

# DETECCIÓN DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS* EN CERDOS POR MEDIO DE LAS TÉCNICAS DE TINCIÓN DE PLATA E IMNUNOHISTOQUÍMICA

Barbosa AM, Gil AC, Ruiz S, Rincón MA y Mogollón JD

Departamento de Ciencias para la Salud Animal  
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia  
Universidad Nacional de Colombia

## RESUMEN

Con el propósito de diagnosticar en Colombia la bacteria conocida como *Lawsonia intracellularis* en cerdos se realizó un estudio retrospectivo de los casos diagnosticados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) desde el año 1998 hasta el primer semestre del año 2004. Se evaluaron las lesiones con la coloración de H&E y se detectó la bacteria empleando las técnicas de coloración de plata e inmunohistoquímica. Adicionalmente, se realizó un estudio en plantas de sacrificio, tomando muestras de ileon, y se evaluó macroscópicamente la apariencia de los tejidos y el grado de engrosamiento de la pared intestinal por medio de la palpación, e histopatológicamente por medio de las técnicas mencionadas en el estudio retrospectivo.

En los dos estudios se detectó la bacteria, con una alta presencia en la industria porcina desarrollada. También se observaron lesiones similares a las reportadas en la literatura, en su mayoría lesiones de tipo agudo y en menor grado de tipo crónico y subclínico.

**Palabras claves:** *Lawsonia intracellularis*, diagnóstico, cerdos, Wharthin Starry, inmunohistoquímica, Colombia.

## DETECTION OF *LAWSONIA INTRACELLULARIS* IN PIGS INTESTINES BY WARTHIN STARRY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUES

## ABSTRACT

To detect the presence of *Lawsonia intracellularis* in Colombian pigs, two studies were conducted. In the first one, a retrospective study of diagnosed cases was done. 23 cases stained with H&E were again revised and the bacteria was demonstrated by Warthin Starry and immunohistochemistry (IHC) using a polyclonal antibody.

A second study was performed in two slaughterhouses to examine the thickness of the ileon and to detect any gross lesions related to proliferative ileitis. Fragments of ileon from 100 pigs were collected for histopathology. The bacteria was confirmed in 18 out of 23 examined by immunohistochemistry and only in 16 out of 23 by Warthin Starry. In the segments collected from the slaughtered pigs only one pig was positive by immunohistochemistry. It was concluded that IHC is required to confirm any suspected case of the proliferative enteropathy which showed affected intestinal crypts lined with immature epithelial cells. The slaughter checks for this disease are not recommended to be used as routine.

**Key words:** *Lawsonia intracellularis*, diagnosis, pigs, Wharthin Starry, immunohistochemistry, Colombia.

## INTRODUCCIÓN

La Ileitis Proliferativa (IP) o Enteropatía Proliferativa Porcina (EPP) es una enfermedad entérica transmisible, de gran importancia económica, que afecta a los cerdos y a otros animales, como aves y mamíferos. Es causada por la bacteria *Lawsonia intracellularis*, que es un bacilo gram negativo, intracelular obligado perteneciente a la clase Proteobacter de la familia Desulfobacteriaceae (McOrist *et al.*, 2000; Schwartz, 2000).

La enfermedad es de distribución mundial y afecta a cerdos de diferentes edades, desde los lechones hasta los reproductores, infectándose de forma indirecta por la vía oro-fecal. Esta infección causa proliferación de las células inmaduras de las criptas intestinales, diarrea (con sangre o sin ella), disminución del crecimiento de los cerdos jóvenes y muerte súbita en cerdos de finalización o hembras de reemplazo (Wills, 2000; McOrist *et al.*, 2004; Guedes, 2004a).

A pesar de que existen en la literatura varias estimaciones sobre las pérdidas económicas de la enfermedad, la prevalencia de la infección alrededor del mundo y varios rasgos de la patogénesis de la enfermedad permanecen todavía sin entenderse (Bane *et al.*, 1998). La principal explicación de esta situación es la falta de disponibilidad de métodos diagnósticos para la enfermedad.

