumento de 100X con aceite de inmersión por su pequeño tamaño (Foto 30). Esta técnica también permite visualizar a los macrófagos que han fagocitado al agente (de color negro) en la lámina propia.

Además en la luz de las glándulas se observaron polimorfonucleares y *Li* sueltas y fagocitadas en el interior de algunas células mononucleares constituyendo los abscesos criptales (Foto 31).



Foto 29. Reacción positiva en la zona apical del citoplasma del epitelio (Flecha), WS 40X.

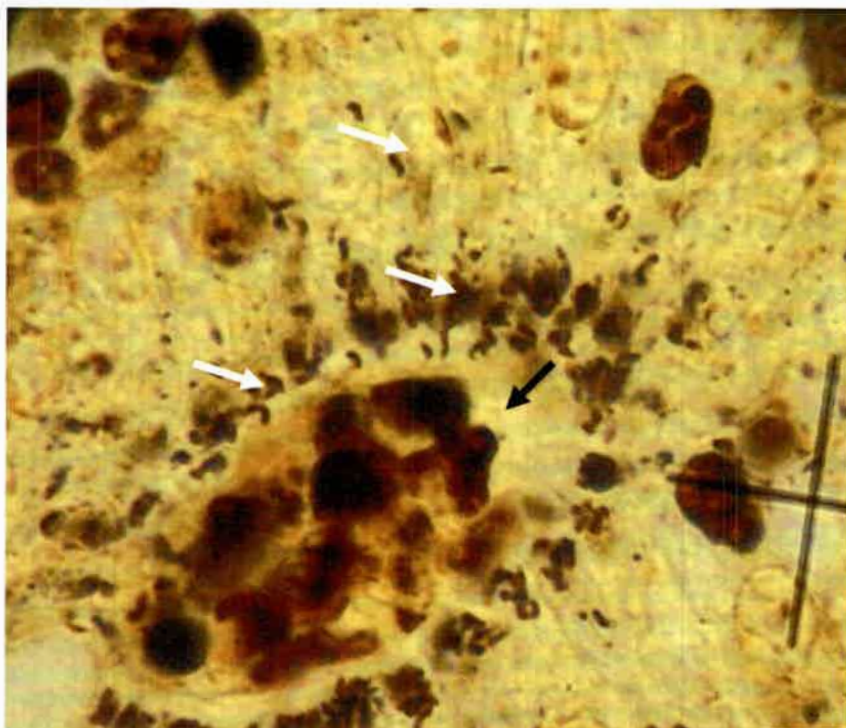


Foto 30. Estructuras bacterianas intracelulares con forma sigmoidea o coma de color negro (Flecha blanca), correspondientes a *Li*, absceso en la luz de la cripta (Flecha negra). WS 100X.



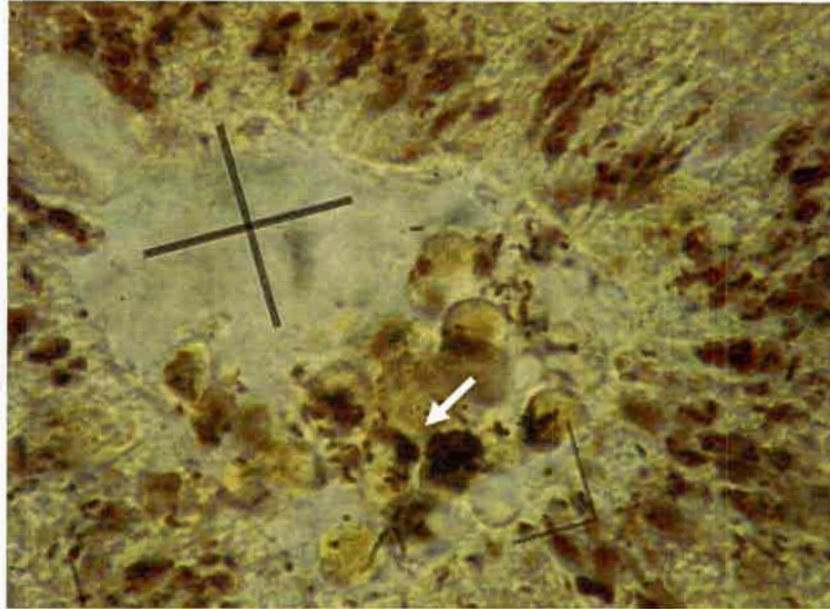


Foto 31. *Li* en la luz glandular, sueltas y fagocitadas dentro de células mononucleares (Flecha), WS 100X.

Las bacterias curvas de color negro en forma de S sigmoidea que se observaron en el interior de los enterocitos inmaduros de criptas alargadas y ramificadas corresponden con la descripción que se realiza de *Li* en otros reportes (Roberts y cols, 1980; McOrist y cols, 1993; Lawson y Gebhart, 2000; Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2002a; Zlotowski y cols, 2008; Sueyoshi y cols, 2010).

En el momento de hacer la observación de las muestras teñidas con WS, se encontraron bacterias con un tamaño y morfología similar a *Li* pero se visualizaban en la luz de las glándulas sueltas, no en el interior de los enterocitos. Al considerar que WS no es una tinción específica se decidió no incluirlas. Rodríguez y cols, (2004) indican que esta situación se ha reportado en la literatura, siendo motivo de confusión diagnóstica para muchos autores durante un largo tiempo y que estas bacterias podrían ser las causales de las lesiones inespecíficas encontradas, como hiperplasias no adenomatosas y necrosis de la punta de las vellosidades, lo que coincide con los hallazgos de este estudio.

A pesar de que algunos reportes indican que WS es una técnica complicada y que se requiere de experiencia para hacerla (Lawson y Gebhart, 2000; Ladining y cols,

2009), resultó ser una técnica rápida y simple, que podría ser aplicada de rutina cuando se observen trastornos proliferativos. Incluso se pudieron observar estructuras histológicas, trastornos patológicos e identificar células inflamatorias con gran precisión. Los únicos inconvenientes que presenta son: que no puede utilizarse en tejidos que presentan necrosis (Gebhart y Guedes, 2001) y que, como ya mencionamos, no es específica (Faine, S. 1965; Guedes y cols, 2002a). Con este último reporte coincidimos en que su sensibilidad se puede ver disminuida en los animales que presentan recuperación de las lesiones, ya que esta situación también expresada por McOrist y cols (1996), se produce, cuando las bacterias abandonan los enterocitos.

#### **4.4- Observación de *Lawsonia intracellularis* mediante técnicas de Inmunoperoxidasa en íleon**

Los animales fueron considerados positivos a IPX cuando se observó una reacción de color marrón en el interior del citoplasma apical de los enterocitos inmaduros de las criptas, en los macrófagos de la lámina propia, sitio donde el Ac específico reaccionó con el Ag (fotos 32, 37 y 38). Se utilizaron muestras como controles negativos.

Cinco animales fueron positivos a IPX y mostraron lesiones microscópicas compatibles con EPP. Solo un animal presentó dos lesiones, criptas alargadas e infiltrado mononuclear en lámina propia. Un animal mostró tres lesiones, presentando hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas e infiltrado mononuclear. Otro animal presentó cuatro lesiones atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas e infiltrado mononuclear y por último, un animal presentó cinco lesiones; las que incluyeron además de las anteriormente mencionadas, la ausencia de células caliciformes. En las Fotos 33 y 34 se observan criptas con indicios de recuperación con hiperplasia de células caliciformes que no presentan reacción positiva a IPX, la reacción si se da en criptas

que aún tienen hiperplasia del epitelio y en el infiltrado mononuclear de la lámina propia.

En algunos animales que ya no presentaban evidencias de infección en los enterocitos se observó solo reacción en unos pocos mononucleares de la lámina propia y la mayoría de los macrófagos infiltrados en la submucosa se encontraron de color marrón. Fotos 35 y 36.

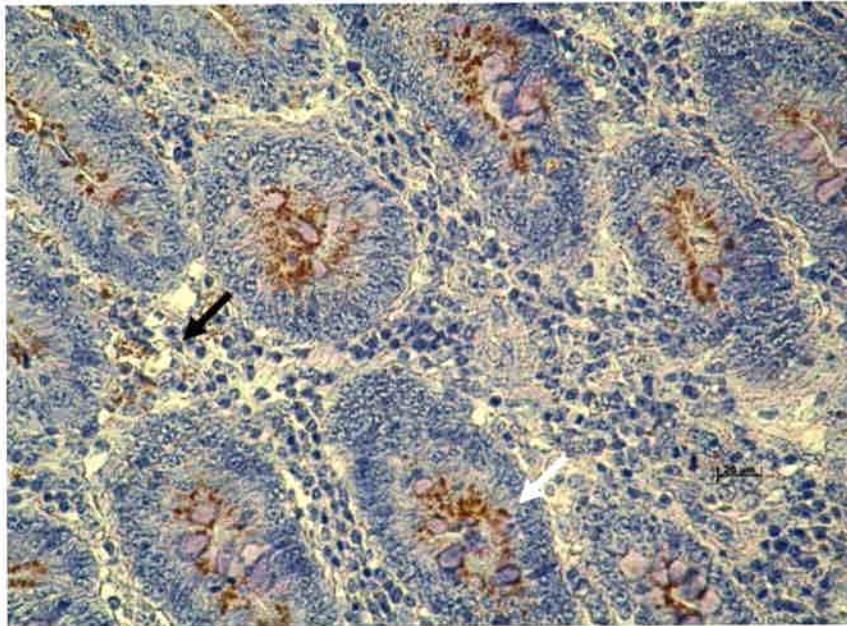


Foto 32. Reacción marrón en el citoplasma apical de los enterocitos de las criptas (Flecha blanca) y en algunas células mononucleares en la lámina propia (Flecha negra), IPX 40X.

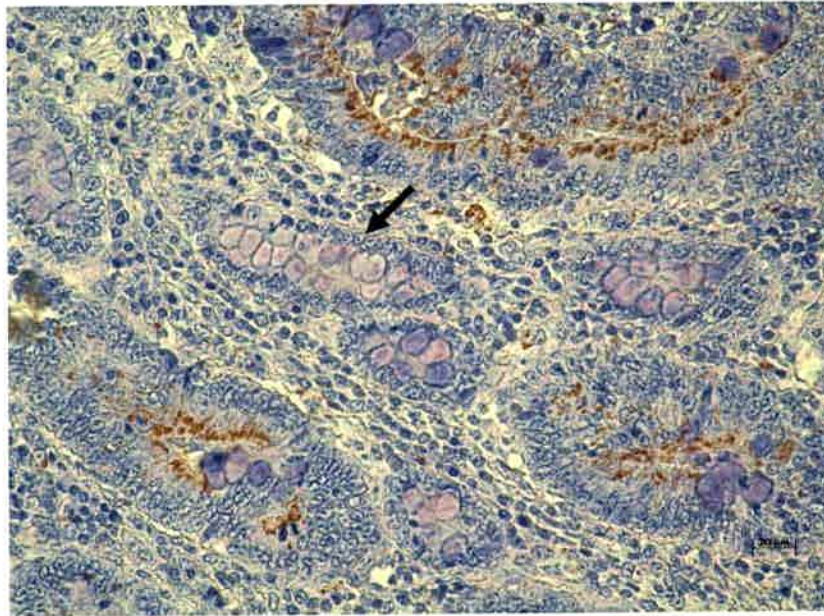


Foto 33. Obsérvese como las criptas que presentan hiperplasia de células caliciforme no presentan reacción (Flecha), IPX 40X.

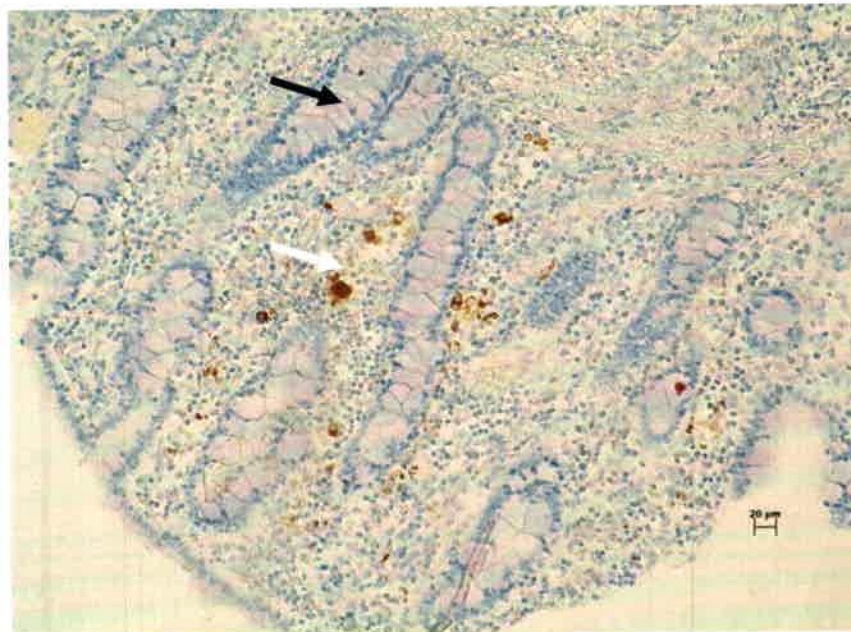


Foto 34. Hiperplasia de células caliciformes (Flecha negra) y reacción positiva en los macrófagos de la lámina propia, animal con recuperación de lesiones (Flecha blanca), IPX 20X.