Los mecanismos de infección y de desarrollo de la enfermedad son desconocidos, pero Smith y Lawson (2001) postularon que la patogénesis de la enfermedad está determinada por diez eventos: infección y colonización, adhesión a la célula hospedera, entrada a la célula, escape de la vacuola intracelular, multiplicación intracelular y diseminación, proliferación celular, respuesta inmune, persistencia bacteriana dentro de la célula, eliminación de las células infectadas y resolución de la lesión.

Las lesiones histológicas están asociadas al intestino (especialmente los últimos 50 centímetros del íleon) y en menor frecuencia al yeyuno, al ciego, al colon en espiral

y al recto (Guedes and Gebhart, 2004b). La lesión histopatológica característica de las cuatro formas es la hiperplasia epitelial de las criptas intestinales, que puede desarrollarse 2 a 3 semanas después de la infección y persistir por varias semanas (McOrist *et al.*, 1996). Éstas presentan alargamiento y ramificación y pueden extenderse hasta abrirse sobre la superficie de la mucosa intestinal, reemplazando la estructura normal de la vellosidad (Lawson and Gebhart, 2000). Las células epiteliales de las criptas son inmaduras y contienen la bacteria en el citoplasma apical. En el epitelio se aprecian múltiples formas mitóticas, ausencia de células caliciformes y enterocitos en estado de apoptosis, haciendo clara la diferenciación entre la zona afectada y la zona sana (Ward and Winkelman, 1990; McOrist *et al.*, 1996; Lawson and Gebhart, 2000).

La enfermedad se puede diagnosticar por métodos *ante mortem* utilizando muestras de materia fecal y empleando las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), inmunoperoxidasa indirecta e inmunofluorescencia. Dentro de las pruebas serológicas, son de uso común la inmunofluorescencia indirecta, la inmunoperoxidasa en monocapa y la ELISA. Con los métodos *post mortem* se emplea PCR en muestras de mucosa ileal y la histopatología de tejidos afectados, utilizando coloraciones como hematoxilinaeosina, tinción de plata, Ziehl Neelsen modificado e inmunoperoxidasa indirecta (Gebhart, 1996; Guedes *et al.*, 2000; Gebhart and Guedes, 2001).

Rutinariamente, la ileitis en animales afectados o muertos se ha diagnosticado con base en las lesiones que se encuentran en la necropsia y con base en el examen microscópico de los tejidos afectados teñidos con coloraciones especiales.

Las lesiones microscópicas no están presentes en todos los casos de campo, y con relativa frecuencia se puede confundir con otras enfermedades entéricas. Por consiguiente, se requiere el uso de métodos

histológicos para revelar la presencia de la bacteria o de su antígeno. La coloración de secciones histológicas con Warthin Starry (coloración de plata) o Ziehl Neelsen permite demostrar la presencia de estos organismos de forma curva en la parte apical del citoplasma de las células epiteliales de las criptas intestinales (Lawson and Gebhart, 2000). Pero la sensibilidad de estas pruebas es moderada y, por consiguiente, se requiere la aplicación de técnicas de inmunohistoquímica (IHC), mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales, para encontrar el antígeno bacteriano en los tejidos afectados. Es así como se ha demostrado el antígeno de *Lawsonia intracellularis* en el citoplasma de los macrófagos de la lámina del intestino o en el exudado y en los restos necróticos presentes en la superficie de la mucosa o dentro de las criptas intestinales (Guedes *et al.*, 2002a).

El objetivo del presente estudio fue comprobar la presencia de la enfermedad en el país mediante la detección del antígeno bacteriano, para lo que se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa y un anticuerpo policlonal contra *Lawsonia intracellularis*. Además, a través de un estudio retrospectivo de casos de campo, se describieron las lesiones histopatológicas y se comparó la detección del antígeno con la tinción histológica de plata y el grado de lesión con la tinción de hematoxilina eosina. También se realizó un estudio en plantas de sacrificio para conocer si la palpación del engrosamiento del íleon era útil para el monitoreo de la enfermedad. Finalmente, se intentó detectar las lesiones histopatológicas de la enfermedad y la presencia del agente etiológico, aplicando las coloraciones especiales mencionadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se realizaron dos experimentos: un estudio histopatológico retrospectivo de casos de campo y otro estudio para evaluar la palpación y el examen visual del engrosamiento del íleon (como sistema de monitoreo en cerdos de sacrificio en la

detección de ileitis) relacionado con el examen histológico, la coloración de plata y la inmunohistoquímica.

### Estudio retrospectivo

Para este estudio se tomó como base los casos diagnosticados entre 1998 y el primer semestre de 2004, con las muestras remitidas al laboratorio nacional de diagnóstico del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Se procedió luego a la búsqueda de la historia clínica y de los bloques de parafina, los cortes histológicos y los frascos de los tejidos conservados en formalina buferada al 10% que estaban en el archivo del laboratorio de histotecnica del ICA.

### Procesamiento de las muestras

Tomando como base los bloques de parafina de los casos diagnosticados se realizaron tres secciones histológicas, una de 5  $\mu\text{m}$ , para llevar a cabo la coloración de hematoxilinaeosina según la técnica rutinaria estandarizada del laboratorio, y dos de 3  $\mu\text{m}$ , para efectuar las coloraciones especiales de plata (WS) y la de inmunohistoquímica indirecta. Los tejidos fueron sometidos a la tinción de Warthin Starry, según la técnica descrita por la literatura (Thompson, 1966).

Las secciones histológicas para la prueba de inmunohistoquímica indirecta fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes en grados descendentes. La actividad de las peroxidases endógenas fue bloqueada utilizando peróxido de hidrógeno y etanol durante 10 minutos en oscuridad. Las proteínas no específicas fueron bloqueadas utilizando el kit Vetastain Elite Universal ABC Kit<sup>®</sup> (Vector Laboratorios, USA), según las instrucciones del laboratorio que lo manufactura. Como anticuerpo primario se usó un anticuerpo policlonal donado por la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Minnesota (Dra. Coonie Gebhart), en una dilución 1:10.000 en PBS. Las láminas fueron incubadas con la solución del anticuerpo primario por 12 horas,

a 4°C, en cámara húmeda. Después de 5 lavados con Tween 20® al 1% en PBS las láminas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-Ig G biotinilada anti-conejo en dilución 1:100 en una solución de PBS. Posteriormente, las láminas fueron lavadas 5 veces a temperatura del laboratorio. La reacción final se produjo en una solución de 3,3'-diaminobenzidina® (Sigma laboratorios, USA). Las láminas histológicas fueron teñidas y contrastadas con hematoxilina de Meyer y finalmente preparadas para la lectura con microscopio de luz (Kim *et al.*, 2000, MacIntyre *et al.*, 2003).

En cada una de las técnicas se utilizaron controles negativos y positivos. Como control negativo para la técnica IHC se utilizó una sección de intestino normal de cerdo proveniente de una granja libre de la infección, monitoreada con anterioridad, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Mogollón *et al.*, 2002). Adicionalmente, en el procesamiento de las muestras no se incluyó el anticuerpo primario y en su reemplazo se adicionó PBS. Para el control positivo de las pruebas de WS e IHC se utilizaron los tejidos de un cerdo naturalmente infectado con *Lawsonia intracellularis* que había sido previamente evaluado por histopatología y por muestreos serológicos en granja.

La evaluación de las lesiones histológicas en la tinción de H&E fue realizada por medio de una escala subjetiva de severidad de grado 0 a 3, modificada de Jensen *et al.* (1999). De igual modo se procedió con la tinción de WS e IHC, donde se catalogó a cada caso según la cantidad de bacterias presentes y la presencia del antígeno bacteriano.

#### **Detección de ileitis en plantas de sacrificio**

Se colectaron 100 muestras de intestino delgado (íleon) de 1 cm de tamaño de cerdos de sacrificio. Estas muestras se tomaron en una planta de sacrificio de Medellín (Antioquia) y otra de Bogotá (Cundinamarca).

Los cortes de intestino fueron fijados en formalina buferada al 10% y luego se en-

viaron al laboratorio de histotecnia del ICA en Bogotá para su procesamiento. Antes de tomar la muestra, el intestino fue examinado en su superficie externa y palpado por un médico veterinario previamente entrenado para tal fin. Se evaluó de forma subjetiva el grado de engrosamiento. La escala de valoración de la palpación fue: grado 0: ninguna anomalía detectada; grado 1: leve incremento y engrosamiento de la pared intestinal; grado 2: engrosamiento de la pared intestinal menor o igual a 4 mm, rigidez de la red intestinal con hiperplasia del tejido linfoide, hiperemia y leve edema de la serosa; y grado 3: engrosamiento de la pared intestinal mayor a 4 mm y estenosis parcial (Jensen *et al.*, 1999).