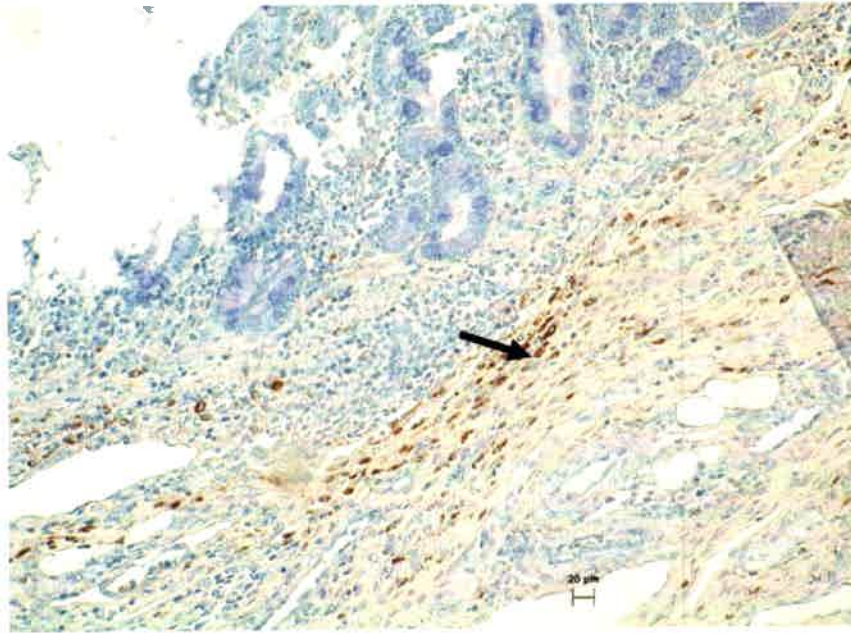


Foto 35. Se observa la lámina propia sin reacción y reacción positiva en los mononucleares de la submucosa (Flecha), IPX 20X.

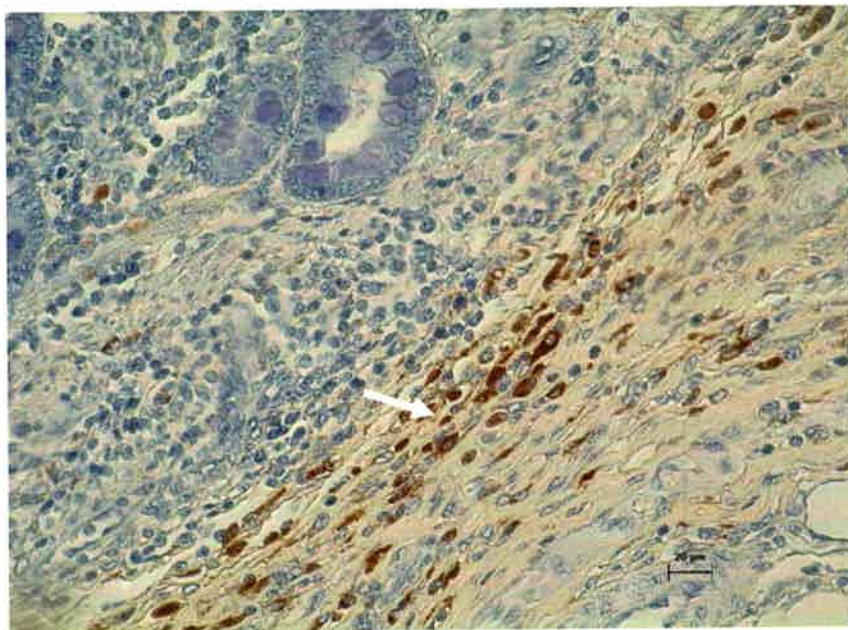


Foto 36. Reacción positiva en los macrófagos de la submucosa principalmente (Flecha), IPX 40X.

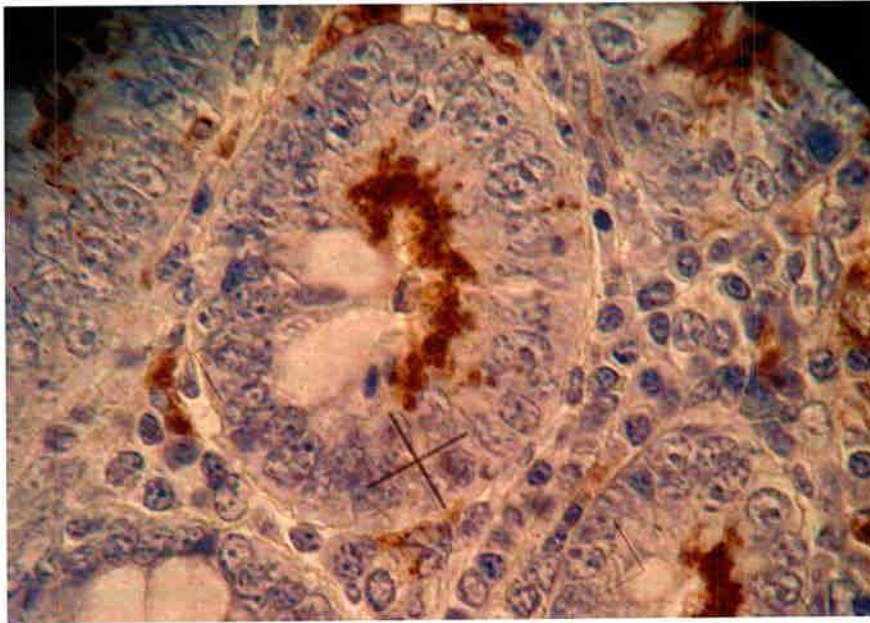


Foto 37. Reacción positiva en enterocitos y macrófagos, IPX 100x.

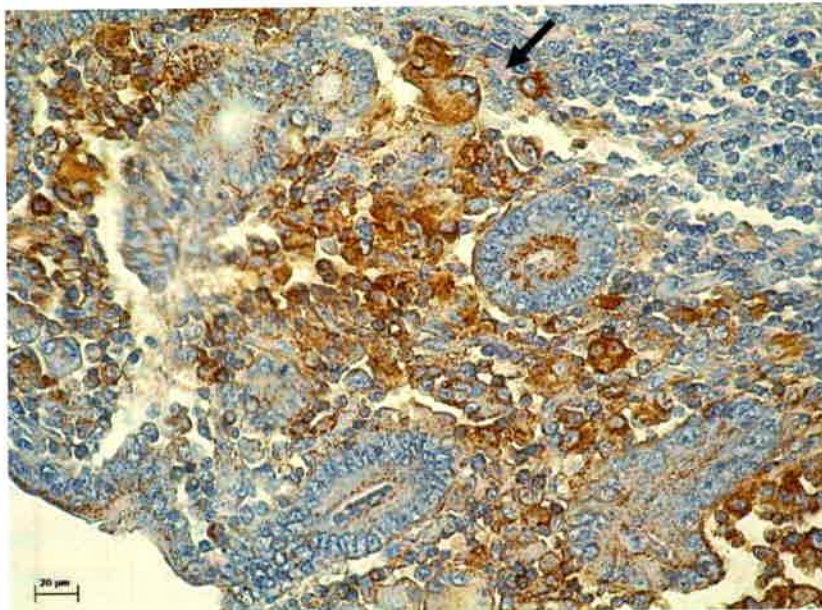


Foto 38. Reacción positiva en glándulas, macrófagos y células gigantes de la lámina propia (Flecha), IPX 40X.

Se acuerda con los numerosos estudios que indican que la prueba de oro para el diagnóstico histopatológico de infección por *Li* es el examen inmunohistoquímico

(Jensen y cols, 2010) ya que demuestra cambios en los tejidos, permite marcar *in situ* al antígeno bacteriano y revela la asociación de las bacterias con las lesiones. Son por lo tanto capaces de identificar diferentes etapas y grados de infección, tal como lo reporta Ladining y cols (2009).

En los intestinos con signos microscópicos de EPP, se observaron numerosos bacilos curvos de color marrón en el citoplasma apical de enterocitos proliferados y, a veces, en la luz de las criptas formando parte del exudado de los abscesos cristalinos, tal como lo describe McOrist y cols (1992) y en los restos de epitelio necrosado de la punta de las vellosidades (Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2002a).

También se observó reacción en el citoplasma de macrófagos y células gigantes infiltradas en la lámina propia, placas de Peyer y en submucosa, tal como lo describió Segales y cols (2001) y Jensen y cols, (2006) al sugerir a esta bacteria como causa de esta inflamación granulomatosa; en este caso la IPX permitió diferenciar estas enteritis de las producidas por PCV2 (Zlotowski y cols, 2008; Machuca y cols, 2010). Además, esta técnica es más sensible que la tinción de WS porque revela microorganismos en la etapa temprana de la infección (Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2004; Sueyoshi y cols, 2010) dentro de los enterocitos de lesiones microadenomatosas, dentro de los macrófagos de la lámina propia y submucosa durante la recuperación o sueltos en la luz de las glándulas debido a la lisis de las células hospedadoras infectadas (McOrist y cols, 1996; Guedes 2002a; van der Heijden y cols, 2004; Jensen y cols, 2010).

La localización de *Li* y la cantidad de inmunomarcación detectada por IPX varía según la etapa en que se encuentra la enfermedad, la cual se ajusta a la correlación que describen Guedes y cols (2002a, Ladining y cols (2009) y Brandt y cols (2010); donde la detección de *Li* en el epitelio intestinal y en los linfonódulos se correspondería a una infección de más de 3-4 semanas, mientras que su detección solo en linfonódulos correspondería a una infección de mayor duración, tal como se evidencia también en nuestro estudio. Algunos trabajos indican que IPX es la prueba diagnóstica más propicia

para detectar EPP en los animales que están en la etapa de recuperación de la enfermedad, cuando solo pequeñas cantidades de bacterias, principalmente extracelulares están presentes o solo en macrófagos de lámina propia o submucosa (Jensen y cols, 1997 en Ladinig y cols, 2009).

#### 4.5- Resultados de la técnica PCR en mucosa ileal

De las muestras tomadas de intestino para realizar PCR de mucosa, 3 muestras no fueron procesadas por inconvenientes laborales, de las restantes muestras, 4 animales (6,89%) fueron positivos, y 54 muestras (93,11%) fueron negativas.

En la tabla 7 se observa la distribución de las lesiones microscópicas encontradas en los animales PCR M positivo.

Tabla 7. Distribución de las lesiones microscópicas en los animales positivos a PCR M

2 lesiones		3 lesiones		4 lesiones	
N		N		N	
CAR e IM	1	HEC, CAR E IM	1	AV, HEC, CAR e IM	2

En nuestro trabajo los animales positivos a PCR de mucosa también fueron positivos a IPX y 2 de ellos también fueron detectados por WS. El animal que solo presentó dos lesiones microscópicas no fue revelado por WS porque como se observa en la tabla 7, no presenta hiperplasia del epitelio de las criptas, lo que estaría indicando que este animal está en la etapa de recuperación, por lo que *Li* no estaría presente en los enterocitos.

A diferencia de lo expresado en otros estudios, no se presentó la situación de observar muestras positivas a PCR de mucosa y que las mismas fueran negativas a IPX, en ese caso los autores indican que esos animales podrían estar en una etapa de enfermedad crónica donde la bacteria está presente en muy poca cantidad o ausente de los tejidos (Szczotka y Szczotka; 2009; Ladinig y cols, 2009). Además, podría dar resultados positivos en animales que han ingerido heces con *Li* de cerdos vecinos; por tal motivo, los reportes indican que PCR de mucosa positivo podría estar indicando la



presencia del genoma bacteriano por su gran sensibilidad, pero no la asociación entre la bacteria y las lesiones (Ladining y cols, 2009).

**4.6- Resultados de la técnica PCR en materia fecal**

En el caso del PCR MF no se procesaron 5 muestras por inconvenientes laborales, 15 muestras (26,79%) fueron positivas. Del resto, 41 animales (73,21%) fueron negativos.

En la tabla 8 se observa la distribución de las lesiones microscópicas encontradas en los animales PCR MF positivo.

Tabla 8. Distribución de las lesiones microscópicas en los animales positivos a PCR MF

1 lesión		2 lesiones		3 lesiones		4 lesiones	
	N		N		N		N
AV	1	AV e IM	1	AV, HEC y CAR	1	AV, HEC, CAR e IM	4
IM	2	HEC y CAR	2	HEC, CAR e IM	1		
		HEC e IM	1	AV, CAR e IM	1		
		CAR e IM	1				

Cabe destacar que los animales que fueron positivos a WS, IPX y PCR de mucosa también fueron positivos a PCR de materia fecal y 10 animales más fueron solo positivos a PCR de materia fecal. Al respecto algunos autores indican que la PCR tanto de mucosa como de materia fecal son los métodos más específicos y sensibles para detectar patógenos (Guedes, R. 2004). Sin embargo, hay que tener en cuenta que pueden dar resultados positivos clínicamente irrelevantes, a lo que algunos autores aconsejan considerarlos como falsos positivos, por tratarse de animales que ya no están infectados con un número significativo de bacterias (Ladining y cols, 2009). Por el contrario Jensen y cols (2010) afirman que se podría estar obteniendo mejores resultados si se examinara el colon, atribuyendo la descarga a la infección de una porción más distal del intestino. Si se consideran los eventos que ocurren en el intestino al momento de la recuperación de las lesiones microscópicas, la carga

bacteriana en los enterocitos disminuye rápidamente y en este caso IPX solo detecta Ag bacteriano en el citoplasma de macrófagos y células gigantes de la lámina propia y submucosa. A partir de este momento la eliminación de bacterias comienza a disminuir, la bibliografía demuestra que esto podría estar ocurriendo a partir de la semana 3-5 post infección (Brandt y cols, 2010) y prolongarse hasta por 10-12 semanas incluso de manera intermitente (Smith y McOrist, 1997; McOrist y cols, 1997; McOrist y Gebhart, 1999; Guedes y Gebhart, 2003a; Stege y cols, 2004; Jensen y cols, 2005), hecho que podría estar explicando los animales solo positivos a PCR de materia fecal.

#### **4.7- Observación de *Lawsonia intracellularis* mediante Microscopía Electrónica**

Se planteó realizar microscopía electrónica a todas las muestras, pero solo se pudo procesar parte de las muestras por lo que los resultados se presentan solo a manera descriptiva.

En las muestras procesadas no se encontraron bacterias intracelulares dentro del citoplasma apical de los enterocitos, pero sí encontramos criptas cuyos enterocitos contienen numerosos cuerpos apoptóticos y macrófagos en la luz de las mismas (Foto 39).

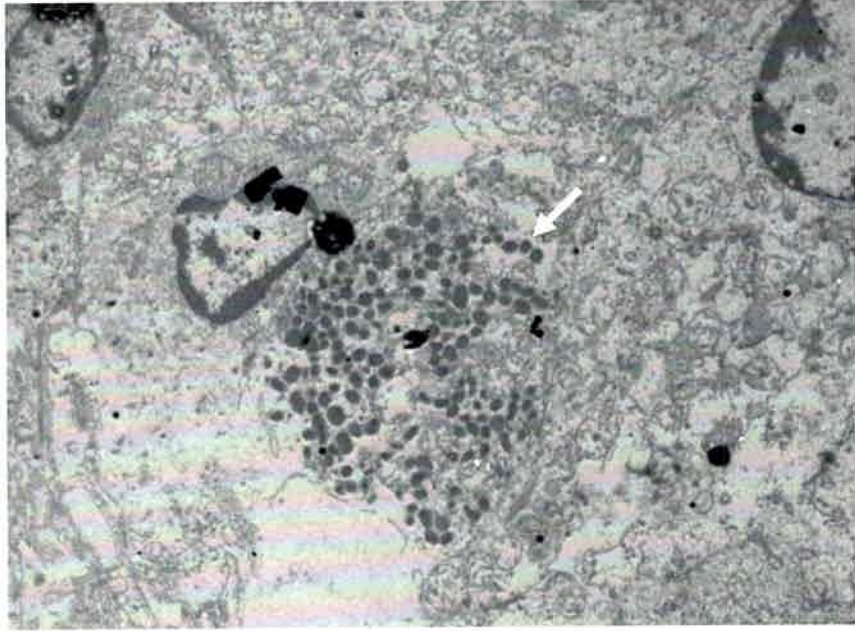


Foto 39. Se observa un enterocito con cuerpos apoptóticos (Flecha) y sin microvellosidades. ME 6.000X.

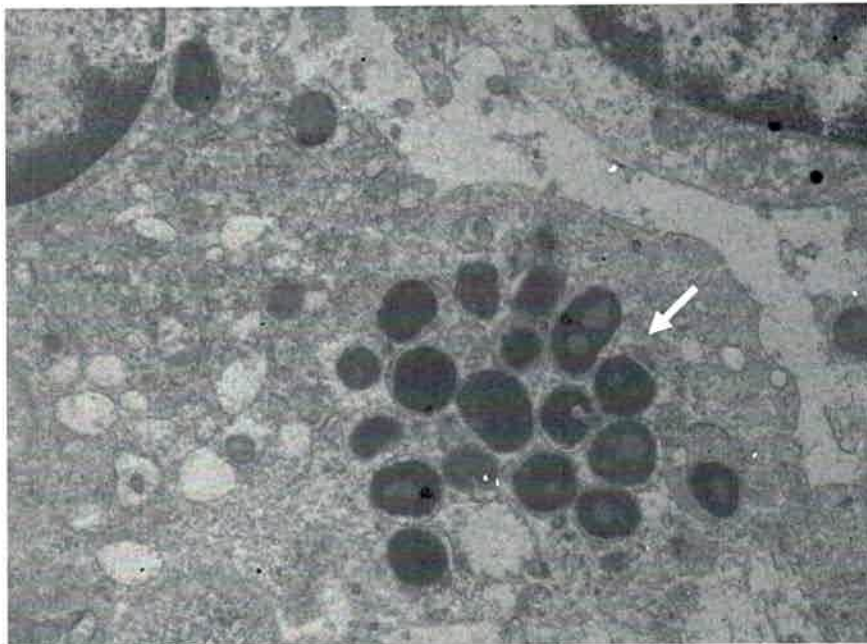


Foto 40. Se observan cuerpos apoptóticos en el interior de un enterocito (Flecha) sin bacterias en su interior y ausencia de microvellosidades. ME 10.000X.

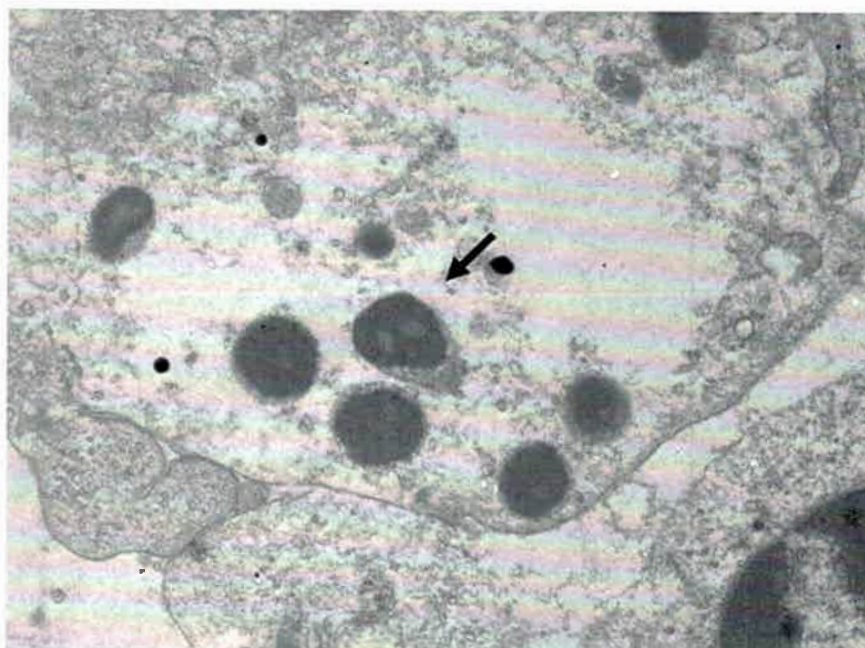


Foto 41. Se observan cuerpos apoptóticos en el interior de un enterocito (Flecha) sin bacterias en su interior a mayor aumento. ME 12.930x.

Al igual que McOrist y cols (1996) encontramos indicios de enterocitos en vías de recuperación. Algunas células pálidas y aumentadas de tamaño que protruyen hacia la luz y numerosos cuerpos apoptóticos en enterocitos sin *Li* y sin microvellosidades, también se observaron macrófagos en la cercanía de la mucosa y en la luz de las glándulas. Otros autores también han descrito estas características celulares y de los cuerpos apoptóticos (Riganti y cols, 1999; Brandt y cols, 2010).

#### **4.8- Comparación de resultados por diferentes técnicas y lesiones**

En la tabla 9 se observan los resultados obtenidos por las distintas técnicas histoquímicas y moleculares en íleon, en muestras con y sin lesión histopatológica.

Tabla 9. Resultados obtenidos por WS, IPX y PCR de mucosa y de materia fecal en muestras con y sin lesión microscópica en íleon (S/L: sin lesión, C/L: con lesión)

HE	WS+	IPX+	PCR M+	PCR MF+
S/L (n=2)	0/2	0/2	0/2	0/2
C/L (n=58)	2/58	5/58	4/56	15/54

Solo dos animales no presentaron ningún tipo de lesión histopatológica (S/L HE) y fueron considerados como negativos a *Li* a las distintas pruebas diagnósticas. Cabe

destacar que estos animales no presentaron lesiones macroscópicas ni en mesenterio ni en íleon, solo manifestaron un aumento de tamaño de los linfonódulos por edema, lesión que se consideró inespecífica.

En la tabla 9 también puede verse una gran cantidad de animales que presentaron lesiones microscópicas (C/L HE) y en los que las técnicas se comportaron de distinta manera a la hora de detectar la presencia de *Li* en la mucosa o en materia fecal. Esto será analizado más adelante.

A continuación se detallan los resultados de animales con y sin lesión macroscópica en íleon (tabla 10), en relación a la distribución de las lesiones microscópicas halladas y el resultado de las distintas técnicas diagnósticas.

Tabla 10. Relación entre hallazgos macroscópicos en íleon, lesiones microscópicas y demás técnicas aplicadas en íleon en los 61 animales.

Lesión macroscópica	Lesión microscópica						WS+	IPX+	PCR M+	PCR MF+
	0	1	2	3	4	5				
S/L(n=15)	0/14	3/14	3/14	6/14	2/14	0/14	0/14	0/14	0/14	4/13
C/L(n=46)	2/46	8/46	14/46	19/46	2/46	1/46	2/46	5/46	4/44	11/43

\* un animal S/L en íleon no pudo ser procesado por: H/E, WS, IPX, PCR M y PCR MF, y otro, C/L no se procesó para PCR MF.

De los 15 animales que no presentaron lesión macroscópica (S/L macro) en íleon, solo uno presentó hiperemia y aumento de tamaño en linfonódulo mesentérico, todos fueron negativos a WS, IPX y PCR M. Cuatro animales fueron positivos al PCR MF, dos presentaron lesiones microscópicas en diferente grado: atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas y criptas alargadas y ramificadas (muestras 1 y 34) y solo exhibieron algún trastorno circulatorio en mesenterio o linfonódulo como lesión macroscópica, los otros dos solo mostraron un trastorno microscópico (muestras 2 y 3). Además, cabe destacar que la mayoría de estos animales presentaron hiperplasia de células caliciformes y que, en su momento, se los consideró animales en vías de recuperación (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de las lesiones microscópicas en 4 cerdos sin lesión macroscópica y solo positivos a PCR MF.