#### **Procesamiento de las muestras**

Las muestras de intestino delgado (íleon) fueron procesadas en la misma forma que para el estudio retrospectivo con la tinción de H&E, para luego ser observadas por el microscopio de luz y describir sus cambios. Aquellos intestinos que presentaron lesiones compatibles con ileitis y otros 20 casos seleccionados al azar fueron procesados para teñirlos con la coloración de plata (WS) e IHC indirecta, como se describió anteriormente. Los cambios histológicos de estas secciones de intestino fueron evaluados y calificados según la metodología descrita en la literatura (Jensen *et al.*, 1999).

#### **Análisis estadístico**

Los hallazgos fueron analizados empleando estadística descriptiva no paramétrica, para establecer por medio de figuras el nivel de frecuencias de estos hallazgos. Se realizaron también pruebas de correspondencia, utilizando paquetes estadísticos de Excel (Petrie and Watson, 2000), para determinar el nivel de concordancia entre H&E, WS y la inmunohistoquímica indirecta (para el caso del estudio retrospectivo). Estas comparaciones se realizaron con tablas de 2x2 y luego se halló mediante

una prueba de kappa el nivel de concordancia (Thrusfield, 1990).

## RESULTADOS

### Estudio retrospectivo

De acuerdo con los registros de casos entre 1998 y el primer semestre de 2004, fueron diagnosticados 23 casos de ileitis proliferativa porcina, que procedían de diferentes departamentos del país. Su distribución según su origen se muestra en las figuras 1 y 2. Se pudo observar que el mayor número de casos procedía de los departamentos donde la industria porcina ha alcanzado un amplio desarrollo y donde los casos se vienen incrementando aparentemente en los últimos 5 años.

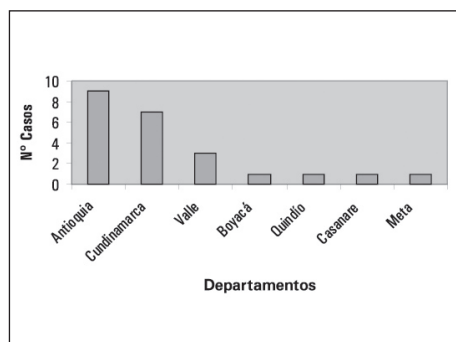


Figura 1. Número de casos de enteropatía proliferativa diagnosticados en el laboratorio nacional de diagnóstico ICA.

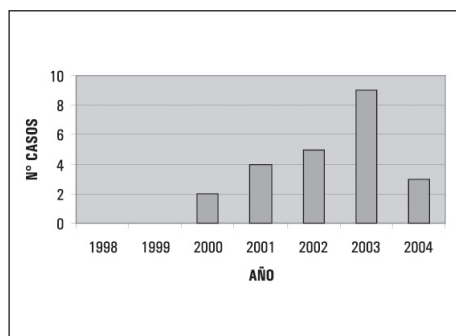


Figura 2. Procedencia de los casos enteropatía proliferativa diagnosticados en el laboratorio nacional de diagnóstico ICA.

El análisis de la historia de las granjas permitió establecer que la mayoría de los animales afectados presentaron fiebre, inapetencia, mucosas pálidas y muerte súbita. Algunos sobrevivieron sólo un corto periodo de tiempo después de iniciados los signos clínicos. La edad de los cerdos afectados estaba entre los 5 meses y los 3 años. Los animales eran hembras y machos de diferentes líneas genéticas.