Muestra	AM	IE	EM	HM	LH	LA	AV	HEC	CAR	AC	IM	WS	IPX	PCR M	PCR MF
1	normal	NO	NO	SI	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO	-	-	-	+
2	normal	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	-	-	-	+
3	normal	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	-	-	-	+
34	normal	NO	NO	NO	SI	NO	SI	SI	SI	NO	SI	-	-	-	+

AM: Apariencia de la Mucosa, EI: engrosamiento de la mucosa, EM: Edema de mesenterio, HM: Hiperemia de mesenterio, HL: Hiperemia linfonódulo, LA: Linfonódulo aumentado de tamaño

También se analizó a los animales que fueron positivos solo a PCR de materia fecal y presentaron lesiones macroscópicas y microscópicas (Tabla 12). La mayoría presentó mucosa corrugada, salvo uno que fue normal (muestra 15), 4 presentaron engrosamiento de íleon (muestras 8, 31, 49 y 52), 2 tuvieron edema de mesenterio (muestra 49 y 52), 4 con linfonódulos aumentados de tamaño (muestras 8, 15, 31 y 41); las lesiones microscópicas que más se manifestaron fueron la hiperplasia del epitelio de las criptas en 4 animales (muestras 8, 15, 31 y 49), las criptas alargadas y ramificadas en 3 cerdos (muestras 8, 31 y 49) y el infiltrado mononuclear en 4 (muestras 15, 41, 49 y 52).

Tabla 12. Distribución de las lesiones microscópicas en 6 cerdos, con lesiones macroscópicas y solo positivos PCR MF.

Muestra	AM	EI	EM	HM	HG	GA	AV	HEC	CAR	AC	IM	WS	IPX	PCR M	PCR MF
8	corrugada	SI	NO	NO	SI	SI	NO	SI	SI	NO	NO	-	-	SM	+
15	normal	NO	NO	SI	SI	SI	NO	SI	NO	NO	SI	-	-	-	+
31	corrugada	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	SI	NO	NO	-	-	-	+
41	corrugada	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	NO	NO	SI	-	-	-	+
49	corrugada	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI	SI	NO	SI	-	-	-	+
52	Toalla	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	-	-	-	+

Esto podría estar indicando que en aquellos animales con escasas o nulas lesiones macroscópicas y microscópicas, y que son positivos a PCR MF, se estaría realizando la descarga de bacteria en materia fecal; pero *Li* no estaría presente en la mucosa por resolución de la infección activa, a partir del día 28 post infección aproximadamente (Guedes y cols, 2002a; Ladining y cols, 2009; Szczotka y Szczotka, 2009; Jensen y cols, 2010) y por eso IPX y PCR M no podrían identificarlas.

Como ya se mencionó, la excreción de *Li* en materia fecal puede hacerse por varias semanas, Brandt y cols (2010) demostraron su liberación en forma regular por 7 semanas. Estos autores indicaron una alta frecuencia de cerdos IPX positivos entre las semanas 8 y 13, que fue disminuyendo a partir de la semana 13 post infección, hasta que a la semana 26 ningún cerdo fue positivo a IPX. Esto fue interpretado como una recuperación; incluso indicando que las alteraciones intestinales desaparecen después de 3 a 4 semanas, aunque la bacteria puede ser detectada por IPX por más tiempo, especialmente en tejido linfoide.

Ladining y cols, (2009) detectaron por PCR la eliminación de *Li* en materia fecal, pero los animales fueron considerados como “falsos positivos” al resultar negativos a PCR de raspado de mucosa, y concluyeron que esto se debió a una contaminación durante la extracción de ADN.

Los 46 cerdos que presentaron lesión macroscópica a la necropsia (C/L macro) (Tabla 10), presentaron hasta 5 lesiones microscópicas y las técnicas los determinaron de diferente manera. Treinta y cinco de ellos fueron negativos a todas las técnicas diagnósticas empleadas, tanto en mucosa como en materia fecal. Los otros 11 fueron positivos a PCR MF, además cinco animales también fueron positivos a IPX, cuatro a PCR M y dos a WS.

De los 35 animales con lesión macroscópica 33 tenían algún tipo de lesión descrita para EPP, resultando ser negativos a todas las pruebas diagnósticas. Al respecto se coincidió con los reportes que indican que el examen macroscópico no es adecuado para el diagnóstico de EPP por si solo, y que el examen histopatológico,

permitiría identificar lesiones típicas de Adenomatosis intestinal y resolución de lesiones (Huertas y cols, 2003). También podría tratarse de otra etiología que produce lesiones proliferativas similares pero que macroscópicamente son casi indistinguibles, como PCV-2, según lo indican varios autores (Jensen y cols, 2006).

En la tabla 13 se observa que los cinco animales que fueron positivos IPX y además fueron positivos PCR de mucosa (solo 4 porque faltó procesar una muestra), manifestaron lesiones macroscópicas descritas para *Li* como: engrosamiento en íleon (muestras 5, 6, 50 y 51), aspecto de la mucosa cerebroide o corrugada, aumento de tamaño de los linfonódulos mesentéricos (muestras 5, 6, 50 y 51), pero ninguno presentó edema de mesenterio. Dentro de las lesiones histopatológicas se observó atrofia de vellosidades (muestras 4, 5, 6 y 50), criptas alargadas y ramificadas (muestras 4, 5, 6, 50 y 51), infiltrado mononuclear (muestras 4, 5, 6, 50 y 51), hiperplasia del epitelio de las criptas (muestras 4, 5 y 50) y solo uno presentó ausencia total de caliciformes (muestra 4). Debemos destacar que todos estos cerdos fueron además, positivos a PCR de materia fecal y que dos (muestras 4 y 5) fueron también positivos a WS.

Tabla 13. Distribución de las lesiones anatomopatológicas y microscópicas en 5 cerdos IPX, PCR M positivos y PCR MF positivos.

Muestra	AM	EI	EM	HM	LH	LA	AV	HEC	CAR	AC	IM	WS	IPX	PCR M	PCR MF
4	corrugada	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	+	+	SM	+
5	cerebroide	SI	NO	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	+	+	+
6	corrugada	SI	NO	NO	SI	SI	SI	NO	SI	NO	SI	+	+	+	+
50	Toalla	SI	NO	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	-	+	+	+
51	corrugada	SI	NO	NO	NO	SI	NO	NO	SI	NO	SI	-	+	+	+

\* Animales también positivos a WS

En este caso se trata de animales enfermos, ya que tanto las técnicas diagnósticas aplicadas sobre mucosa como sobre materia fecal fueron capaces de detectarlos. Aquí se evidenció la menor sensibilidad de la técnica de WS, aun con



lesiones macro y microscópicas evidentes, ya que no fue capaz de detectar *Li* dentro de los macrófagos de la lámina propia o submucosa en animales en recuperación, en concordancia con lo expresado por Guedes y cols (2002a) y Ladinig y cols (2009) y en contraste con otros estudios en donde WS tuvo mayor sensibilidad que HE (Huerta y cols, 2003).

#### **4.9- Análisis Estadístico**

El estudio estadístico se realizó a través del análisis de contingencia para variables categorizadas, útiles para comparar dos o más variables categorizadas del programa InfoStat versión 2010 (Di Rienzo y cols, 2010).

Al analizar los resultados se observó que las lesiones macroscópicas no eran adecuadas por sí solas para diagnosticar EPP, por lo que primeramente se analizó la asociación de las lesiones macroscópicas, color y consistencia con las demás técnicas.

En primer lugar se analizó si existió asociación entre las lesiones macroscópicas de íleon, mesenterio, linfonódulo (hiperemia en íleon, apariencia en la mucosa, engrosamiento en la pared, edema e hiperemia en mesenterio, edema e hiperemia en linfonódulo, aumento de tamaño de linfonódulo) y las lesiones microscópicas (Atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas, ausencia de caliciformes e infiltrado mononuclear) encontradas en íleon. Y en segundo lugar si existió asociación entre las lesiones macroscópicas e IPX.

Tabla 14. Resultados del análisis de tablas de contingencia para lesiones macroscópicas y lesiones microscópicas.

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	750,06	720	0,2122
Chi Cuadrado MV-G2	276,37	720	>0,9999
Coef.Conting.Cramer	0,88		
Coef.Conting.Pearson	0,96		

Como se puede observar en la tabla 14, el valor de p del estadístico Chi cuadrado de Pearson fue 0.2122 por lo que se estableció que no hubo diferencias

significativas entre la presencia de todas las lesiones macroscópicas halladas y las lesiones microscópicas proliferativas de intestino.

Tabla 15. Resultados del análisis de tablas de contingencia para lesiones macroscópicas e IPX.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	84,29	96	0,7977
Chi Cuadrado MV-G2	39,08	96	>0,9999
Coef.Conting.Cramer	0,68		
Coef.Conting.Pearson	0,76		

En la tabla 15, se observa a un valor de p del estadístico Chi cuadrado de Pearson de 0,7977 que no hay asociación entre las lesiones macroscópicas y la IPX.

Esto coincide con lo expresado anteriormente donde varios estudios indicaron que el examen macroscópico post mortem tuvo un valor limitado para el diagnóstico de *Li* (Huerta y cols, 2003; Ladinig y cols, 2009).

Luego se analizó la asociación entre el color y la consistencia de la materia fecal y la presencia de lesiones microscópicas y entre color y consistencia de las heces e IPX.

Tabla 16. Resultados del análisis de tablas de contingencia para color y consistencia y lesiones microscópicas.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	237,25	210	0,0954
Chi Cuadrado MV-G2	142,19	210	0,9999
Coef.Conting.Cramer	0,51		
Coef.Conting.Pearson	0,89		

En la tabla 16, se observa que el valor p del estadístico Chi cuadrado de Pearson fue 0.0954 por lo que se estableció que no hubo relación significativa entre la consistencia y el color de las heces y la presencia de lesiones microscópicas.

Tabla 17. Resultados del análisis de tablas de contingencia para color y consistencia de las heces e IPX.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	16,55	28	0,9569
Chi Cuadrado MV-G2	12,78	28	0,9938
Coef.Conting.Cramer	0,30		
Coef.Conting.Pearson	0,46		

Aquí tampoco se observa asociación entre el color y la consistencia de las heces e IPX ( $p= 0,9569$ ).

Esto coincide con lo expresado por algunos autores que indican que la diarrea es crónica e inespecífica (Wilson y cols, 1986; Guedes y cols, 2002a).

A continuación se analizó la asociación entre las lesiones microscópicas de íleon y la presencia de bacteria intracelular determinada por las distintas técnicas diagnósticas aplicadas en mucosa de íleon y en materia fecal.

- Análisis de relación entre las lesiones microscópicas (Atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas, ausencia de caliciformes e infiltrado mononuclear) y la tinción de WS.

Tabla 18. Resultados del análisis de tablas de contingencia para lesiones microscópicas y WS.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	100,97	30	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	23,92	30	0,7755
Coef.Conting.Cramer	0,74		
Coef.Conting.Pearson	0,79		

En la tabla 18 se observa un valor  $p < 0.0001$ , lo que indica que hay relación entre las lesiones microscópicas encontradas y la presencia de *Li* en el interior de los enterocitos inmaduros, determinada en este caso por la tinción de WS.

Esto concuerda con los reportes que indican que el hecho de hallar una asociación estadística significativa entre la presencia de lesiones microscópicas típicas de EPP y el hallazgo frecuente de microorganismos intracelulares con las características morfológicas y de coloración de la bacteria *Li*, permitiría concluir que la enfermedad se encuentra presente (Rodríguez y cols, 2004). También coincidimos con lo expresado por Jones y cols (1993a) que encontraron una alta relación entre el microorganismo intracelular (determinado por WS) y los cambios proliferativos en la mucosa a un nivel de significancia alta ( $p=0,008$ ).

- Análisis de relación entre las lesiones microscópicas (Atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas, ausencia de caliciformes e infiltrado mononuclear) y la tinción de IHQ

Tabla 19. Resultados del análisis de tablas de contingencia para lesiones microscópicas e IHQ.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	84,73	30	<0,0001

Chi Cuadrado MV-G2	28,16	30	0,5617
Coef.Conting.Cramer	0,68		
Coef.Conting.Pearson	0,76		

En la tabla 19, se presentan los resultados de la relación entre las lesiones microscópicas y la técnica de IHQ. Se evidencia que también hay asociación significativa entre las lesiones microscópicas y la presencia de la bacteria determinada por IHQ ( $p < 0.0001$ ).

Al igual que Jensen y cols (2010) consideramos que la IPX es la prueba de elección para el diagnóstico histopatológico de infección por *Li*, ya que marcó *in situ* al antígeno bacteriano, reveló cambios en los tejidos y permitió determinar la asociación de las bacterias con las lesiones.