Según la reevaluación histológica detallada se encontró que sólo 22 de los 23 casos (95,6%) tenían lesiones compatibles con ileitis proliferativa. El caso número 2 no presentó lesiones histológicas compatibles con ileitis, a pesar de que había sido diagnosticado como positivo. Las lesiones microscópicas en los cerdos de todas las edades examinadas fueron similares. El hallazgo común fue la proliferación de células epiteliales inmaduras en las criptas, la elongación y ramificación de las criptas y el acortamiento de las vellosidades. En el lumen de las criptas se pudo apreciar la presencia de detritus celulares con neutrófilos polimorfonucleares. La disminución o ausencia de las células caliciformes fue muy característica, sobre todo en el único caso de intestino grueso examinado. En la lámina propia se detectó la presencia de un infiltrado de células mononucleares, linfocitos y macrófagos. Llamó la atención la presencia de leucocitos globulares distribuidos al azar en la lámina del intestino delgado. Las células epiteliales inmaduras se encontraron cubriendo tanto la superficie de la mucosa como las criptas elongadas o ramificadas. Estas células inmaduras tenían una apariencia caracterizada por una forma cuboidal, citoplasma basófilico y núcleo hiper cromático grande (figuras 3 y 4). En algunos casos se pudieron apreciar abscesos en las criptas o dilatación de las criptas con detritus celulares y abundantes polimorfonucleares y material necrótico en vía de degeneración. En casos severos fue muy evidente la fusión de las vellosidades, dándole a la mucosa del intestino delgado una apariencia plana.

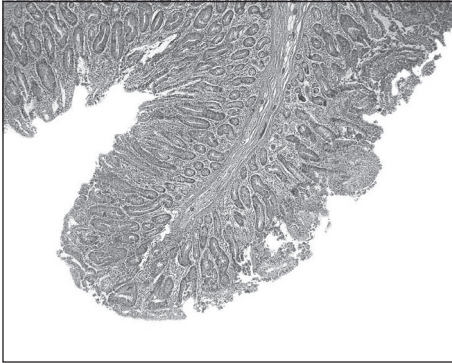


Figura 3.

Se debe destacar que en 7 de los 23 casos examinados (30,4%) no se observaron estos microorganismos con la coloración de plata, aunque no hubo lesiones histológicas en uno de ellos.

18 de los 23 casos estudiados en la tinción de H&E (78,2%) se clasificaron en los grados 2 y 3 de la escala subjetiva de severidad (tabla 1).

Con la coloración WS se observaron numerosos microorganismos de aspecto curvado en la parte apical del citoplasma de las células epiteliales que estaban proliferando. Aquellos se encontraron en cantidades variables en los diversos casos examinados. Llamó la atención que su presencia estaba limitada a las criptas que tenían sólo células inmaduras y no se observaron en áreas aparentemente normales del intestino (figura 5).

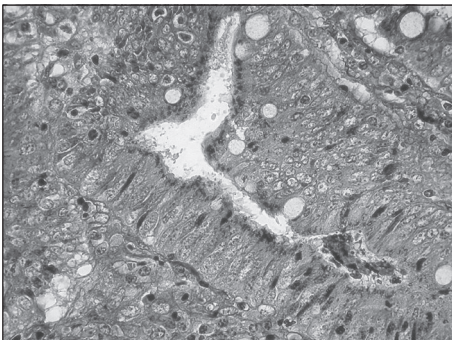


Figura 5.

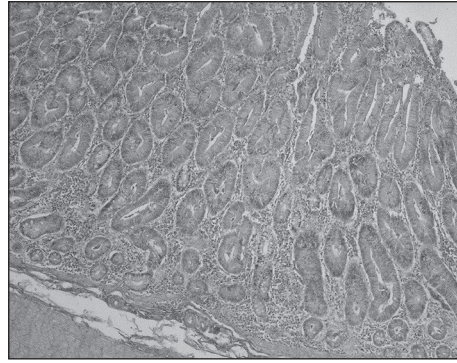


Figura 4.

Tabla 1. Clasificación de los casos del estudio retrospectivo, según los hallazgos de las tinciones en la evaluación microscópica.

# Caso	H&E	WS	IHC
1	2	2	3
2	0	0	0
3	3	3	3
4	3	3	3
5	1	0	0
6	3	3	3
7	2	2	2
8	1	0	1
9	3	3	3
10	2	0	0
11	3	3	3
12	3	3	3
13	2	3	3
14	1	0	3
15	3	3	0
16	2	0	2
17	2	0	0
18	2	3	3
19	3	3	3
20	3	3	3
21	1	3	3
22	2	3	3
23	2	3	3

H&E: Hematoxilina Eosina.  
 WS: Wharthin Starry.  
 IHC: inmunohistoquímica.