- Análisis de relación entre las lesiones microscópicas (Atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas, ausencia de caliciformes e infiltrado mononuclear) y PCR de mucosa.

Tabla 20. Resultados del análisis de tablas de contingencia para lesiones microscópicas y PCR M.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	70,29	30	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	37,71	30	0,1574
Coef.Conting.Cramer	0,62		
Coef.Conting.Pearson	0,73		

La asociación entre la presencia de las lesiones microscópicas en intestino y la presencia de bacterias intracelulares por PCR de mucosa fue significativa ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 20).

Varios autores coinciden en que PCR de mucosa ileal es tan sensible como IPX, aún en casos sospechosos de EPP sin engrosamiento o cambios histopatológicos visibles (Gebhart y Guedes, 2001; Guedes y cols, 2002a; Ladinig y cols, 2009). A pesar de que en nuestro estudio varios animales se encontraron en la etapa de recuperación, fue capaz de detectarlos, aún con un número poco significativo de reacción como lo determinó IPX. Quizás por esto, sea conveniente para ser utilizada en estudios epidemiológicos, al detectar infecciones subclínicas (Ladinig y cols, 2009).

- Análisis de relación entre las lesiones microscópicas (Atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas, ausencia de caliciformes e infiltrado mononuclear) y PCR de materia fecal

Tabla 21. Resultados del análisis de tablas de contingencia para lesiones microscópicas PCR MF.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	39,30	30	0,1191
Chi Cuadrado MV-G2	36,13	30	0,2037
Coef.Conting.Cramer	0,46		
Coef.Conting.Pearson	0,63		

Como se puede observar en la tabla 21, el valor  $p=0.1191$  indica que no hay relación significativa entre la presencia de las lesiones microscópicas y la presencia de la bacteria en materia fecal detectada por PCR de materia fecal.

A diferencia de lo expresado por Jones y cols (1993a) en este estudio no se encontró una asociación significativa entre la presencia de *Li* en las descargas fecales y las lesiones microscópicas proliferativas.

Por lo que se analizó la asociación entre IPX y PCR de materia fecal como se observa en la tabla 22.

Tabla 22. Resultados del análisis de tablas de contingencia para IPX y PCR MF.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	27,95	4	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	20,53	4	0,0004
Coef.Conting.Cramer	0,39		
Coef.Conting.Pearson	0,56		

Aquí si se encontró asociación significativa entre IPX y PCR MF, a un valor  $p<0.0001$ . Como ya se mencionó, PCR MF podría estar detectando descarga de *Li* en materia fecal de animales que están enfermos, animales en recuperación o animales que han ingerido *Li* de heces contaminadas pero que no están desarrollando enfermedad en ese momento; por lo que no se encontró asociación significativa entre las lesiones microscópicas y la descarga de *Li*. Al respecto se coincide con la conclusión expresada por Guedes y Gebhart (2003a) que indica que estos animales que realizan descargas a largo plazo en las heces, son cerdos

infectados sin signos clínicos aparentes, que actuarían como reservorio manteniendo la carga en el ambiente de *Li*.

Por último al revisar la bibliografía se observó que algunos autores indicaban que las variables podían comportarse de diferente manera en cuanto a lo que aportan a la presentación de la enfermedad, por lo que se analizó que sucedía cuando solo algunas variables eran consideradas, como: engrosamiento de la pared intestinal, aumento de tamaño del linfonódulo, todas las lesiones microscópicas (Atrofia de vellosidades, hiperplasia del epitelio de las criptas, criptas alargadas y ramificadas, ausencia de caliciformes e infiltrado mononuclear) e IHQ.

Tabla 23. Resultados del análisis de tablas de contingencia para pared intestinal engrosada, aumento de tamaño del linfonódulo, lesiones microscópicas e IHQ.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	98,71	68	0,0088
Chi Cuadrado MV-G2	34,58	68	0,9998
Coef.Conting.Cramer	0,73		
Coef.Conting.Pearson	0,79		

Al analizar la asociación entre el aumento de tamaño de intestino y linfonódulo, las lesiones proliferativas en íleon y la presencia de bacteria intracelular en la mucosa por IPX se observó una relación significativa ( $p=0.0088$ ).

En este punto se concuerda con Jones y cols (1993a) que demostró asociación entre un intestino macroscópicamente engrosado y la presencia de cambios proliferativos y microorganismos intracelulares con una significancia a un valor  $p=0.0078$ . Estos autores además indican que la asociación fue altamente significativa si el edema de mesenterio también estaba presente, pero en este estudio ningún animal positivo a IHQ presentó edema de mesenterio. Las demás variables macroscópicas analizadas tampoco presentaron asociación con las lesiones microscópicas e IHQ.

**CAPITULO V**  
**CONCLUSIONES**

Por los hallazgos encontrados en este estudio se puede concluir que:

- ✓ Las lesiones macroscópicas en general, el color y la consistencia de las heces no permiten caracterizar la EPP, por lo tanto no pueden ser utilizadas como únicas herramientas de diagnóstico.
- ✓ Los estudios microscópicos se hacen necesarios para dar diagnóstico presuntivo de EPP ya que dan información sobre la existencia de la enfermedad, la presencia del agente etiológico, la patogenia, la respuesta inflamatoria y la recuperación del tejido.
- ✓ La respuesta inflamatoria se caracteriza por presencia de células inflamatorias de tipo mononuclear, células gigantes e histiocitos en lámina propia del íleon distal, depleción linfoidea en folículos de Placas de Peyer, abscesos cristales y linfocitos intraepiteliales infiltrados entre los enterocitos hiperplásticos de las criptas de la mucosa ileal.
- ✓ Las criptas de la mucosa ileal en vías de recuperación se caracterizan por hiperplasia de células caliciformes.
- ✓ El aumento de tamaño del íleon, de los linfonódulos y las lesiones microscópicas proliferativas típicas son una herramienta confiable a la hora de caracterizar la EPP cuando son utilizadas en forma conjunta en el examen post mortem.
- ✓ La técnica de WS resultó ser rápida y simple en su desarrollo y permitió identificar, además del agente etiológico, estructuras histológicas, patológicas y la respuesta celular.
- ✓ La técnica de IPX es la prueba de oro para el diagnóstico histopatológico de *Li*, permitió identificar diferentes etapas en la patogenia de la enfermedad y grado de infección. Además, permitió determinar la asociación entre la presencia de la bacteria y las lesiones macroscópicas y las lesiones proliferativas microscópicas. Su aplicación es relativamente sencilla.



- ✓ La técnica de PCR de mucosa ileal permitió identificar animales con poca cantidad de *Li* en mucosa y su asociación con las lesiones, por lo que su aplicación puede ayudar a determinar infecciones subclínicas. La técnica de PCR de materia fecal permitió identificar animales que siguen eliminando bacterias de manera intermitente por varias semanas.
- ✓ La microscopía electrónica permitió identificar animales con signos de recuperación con enterocitos con numerosos cuerpos apoptóticos, sin microvellosidades, sin *Li* en su interior y con macrófagos en la luz glandular.

Se hace necesario seguir estudiando la patogenia de la enfermedad ya que se observaron varios puntos que aún no están totalmente claros. Más aún pensando que otros agentes, como PCV-2 y/o PRRS, presentan lesiones y respuestas celulares similares y que podrían estar actuando en forma concomitante en los criaderos confinados y quizás, hasta formando parte de un síndrome.

## **ANEXOS**

**Anexo 1- PROTOCOLO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS LESIONES ANATOMO-PATOLÓGICAS.**

Nombre del Establecimiento:.....

N° de Ficha:.....

<b>Mesenterio</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>
Hiperemia		
Edema		
<b>Linfonódulos</b>		
Edema		
Hiperemia		
Aumento de tamaño		
<b>Ileon</b>		
Engrosamiento pared ileon		
Hiperemia		
Engrosamiento de la mucosa		
Apariencia de la mucosa		
- normal		
- corrugada		
- cereboide		
- toalla*		
Superficie de la mucosa		
- Sin particularidades		
- Edema		
- Moco		
- Necrosis superficial		
- Fibrina		
Contenido de la luz intestinal		
- Acuoso		
- Sangre digerida		
- Sangre fresca		
- Alimento no digerido		
- Cremoso		
- Pastoso		
<b>Heces</b>		
Consistencia		
- Normal		
- Patosa		
- Cremosas		
- Líquidas		
Color		
- Amarillo		
- Amarillo verdoso		
- Beage		
- Gris verdoso		
- Gris cemento		
- Rojo		
- Chocolate		

\* Hiperplasia de Placas de Peyer

## **Anexo 2- PROTOCOLO DE TINCIÓN DE HEMATOXILINA EOSINA.**

### **Preparación de la solución de Stock para preparar Eosina**

1 gr de eosina.....99 ml de etanol al 70%

### **Preparación de la solución de trabajo de Eosina**

1ml de solución de stock.....15 ml de agua destilada

Una vez mezcladas las soluciones, se dejó reposar y se filtró.

A continuación, las muestras que se encontraban en agua bidestilada, fueron colocadas 2-3 minutos en solución de hematoxilina activada y se lavaron por 1 minuto en agua corriente. Luego se colocaron por 2-3 minutos en solución de eosina y se lavaron, nuevamente, con agua corriente por 1 minuto. Finalmente, los cortes de íleon se deshidrataron en graduaciones crecientes de alcohol, alcohol-xilol y xilol y se montaron con medio de montaje Entellán (Merk®).

### **Anexo 3- PROTOCOLO DE TINCIÓN DE WARTHING STARRY.**

1- Preparar 1000 cc de agua bidestilada acidificada a pH 3,8 a 4,2

2- Ajustar pH usando ácido acético

3- Rehidratar las muestras 2 min. en agua acidificada.

4- Solución de Plata al 1% para impregnación

Disolver por unos minutos a Baño María de 45° C:

Nitrato de Plata (Cicarelli®)..... 1 gr

Agua acidificada..... 100 cc

Sumergir los preparados por 30 minutos en oscuridad para su impregnación.

5- Mientras tanto en estufa a 60° C se disuelven por separado:

- Solución de Nitrato de Plata al 2%:

Nitrato de Plata.....0,50 grs

Agua acidificada .....25 cc

- Gelatina para microbiología (Merk®)

Gelatina..... 2,5 grs

Agua acidificada..... 50 cc

- Hidroquinona (Cicarelli®)

Hidroquinona..... 0,037 grs

Agua acidificada..... 25 cc

Mantener el resto del agua acidificada a 60° C (reservar para lavado).

6- Cinco minutos antes de que termine la impregnación debe realizarse la solución de revelado que se obtiene de mezclar:

Hidroquinona.....24 cc

Gelatina .....45 cc

Nitrato de Plata al 2%..... 18 cc

Mezclar en el momento de ser usado, agitar suavemente y mantenerla a 60° C en estufa hasta el momento de sumergir las muestras.

7- Colocar las muestras en la solución de revelado a 60° C por unos minutos hasta obtener un color marrón caramelo

8- Lavar las muestras con el agua acidificada caliente que se reservó.

9- Lavar con agua destilada fría.

10- Montar directamente con medio acuoso de Glicerol Fosfato pH 8.

Preparación del Glicerol Fosfato:

PBS..... una parte

Glicerol..... .nueve partes

#### **Anexo 4- PROTOCOLO DE INMUNOPEROXIDASA.**

##### Soluciones provistas con el Kit:

- Peroxido de H 3%. PEROXIDASE BLOCK. Peroxido de hidrógeno al 3 % en agua.
- Solución de enlace. BIOTINYLATED LINK. Inmunoglobulinas Anti-conejo, anti-ratón y anti-oveja biotiniladas en PBS.  
Estreptavidina peroxidasa. STREPTAVIDIN-HRP. Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante en PBS.
- Tampón sustrato. DAB+SUBSTRATE BUFFER. Solución de buffer sustrato, pH 7,5, con peroxido de H.
- DAB cromógeno. DAB+CHROMOGEN. 3,3'-diaminobenzidina.

##### Preparación de soluciones de trabajo

- Preparación Tween 20 a partir de Tween 80.

Para preparar 100cc de Tween 20:

Tween 80 .....0,0125 ml

Agua destilada.....99,98 ml

- Preparación de la solución de lavado. Tris Buffer Salino con Tween 20 al 0,05 mol/l (TBST)

Trisma base ..... 6,1 grs.

Agua destilada..... 1000 cc.

Ajustar pH 7,6 usando HCL y luego agregar 0,5 ml de Tween 20. Almacenar a 2-8°C. Desechar la solución si presenta aspecto turbio.

- Preparación PBS. pH 7,2

Agua bidestilada.....1000 cc.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1,48 gr.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,43 gr.

ClNa.....7,20 gr.

- Preparación de Proteinasa K (DakoCytomation, Código S3004)

Mezclar 1 gota de Proteinasa K en 2 ml 0,05 mol/l Tris HCL pH 7.5 a 7,7.

Conservar a 2-8° C.

- Preparación Glicerol Fosfato. pH 8

PBS.....1 parte

Glicerol.....9 partes

- Preparación de la solución sustrato-cromógeno. 1ml alcanza para 4 a 7 muestras.

Colocar 1 ml de solución tampón sustrato (DAB+SUBSTRATE BUFFER) al tubo de ensayo calibrado según la cantidad de preparados a procesar. Por cada ml de solución tampón agregar 1 gota de DAB cromógeno (DAB+CHROMOGEN). Mezclar minuciosamente y utilizar inmediatamente. La solución se mantiene estable 2 semanas a 2-8° C. La calidad de la tinción no se afecta con la aparición de precipitado.

Todos los reactivos deben atemperarse a 20-25° C previamente. Si debe interrumpirse el protocolo de tinción hacerlo sumergiendo las muestras en solución tampón (paso enlace) hasta 1 hora.

### Protocolo de tinción

- 1- Desparafinado. Cambiar la batería cada 200 muestras.

- 2 baños de xilol de 5 minutos cada uno.

- 3 baños de etanol al 100% de 3 minutos cada uno.

- 2 baños de etanol 95% de 3 minutos cada uno.

- rehidratar en agua destilada 3 minutos.

- 2- Digestión Proteolítica.

Colocar sobre la muestra 1 gota de Proteinasa K diluida e incubar 6 minutos a temperatura ambiente.

- 3- Bloqueo de la Peroxidasa endógena.



Quitar el excedente de Proteinasa K y secar alrededor de la muestra con papel absorbente (para evitar que se desparrame la gota que se pondrá a continuación, y de esa forma impedir que el tejido se deshidrate al incubarlo).

Colocar 1 gota de Peróxido de H al 3% suministrado en el Kit (PEROXIDASE BLOCK).

Incubar 5 min a temperatura ambiente.

Lavar suavemente con solución de lavado (con botella de lavado).

Colocar en baño de PBS.

#### 4- Incubación del Ac primario 1/30000

Quitar el excedente de PBS y secar alrededor de la muestra con papel absorbente.

Colocar 1 gota de Ac primario sobre la muestra.

Incubar 15 minutos en estufa a 37° C en cámara húmeda.

Lavar suavemente con solución de lavado (con botella de lavado).

Colocar en baño de PBS.

#### 5- Enlace

Quitar el excedente de PBS y secar alrededor.

Colocar 1 gota de la botella BIOTINYLATED LINK.

Incubar 8 minutos en estufa en 37° C en cámara húmeda.

Lavar suavemente con solución de lavado (con botella de lavado).

Colocar en baño de PBS.

#### 6- Estreptavidina peroxidasa.

Quitar el excedente de PBS y secar alrededor.

Colocar 1 gota de la botella STREPTAVIDIN-HRP.

Incubar 8 minutos en estufa a 37° C en cámara húmeda.

Lavar suavemente con solución de lavado (con botella de lavado).

Colocar en baño de PBS.

#### 7- Solución sustrato-cromógeno.

Quitar el excedente de PBS y secar alrededor.

Colocar 1 gota de sustrato-cromógeno.

Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.

Lavar suavemente con agua destilada.

8- Contraintinción.

Colocar 1 gota de hematoxilina 1 minuto

Lavar 2 minutos con agua destilada.

Montar el cubreobjetos con glicerol fosfato.

## **Anexo 5- PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MUCOSA DE ÍLEON.**

1. Hacer polvo 200 mgrs de íleon con nitrógeno líquido, en mortero de porcelana estéril previamente congelado a  $-70^{\circ}$  C.
2. Colocar en un tubo de 1,5 ml 120  $\mu$ l de EDTA 0,5m a 500  $\mu$ l de buffer de lisis nuclear, manteniéndolo frío.
3. Agregar el polvo al tubo.
4. Agregar 17,5  $\mu$ L de proteinasa k (20 mgrs/ml).
5. Incubar a  $55^{\circ}$  C durante 3 horas y vortexear la muestra cada hora.
6. Agregar 3  $\mu$ L de solución de ARNasa.
7. Mezclar, invirtiendo la muestra de 2 a 5 veces.
8. Incubar a  $37^{\circ}$  C 15-30 minutos
9. Poner en hielo por 5 minutos
10. Agregar 200  $\mu$ L de solución precipitante de proteína. Vortexear por 20 seg.
11. Poner en hielo por 5 minutos
12. Centrifugar 4 minutos a 13500 rpm.
13. Pasar el sobrenadante a tubo nuevo (1,5 ml) con 600  $\mu$ l de isopropanol a temperatura ambiente.
14. Mezclar por inversión.
15. Centrifugar 1 minuto a 13900 rpm a temperatura ambiente.
16. Eliminar con cuidado el sobrenadante
17. Agregar 600  $\mu$ L de etanol al 70% a temperatura ambiente. Invertir.
18. Centrifugar 1 minuto a 13900 rpm a temperatura ambiente.
19. Aspirar el etanol dejando el pellet.
20. Invertir el tubo en papel absorbente para que escurra. Esperar 15 minutos.
21. Agregar 100  $\mu$ L de solución rehidratante.
22. Incubar toda la noche en heladera.

## **Anexo 6- PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MATERIA FECAL.**

- 1- Pesar 180-220 mg. de materia fecal, colocarlo en un tubo limpio de 1,5 ml.  
Mantener el tubo en hielo.
- 2- Agregar 1,4 ml de buffer ASL, vortexear por 1 minuto. O hasta que la muestra este totalmente disuelta.
- 3- Incubar la suspensión por 5 minutos a 70° C.
- 4- Vortexear por 15 segundos.
- 5- Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
- 6- Transferir 1,2 ml del sobrenadante a un tubo nuevo.
- 7- Agregar una tableta de INHIBITEX. Vortexear hasta que se disuelva totalmente.
- 8- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- 9- Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
- 10- Transferir el sobrenadante a tubo limpio.
- 11- Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
- 12- Colocar 1,5 µL de Proteinasa K en un tubo nuevo.
- 13- Agregar 200 µL del sobrenadante (11) en el tubo que contiene la Proteinasa K.
- 14- Agregar 200 µL de buffer AL y vortexear por 15 segundos.
- 15- Incubar a 70°C por 10 minutos.
- 16- Agregar 200 µL de etanol al 100% y vortexear.
- 17- Transferir el contenido a tubo nuevo (QIAamp Spin Column) sin mojar los bordes.
- 18- Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
- 19- Transferir la columna a tubo nuevo (QIAamp).
- 20- Agregar 500 µL de buffer AW1.
- 21- Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
- 22- Transferir la columna a tubo nuevo (QIAamp).
- 23- Agregar 500 µL de buffer AW2.
- 24- Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
- 25- Transferir la columna a tubo nuevo de 1,5 ml.

26- Agregar 200  $\mu$ L de buffer AE directamente sobre la membrana.

27- Incubar por 1 minuto.

28- Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.

## **Anexo 7- PROTOCOLO DE LA TECNICA DE PCR.**

La reacción fue realizada en un ciclador térmico Techne (Genius, Vermont, Estados Unidos de Norte América) con una etapa inicial de 95°C por 15 min., luego 35 ciclos de 94° C por 30 seg., 56° C por 2 min., y 72°C por 30 seg., seguida de una extensión final de 72°C por 7 min., usando 5 µl de ADN templado en un volumen final de 25 µl conteniendo: 0.2 mM de cada dNTPs, 0.6 µM de cada partidor, 1.5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 1 U de Taq (Platinum Taq DNA Polimerasa, Invitrogen®, Argentina). El producto del PCR fue corrido en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µgrs/ml) a 70 v. por 1 hora aproximadamente.

## Anexo 8- PROTOCOLO TÉCNICA DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las muestras de íleon prefijadas en glutaraldehído al 2,5 % se lavaron dos veces con solución tampón S-collidine. Se refijaron en tetróxido de osmio al 2% durante 1 hora a temp. amb. o hasta que se pusieron negras, se lavaron dos veces en solución tampón S-collidine y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (1 pasaje en acetona 30%, 50%, 70% y 90% durante 15 minutos cada uno, y 3 pasajes en acetona 100% durante 15 minutos cada uno). La preinclusión se realizó en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100%, durante toda la noche a temp. amb. La inclusión se realizó con EMBED 812 a 56°C, durante 48 horas. A través de un ultramicrotomo manual (Sorvall MT-1A, DuPont), utilizando cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes finos ( $\pm 0.25 \mu\text{m}$ ) los que fueron teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico para la elección de la zona de interés. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos (20-60 nm) con cuchilla de diamante (Pelco®), se colocaron sobre grillas de cobre de 250 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo durante 30 minutos y con citrato de plomo durante 8 minutos.

### Preparación de las soluciones de trabajo

- **Solución de buffer S-collidine 0,2M, pH 7,2-7,4**

5,34 ml de S-collidine .....100 ml de agua destilada

9 ml de ClH 2N (para pH 7,4)

Se mezclaron ambas soluciones y se llevó a 200 ml con agua destilada (se ajustó el pH con ClH 0,2 N).

- **Solución fijadora de Glutaraldehído al 2,5%**

10 ml de glutaraldehído al 25%

20 ml de buffer S-collidine 0,2M, pH 7,2-7,4

70 ml de agua bidestilada

Se preparó la solución fijadora, se alicuotó y se conservó a - 2 °C hasta su utilización.

- Solución fijadora de Tetróxido de Osmio ( $O_8O_4$ ) al 2%

1 g de tetróxido de osmio

50 ml de agua bidestilada

Se colocó la ampolla con los cristales de tetróxido de osmio dentro de un frasco oscuro bajo campana de extracción. Se rompió con una varilla de vidrio la ampolla dentro del mismo frasco y se le agregó el agua bidestilada, dejando reposar al menos una semana, para que la solución se disuelva. Se conservó a 4 °C en recipiente correctamente cerrado para evitar la eliminación de vapores.

#### Preparación de la Resina EMBED 812

- Mezcla para la Preinclusión

##### Solución A

5 ml de EMBED 812.....8 ml de DDSA

##### Solución B

8 ml de EMBED 812.....7 ml de NMA

Para la preparación de la solución de preinclusión se mezclaron las soluciones A y B con 28 ml de acetona absoluta, se homogeneizaron y se usaron en el momento.

- Mezcla para la Inclusión

##### Solución A

5 ml de EMBED 812.....8 ml de DDSA

##### Solución B

8 ml de EMBED 812..... 7 ml de NMA

##### Solución de Inclusión

Solución A + Solución B.....16 gotas de DMP-30



Se mezclaron los 13 ml de la Solución A con los 15 ml de la Solución B y se agregaron 16 gotas del catalizador de la reacción DMP-30, se homogeneizó con agitación suave, evitando generar burbujas y se utilizó en el momento.

#### Preparación de las soluciones Contrastantes

- Solución contrastante de Acetato de Uranilo

2,5 g de acetato de uranilo ( $2\text{H}_2\text{O}$ ).....50 ml de agua destilada

Se preparó la solución en un recipiente cubierto con papel aluminio y se agitó en agitador magnético durante 10 minutos. Se dejó decantar, luego se filtró y alicuotó en recipientes oscuros, finalmente se conservó a 4° C hasta su utilización.

- Solución contrastante de Citrato de Plomo

1,33 g de  $(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$

1,76 g de  $(\text{CO}_3) \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

8 ml de OHNa 1N (4g OHNa en 100ml de agua destilada)

50 ml de agua destilada

Se disolvieron las drogas sólidas en un recipiente con, aproximadamente, 30 ml de agua destilada hervida y enfriada (se forma un precipitado lechoso). Luego se sonicó la solución durante 30 minutos y se agregó lentamente el OHNa (la solución se torna transparente). Posteriormente se aforó hasta 50 ml con agua destilada y se filtró la solución con filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$ , se conservó a 4° C y se dejó reposar un día antes de usar.