La presencia de *Lawsonia intracellularis* fue confirmada por medio de inmunohistoquímica indirecta. El antígeno bacteriano se detectó en la localización esperada, es decir, en el citoplasma apical de las células en las criptas afectadas y en el epitelio intestinal que recubre la superficie de la mucosa. Este antígeno se observó de un color café amarillento en forma localizada y en algunos casos de forma generalizada (figura 6).

Llamó la atención la presencia del antígeno bacteriano localizado en la lámina del intestino delgado, hecho que sugirió la presencia libre de la bacteria. Fue posible también detectar el antígeno bacteriano en polimorfonucleares localizados en el lumen de las criptas o libre en dicho lumen. Es relevante mostrar que en algunos casos el antígeno bacteriano se observó también en

macrófagos de vasos sanguíneos localizados debajo de la capa muscular de la mucosa e incluso en macrófagos dentro de las placas de Peyer (figuras 7, 8 y 9).

En 17 de los casos estudiados (94,4%), del 50 al 90% de las criptas afectadas presentaban el antígeno bacteriano en su citoplasma (figura 7).

En la tabla 1 se puede apreciar que de los 22 casos que mostraron lesiones histológicas 18 (81,8%) fueron positivos por inmunohistoquímica indirecta. Además, 3 casos (13,6%) que fueron positivos por IHC habían sido negativos por coloración de plata (tabla 1). De igual modo, uno de los casos (4,54%) confirmado como positivo en la coloración de plata fue negativo para la inmunohistoquímica.

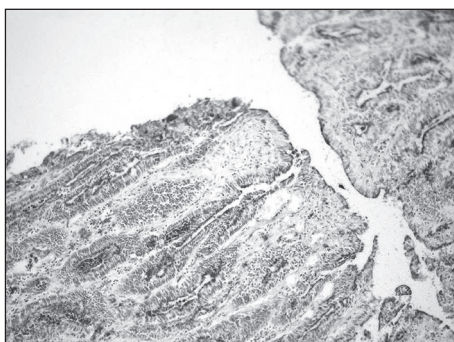


Figura 6.

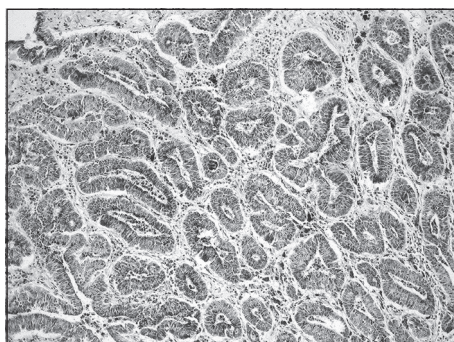


Figura 7.

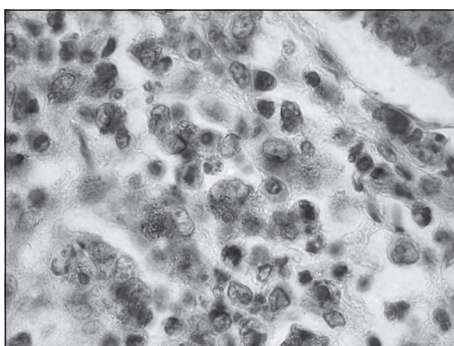


Figura 8.

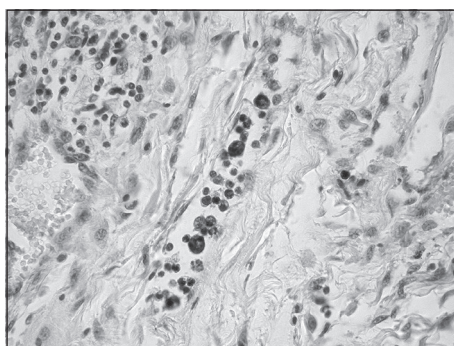


Figura 9.

### Análisis estadístico

El nivel de concordancia entre las técnicas de diagnóstico utilizadas se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2.** Índices de correspondencia.