**Anexo 9- PROTOCOLO PARA LA VISUALIZACIÓN DE LESIONES MICROSCÓPICAS POR HISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA**

Ficha N°	HE		IPX	
	Si	No	Si	No
Atrofia de vellosidades				
Hiperplasia del epitelio de las criptas				
Criptas alargadas y ramificadas				
Ausencia de caliciformes				
Infiltrado mononuclear				



## **CAPITULO VI**

### **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Arenas, A.; Huerta, B.; Maldonado, A.; Tarradas, C.; Astorga, R.; Luque, I.; Borge, C.; Perea, A. Síndromes Entéricos del Cerdo: Enteropatía Proliferativa Porcina. Ciencias Veterinarias en [www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet\\_inf\\_inf\\_tripod/porcinos/enter/enteropatiaproliferativaporcina.htm](http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_inf_inf_tripod/porcinos/enter/enteropatiaproliferativaporcina.htm) el 31/05/05.
- Boutrup, T.; Boesen, H.; Boye, M.; Agerholm, J. Jensen, T. 2010. Early Pathogenesis in Porcine Proliferative Enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. J Comp Path. 143: 101-109.
- Brandt, D.; Kaim, U.; Baumgärtner, W.; Wendt, M. 2010. Evaluation of *Lawsonia intracellularis* infection in a group of pigs in a subclinically affected herd from weaning to slaughter. Vet Microbiol. 146: 361-365
- Carvajal, A.; Pozo, J.; Garcia, C.; Collazos, J.; Rubio, P. 2005a. Enteropatía Proliferativa suína. Suis Brasil 8: 34-42.
- Carvajal, A.; Collazos, J.; García, K.; Osorio, J.; Rubio, P. 2005b. Enteropatía Proliferativa Porcina. Av Tecnol Porc. 3 (5): 6-21.
- Chouet, S.; Prieto, C.; Mieli, L.; Veenhuizen, M.; McOrist, S. 2003. Patterns of exposure to *Lawsonia intracellularis* infection on European pig farms. Vet Rec. 152: 14-17.
- Corrales Morales, P.; Pelliza, B.; Tamiozzo, P.; Carranza, A.; Illanes, N.; Bertone J.; Ambrogio A. 2009. Perfil Serológico y por PCR de *Lawsonia Intracellularis* en Cerdos de Distintas Edades en Granjas Porcinas de la República Argentina. Rev Med Vet. 90, 3/4: 34-38.

- Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
  
- Dong-Kyun, S.; Suk-Kyung, L.; You-Chan, B.; Keun-Woo, L.; Won-Pil, C.; Jae-Chan, S. 2000. Detection of *Lawsonia intracellularis* in diagnostic specimens by one-step PCR. *J Vet Sci.* 1(1): 33-37.
  
- Faine, S. 1965. Silver staining of spirochaetes in single tissue sections. *J Comp Path.* 18: 381-382.
  
- Fleiss, J. 1980 *Statistical Methods for rates and proportions.* Wiley interscience. Segunda Edición. 13: 218.
  
- França, S. 2007. Aspectos Epidemiológicos e Terapêuticos da Enteropatia Proliferativa Suína. Dissertação apresentada no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG. Disponible en [www.bibliotecadigital.ufmg.br/.../disserta\\_ao\\_silvia\\_de\\_araujo\\_fran\\_a.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/.../disserta_ao_silvia_de_araujo_fran_a.pdf) el 02/09/09.
  
- Gebhart, C.; Barns, S.; McOrist, S.; Lin, G.; Lawson, G. 1993. Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int J Syst Bacteriol.* 43(3): 533-538.
  
- Gebhart, C.; Guedes, R. 2001. Proliferative enteropathy: diagnostic and immunity. *Proceeding of AASV* 353-357.

- Gebhart, C.; McOrist, S. 2005. Patogenia, inmunología y diagnóstico de la enteropatía proliferativa porcina. Simposio Europeo sobre Enterisol® Ileitis. Disponible en: [www.boehringer-ingenelheim.es](http://www.boehringer-ingenelheim.es)
  
- General Instructions for Immunohistochemical Staining. Disponible en: [www.dakocytomation.com](http://www.dakocytomation.com)
  
- Guedes, R.; Gebhart, C.; Winkelman, N.; Mackie-Nuss, R.; Marsteller, J. 2002a. Compararison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. Can J Vet Res. 66: 99-107.
  
- Guedes, R.; Gebhart, C.; Armbruster, G. Roggov, B. 2002b. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative enteropathy. Can J Vet Res. 66: 258-263.
  
- Guedes, R.; Gebhart, C. 2003a. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. Vet Microbiol. 91: 135-145.
  
- Guedes, R.; Gebhart, C. 2003b. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. Vet Microbiol. 23: 159-166.
  
- Guedes, R.; Gebhart, C. 2003c. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. J Vet Diagn Invest. 15: 438-446.
  
- Guedes, R. 2004. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. J. Swine Health Prod. 12(3): 134-138.

- Guedes, R. 2005. Enteropatia Proliferativa Suína (Ileíte). 1º Seminario Novartis Latino- Americano sobre Ileíte e Colite suína. Foz do Iguacu. Brasil. 1: 43-45.
- Guedes, R.; Franca, S. 2007. Imunologia do trato digestivo de suínos. XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos- ABRAVES, Florianópolis. 1: 44-52.
- Guedes, R.; Gebhart, C. 2010. Evidence of cell-mediated immune response and specific local mucosal immunoglobulin (Ig) A production against *Lawsonia intracellularis* in experimentally infected swine. Can J Vet Res. 74(2): 97-101.
- Hardge, T.; Mc Orist, S. 1999. Importancia económica de la Ileítis porcina. Disponible en: [www. 3tres3iberico.com](http://www.3tres3iberico.com)
- Huerta, B.; Arenas, A.; Carrasco, L.; Maldonado, A.; Tarradas, C.; Carbonero, A.; Perea, A. 2003. Comparison of diagnostic techniques for Porcine Proliferative Enteropathy (*Lawsonia intracellularis* infection). J Comp Path. 129: 179-185.
- Illanes, N.; Bertone, J.; Romanini, S.; Pelliza, B.; Di Cola, G., Ambrogi, A.; Tamiozzo, P.; Chanique. A. 2008. Metodos de diagnostico para *Brachispira spp.* IX Congreso Nacional de Producción Porcina. XV Jornadas de Actualización Porcina. Potrero de los Funes. San Luis, 205.
- Ileitis porcina. 2005. Circular 293, pág. 1-11. Disponible en [www.exopol.com](http://www.exopol.com)
- Jacobson, M.; Hard af Segerstad, C.; Gunnarsson, A.; Fellström, C.; de Verdier Klingenberg K.; Wallgren P.; Jensen-Waern, M. 2003. Diarrhoea in the growing pig –a comparisson of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. Res Vet Sci. 74: 163-169.

- Jacobson, M.; Fellström, C.; Jensen-Waern, M. 2010. Porcine proliferative enteropathy: An important disease with questions remaining to be solved. *Vet J.* 184(3): 264-268.
  
- Jensen, T.; Vigre, H.; Sørensen, V.; Møller, K. 2005. Naturally acquired *Lawsonia intracellularis* infection in pigs studied from weaning to slaughter by indirect immunofluorescence antibody test and polymerase chain reaction on faeces. *Res Vet Sci.* 79: 93-98.
  
- Jensen, T. K.; Vigre, H.; Svensmark, B.; Bille-Hansen, V. 2006. Distinction between Porcine Circovirus Type 2 Enteritis and Porcine Proliferative Enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Path.* 135: 176-182.
  
- Jensen, T.; Boesen, H.; Vigre, H.; Boye, M. 2010. Detection of *Lawsonia intracellularis* in Formalin-fixed Porcine Intestinal Tissue Samples: Comparison of Immunofluorescence and In-situ Hybridization, and Evaluation of the Effects of Controlled Autolysis. *J Comp Path.* 142: 1-8.
  
- Jones, G.; Davies, P.; Rose, R.; Ward, G.; Murtaugh, M. 1993a. Comparison of techniques for diagnosis of proliferative enteritis of swine. *Am J Vet Res.* 54(12): 1980-1985.
  
- Jones, G.; Ward, G.; Murtaugh, M.; Lin, G.; Gebhart, C. 1993b. Enhanced Detection of Intracellular Organism of Swine Proliferative Enteritis, Ileal Symbiont Intracellularis, in Feces by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 31(10): 2611-2615.
  
- Klein, E.; Gebhart, C.; Duhamel, G. 1999. Fatal outbreaks of Proliferative Enteritis caused by in young colony-raised rhesus macaques. *J Med Primatol.* 28(1): 11-8



- Knittel, J.; Jordan, D.; Schwartz, K.; Roof, M.; McOrist, S.; Harris, D. 1998. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis* –exposed pigs. *Am J Vet Res.* 59(6): 722-726
  
- La, T.; Phillips, N.; Hampson, D. 2003. Development of a Duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in Pig faeces. *J Clin Microbiol.* 41: 3372-3375.
  
- La, T.; Phillips, N.; Hampson, D. 2004 Evaluation of a multiplex- PCR for the detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Proceeding of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany.* 1: 283.
  
- Ladinig, A.; Sommerfeld-Stur, I.; Weissenböck, H. 2009. Comparative Evaluation of Diagnostic Methods for *Lawsonia intracellularis* Infection in pigs, with Emphasis on Cases Lacking Characteristic Lesions. *J Comp Path.* 140: 140-148.
  
- Lantz, P.; Abu al-Soud, W.; Knutsson, R.; Hahn-Hägerdal, B.; Rådström, P. 2000. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnol annu rev.* 5: 87-130.
  
- Lawson, G.; McOrist, S.; Jasni, S.; Mackie, R. 1993. Intracellular Bacteria of porcine Proliferative enteropathy: Cultivation and Maintenance In Vitro. *J Clin Microbiol.* 31(5): 1136-1142.
  
- Lawson, G.; Mackie, R.; Smith, D. G.; McOrist, S. 1995. Infection of cultured rat enterocytes by *Ileal symbiont intracellularis* depends on host cell function and actin polymerization. *Vet Microbiol.* 45: 339-350.

- Lawson, G.; Gebhart, C. J. 2000. Review Proliferative Enteropathy. J Comp Path. 122: 77-100.
  
- Luna, LG. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. Blakiston Division, McGraw-Hill (New York).
  
- Machuca, M.; Quiroga, M.; Guedes, R.; Gebhart, C.; Perfumo, C. 2006. Enterocyte proliferation and apoptotic changes in ileum samples from pigs experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*. 19th IPVS, Copenhagen, Dinamarca. 2: 176.
  
- Machuca, M; Quiroga, M.; Cappuccio, J. Piñeyro, P.; Weber, N.; Alarcón, L.; Perfumo, C. 2008. Identificación Inmunohistoquímica de Circovirus Porcino Tipo 2 y *Lawsonia intracellularis* en muestras de Íleon de cerdos con lesiones de Enteropatía Proliferativa Porcina. IX Congreso Nacional de Producción Porcina. XV Jornadas de Actualización Porcina. Potrero de los Funes. San Luis. 209.
  
- Machuca, M.; Cappuccio, J.; Piñeyro, P.; Venturini, M.; Quiroga, M.; Perfumo, C. 2009. Serological and histopatological survey of *Lawsonia intracellularis* infection in 30 argentinean swine herds. Braz J Vet Pathol. 2(1): 8-11.
  
- Machuca, M.; Quiroga, M.; Cappuccio, J.; Insarralde, L; Barragán, A.; Barrales, H.; Cáncer, J.; Perfumo C. 2010. Enteropatía Proliferativa Porcina asociada a enteritis granulomatosa en cerdos en confinamiento. Memorias del X Congreso Nacional de Producción Porcina, Mendoza, Argentina. 250.
  
- MacIntyre, N.; Smith, D.; Shaw, D.; Thomson, J.; Rhind, S. 2003. Immunopathogenesis of Experimentally Induced Proliferative Enteropathy in Pigs. Vet Pathol. 40: 421-432.

- Martin, S.; Meek, A.; Willeberg, P. 1997 Medida de la frecuencia de la enfermedad y de la producción. Epidemiología Veterinaria. Principios y métodos. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 83-86.
- McOrist, S.; Boid, R.; Lawson, G. H. K. 1989. Antigenic Analysis of Campylobacter Species and a Intracellular Campylobacter-Like Organism Associated with Porcine Proliferative Enteropathies. Infect Immun. 57(3): 957-962.
- McOrist, S.; MacIntyre, N.; Stokes, C.; Lawson, G. 1992. Immunocytological responses in Porcine Proliferative Enteropathies. Infect Immun. 60(10): 4184-4191.
- McOrist, S.; Jasni, S.; Mackie, R.; MacIntyre, N.; Neef, N.; Lawson, G. 1993. Reproduction of Porcine Proliferative Enteropathy with Pure Cultures of Ileal Symbiont Intracellularis. Infect Immun. 61(10): 4286-4292.
- McOrist, S.; Gebhart, C.; Lawson, G. 1994. Enterocyte proliferation and intracellular bacteria in animals. Gut. 35: 1483-1486.
- McOrist, S.; Gebhart, C.; Boid, R.; Barnas, S. 1995. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. Nov., sp. nov., the Obligate Intracellular Bacterium of porcine proliferative Enteropathy. Int J Syst Bacteriol. 45(4): 820-825.
- McOrist, S.; Roberts, L.; Jasni, S.; Rowland, AC.; Lawson, GH.; Gebhart, C.; Bosworth, B. 1996. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. J Comp Path. 115(1): 35-45.

- McOrist, S.; Morgan, J.; Veenhuizen, M.; Lawrence, K.; Kroger, H. 1997. Oral administration of tylosin phosphate for treatment and prevention of proliferative enteropathy in pigs. *Am J Vet Res.* 58(2): 136-139.
  
- McOrist, S.; Gebhart, C.J. 1999. Enteropatía proliferativa porcina. *Enfermedades del cerdo.* 8va edición. Buenos Aires, Intermédica. 351-361.
  
- McOrist, S.; Barcillos, D.; Wilson, R. 2003. Global Patterns of porcine proliferative enteropathy. *The Pig J.* 51: 26-35.
  
- McOrist, S.; Gebhart, C. 2005a. El descubrimiento de *Lawsonia intracellularis*. Simposio Europeo sobre Enterisol® Ileitis. Ed. Boehringer Ingelheim Animal Health GmbH, Rhein, Alemania.
  
- McOrist, S. 2005b. Epidemiology of Ileitis. 1° Seminario Novartis Latino- Americano sobre Ileíte e Colite suína. Foz do Iguacu. Brasil. 43-45.
  
- McOrist, S.; Gebhart, C.; Bosworth, B. 2005c. Evaluation of porcine ileum models of enterocyte infection by *Lawsonia intracellularis*. *Can J Vet Res.* 70(2): 155-159.
  
- McOrist, S.; Gebhart, C.; Pohlenz, J.; Voets, H.; Hardge, T.; Ohlinger, V.; Keller, C.; Walter, D. 2006a. Ileitis. Technical manual 3.0. Ed. Boehringer Ingelheim Animal Health GmbH, Rhein, Alemania.
  
- McOrist, S. 2006b. Las enteropatías porcinas a revisión. Ileítis en cerdos. ¿Que sabemos hoy? Parte I. Disponible en: [www.portalbesana.es/estaticas/informacion/descarga/Ileitis\\_en\\_cerdos\\_Partel.pdf](http://www.portalbesana.es/estaticas/informacion/descarga/Ileitis_en_cerdos_Partel.pdf)

- McOrist, S.; Gebhart, C.; Bosworth, B. 2006c. Evaluation of porcine ileum models of enterocyte infection by *Lawsonia intracellularis*. *Can J Vet Res*; 70: 155-159.
  
- McOrist, S.; Nistal, P.; Carvajal, A. 2007. Especial Ileítis: Etiología, Patogenia, Epidemiología y cuadro clínico. Disponible en: [www.3tres3iberico.com](http://www.3tres3iberico.com)
  
- Merkis, C.; Cristofolini, A. 2009. Manual de Microscopía Electrónica de Transmisión. Área de Microscopía Electrónica, Dpto. Patología Animal. FAV. Universidad Nacional de La Pampa.
  
- Mowat, A. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal Antigens. *Nat Rev Immun.* 3: 331-341.
  
- Nistal, P. 2005. La epidemiología y la repercusión económica de *Lawsonia intracellularis*. Simposio Europeo sobre Enterisol ® Ileítis. Disponible en [www.boehringer-ingenelheim.es](http://www.boehringer-ingenelheim.es)
  
- Oliveira, S. 2006 .Atypical immune responses to bacterial pathogens in pigs. In: A. D. Leman Swine Conference. 40-44.
  
- Ohlinger, V. 2008. Serología de *Lawsonia intracellularis*. Disponible en: [www.3tres3iberico.com](http://www.3tres3iberico.com)
  
- Perfumo, C.; Sanguinetti, H.; Petruccelli, M.; Aguirre, J.; Armocida, A.; Massone, A.; Moredo, F.; Giacoboni, G. 1996. Enteropatía Proliferativa del Cerdo. II. Hallazgos Relacionados a la Presentación de la Enteritis Necrótica. IV Congreso Nacional y pre-Latino de Producción Porcina. Paraná. Argentina. S18.

- Perfumo, C.; Sanguinetti, H.; Petruccelli, M.; Giorgio, N.; Giacoboni, G.; Aguirre, J.; Armocida, A. 1997. Enteropatía proliferativa del cerdo. Descripción clínico patológica y visualización con microscopía óptica y electrónica del microorganismo *Ileal Symbiont intracellularis*. Rev Med Vet. 78: 69-72.
  
- Perfumo, C., Machuca, M.; Cappuccio, J.; Piñeyro, P.; Quiroga, A.; Vigo, G. 2006. Situación actual de las enfermedades que afectan la producción porcina en la Argentina. Cuadros digestivos asociados a *Salmonella spp.* y *Lawsonia intracellularis*. V Congreso de producción porcina del MERCOSUR, VIII Congreso Nacional de Producción Porcina y XIV Jornadas de Actualización Porcina. Córdoba, Argentina. 221-224.
  
- Proteinasa K. DakoCytomation catálogo número S3004. Instructivo de uso disponible en: [www.dakocytomation.com](http://www.dakocytomation.com)
  
- Riganti, J.; Machuca, M.; Idiart, J.; Massone, A.; Quiroga, A.; Perfumo, C. 1999. Inmunomarcación de Antígeno Nuclear de Proliferación Celular y de Apoptosis en Íleon de Cerdos con Enteropatía Proliferativa. Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. UNR. Casilda.
  
- Riganti, J.; Machuca, M.; Perfumo, C. 2001. Prevalencia Serológica de Enteropatía Proliferativa Porcina. Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. UNR. Casilda.
  
- Roberts, L.; Rowland, A. C.; Lawson, G. H. 1980. Porcine intestinal adenomatosis: epithelial dysplasia and infiltration. Gut. 21: 1035-1040.

- Rodríguez, B.; Aranzazu, D.; Giraldo, G.; Alvarez, L.; Cano, E.; Isaza, B. 2004. Prevalencia de enteropatía proliferativa porcina y caracterización histopatológica de las lesiones asociadas en cerdos sacrificados en el Matadero Municipal de Medellín, Colombia. *Rev Col Cienc Pec.* 17(1): 11-19.
  
- Rodriguez Buenfil, J.; Rodriguez, L.; Espinosa, J. 2008. Eliminación de *Lawsonia intracellularis* por cerdos de engorde en dos sistemas de producción en Yucatán, México. *Rev Cient. (Maracaibo)* 18(4): 403-407.
  
- Roof, M.; Kroll, J.; Gebhart, C. 2008. Respuesta inmunitaria: ¿qué sabemos de la inmunidad en la EPP? Disponible en: [www.3tres3iberico.com](http://www.3tres3iberico.com)
  
- Romanini, S. 2001. Respuesta Inmune Celular en la Mucosa digestiva de los cerdos. Tesis Doctoral UCO. España.
  
- Rowland, A.; Lawson, G H K. 1992. Porcine proliferative enteropathies. In: A. D. Leman, Editor, *Diseases of Swine*, Iowa State University Press, Ames. 560–569.
  
- Rubio Nistal, P. 2000. Control de la Enteropatía Proliferativa Porcina. Disponible en: [www.3tres3iberico.com](http://www.3tres3iberico.com)
  
- Rubio Nistal, P. 2005. La epidemiología y la repercusión económica de *Lawsonia intracellularis*. Simposio Europeo sobre Enterisol ® Ileitis. Disponible en [www.boehringer-ingelheim.es](http://www.boehringer-ingelheim.es)
  
- Segales, J.; Fernández -Salguero, J.; Fructuoso, G.; Quintana, J.; Rosell, C.; Pozo, J.;

De Arriba, M.; Rubio, P.; Domingo, M. 2001. Granulomatous Enteritis and Lymphadenitis in Iberian Pigs Naturally Infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet Pathol.* 38: 343-346.

- Sitjar, M. Enfermedades entéricas en porcino. 2007. Disponible en: [www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet enf inf tr... - 19k](http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet%20enf%20inf%20tr...)

- Smith, S. y McOrist, S. 1997. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res Vet Sci.* 62(1): 6-10.

- Smith, D.; Lawson, G. 2001. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet Microbiol.* 82: 331-345.

- Starry Method for Staining Spirochetes. Manual of histologic and special staining technics. Armed Forces Institute of Pathology (U.S.). Publicado en 1960, McGraw-Hill, Blakiston Division (New York). Segunda Edición. 184.

- Stege, H.; Jensen, T.K.; Moller, K.; Vestergaard, K. 2004. Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in pig herds. *Vet Microbiol.* 104: 197-206.

- Stevens, S. 2005. The Warthin-Starry technique (modified). The demonstration of microorganisms in tissue sections. en: <http://users.adam.com.au/royellis/morg.htm>

- Stinson, W.; Lois Calhoun, M. 1976. Sistema Digestivo. *Histología Veterinaria*. Editorial Acribia. Zaragoza (España). 10: 223.

- Stokes, C.; Bailey, M.; Haverson, K. 2000. Development and Function of the Pig Gastrointestinal Immune System. *The Digestive Physiology of Pigs. Proceedings of the 8th Symposium.* Uppsala, Sweden.



- Sueyoshi, M.; Uemura, R.; Nagatomo, H. 2010. The micro-adenomatous lesions associated with *Lawsonia intracellularis* in the pig intestine. *Int J Infect Diseases*. 14(1) 159-160.
  
- Szczotka, A.; Szczotka, M. 2009. Development of immunohistochemistry for detection of *Lawsonia intracellularis* in formalin-fixed tissues from pigs. *ESVP/ECVP Proceedings*. 141(4): 272.
  
- Tarabla, H. 2000 Sensibilidad y especificidad. *Epidemiología Diagnóstica*. Centro de publicaciones. Secretaría de Extensión, Universidad nacional del litoral. Santa Fe. Argentina.
  
- Thrusfield Michael, 1990. *Epidemiología Veterinaria*. Editorial Acribia. España. Capítulo 14.
  
- Universal DakoCytomation LSAB®+Kit, peroxidase code K0679. Instructivo de uso disponible en [www.dakocytomation.com](http://www.dakocytomation.com)
  
- Valdez, M. C.; Calle, S.; Cerón, M.; Falcón, N. 2002. Detección de Anticuerpos Contra *Lawsonia intracellularis* en Porcinos Provenientes de Granjas Tecnificadas del Valle de Lima y Hural. *Rev Inv Vet Perú*. 13(1): 95-97.
  
- Van der Heijden H.M.J.F.; Bakker, J.; Elbers, A.R.W.; Vos, J.H.; Weyns, A.; de Smet, M.; McOrist, S. 2004. Prevalence of exposure and infection of *Lawsonia intracellularis* among slaughter-age pigs. *Res Vet Sci*. 77: 197-202.
  
- Warthin - Starry (Youngs Modification). Copyright 1997 University of Nottingham Medical School Division of Histopathology. 1997. Disponible en <http://www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/warthin.html>

- Wilson, T.M.; Chang, K.; Gebhart, H.; Kurtz, T.; Drake; Lintner, V. 1986. Porcine Proliferative Enteritis: Serological, Microbiological and Pathological Studies from Three Field Epizootics. Can J Vet Res. 50: 217-220.
- Young B.J. A reliable method for demonstrating spirochaetes in tissue sections. 1969. J Med Lab Technol. 26: 248-252.
- Zlotowski, P.; Mendes Ribeiro Corrêa, A.; Riegert Borba, M.; Estêvão Farias Cruz, C.; Driemeier, D. 2008. Enteritis associated with Lawsonia intracellularis and porcine circovirus type 2 infection in wild boars in Southern Brazil. Cienc. Rural. 38(9): 2540-2544.





U.N.R.C  
Biblioteca Central



71176

71176