	H&E	WS	IHC
H&E		0,7	0,8
WS	0,7		0,8
IHC	0,8	0,8	

H&E: Hematoxilina Eosina.  
WS: Wharthin Starry.  
IHC: inmunohistoquímica.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con las técnicas de H&E y WS se encontró un índice de correspondencia de 0,7. Entre H&E e IHC este índice fue de 0,8 y para WS con IHC fue de 0,8. Adicionalmente, el cálculo de coeficiente de kappa mostró un valor de 5,5, con un nivel de confianza del 95%, lo que indicó una agregación moderada entre ellas, sugiriendo que hay similitud entre los resultados y que eventualmente se podría utilizar cualquiera de ellas para el diagnóstico rutinario de la enteropatía proliferativa porcina.

### Detección de ileitis en cerdos de sacrificio

Durante el examen macroscópico del intestino delgado, especialmente del fleon, antes de tomar la muestra sólo se observó una ligera congestión de la serosa y en algunos individuos se detectó engrosamiento de la pared por palpación (cuya valoración subjetiva se presenta en la tabla 3).

De los 100 animales estudiados, 11 cerdos (11%) mostraron algún tipo de alteración en las criptas intestinales. Éstas consistieron en una leve hiperplasia de las células epiteliales con disminución de las células caliciformes. En estos casos se observó que las criptas se llegaban a profundizar dentro de las placas de Peyer. En la lámina propia de todos los casos se encontraron numerosos leucocitos globulares distribuidos al azar.

Por medio de la tinción de plata no se detectó la presencia de *Lawsonia intracellularis* dentro del citoplasma apical de los enterocitos de los 20 casos seleccionados al azar. En contraste, se encontró un caso positivo a la prueba de IHC de los 20 estudiados, en el que se detectó el antígeno bacteriano de *Lawsonia intracellularis* dentro de macrófagos localizados en la lámina propia y en una cripta intestinal. Estos hallazgos contrastan con la palpación subjetiva que se efectuó *post mortem*, donde se encontraron 67 (67%) que presentaban un engrosamiento de la pared intestinal de grado 1 a 3 (tabla 3).

**Tabla 3.** Clasificación de las muestras tomadas en plantas de sacrificio.

No. Caso	PAL	H&E	WS	IHC
1	0	1	0	0
2	0	1	0	0
10	2	1	0	0
11	0	1	0	0
12	0	1	0	0
16	1	1	0	0
19	2	1	0	0
29	2	1	0	0
34	1	1	0	0
52	1	1	0	0
55	0	0	0	0
63	3	0	0	0
66	1	0	0	0
74	1	0	0	0
76	0	0	0	0
84	1	0	0	0
89	1	1	0	2
93	0	0	0	0
98	0	0	0	0

PAL: Visualización y palpación.  
H&E: Hematoxilina-Eosina.  
WS: Tinción de plata o Warthin Starry.  
IHC: Inmunohistoquímica.

### DISCUSIÓN

La presente investigación permitió demostrar la relación entre las lesiones histológicas



proliferativas en el intestino delgado o grueso y la presencia del antígeno bacteriano de *Lawsonia intracellularis* como agente causal de los problemas de enteropatía proliferativa porcina de los casos de infección natural que se registraron en el laboratorio nacional de diagnóstico del ICA en el periodo comprendido entre 1998 y el primer semestre del año 2004.

Según la historia clínica de los casos examinados en el estudio retrospectivo, se puede percibir que la enfermedad podría estar ampliamente distribuida en el país, principalmente en las regiones donde la porcicultura ha alcanzado un gran desarrollo. Esto lo confirma el hecho de que 9 de los casos (39,1%) procedían del departamento de Antioquia, región donde se encuentran las principales granjas genéticas que proveen pie de cría al resto del país.

Es conveniente destacar que existe cierta dificultad para el diagnóstico *post mortem* de la enfermedad con base en las lesiones macroscópicas, puesto que no siempre están presentes (Cook, 1996). Esto enfatiza la necesidad de utilizar herramientas como el estudio histopatológico y la coloración de plata y/o la inmunohistoquímica para la detección precisa del organismo o de los antígenos.

Es indudable que se puede establecer una asociación entre la proliferación de las células epiteliales inmaduras y la ausencia de las células caliciformes en las criptas con la sospecha de EPP. En el presente estudio se encontraron lesiones histológicas de tipo proliferativo similares a las descritas en la literatura en 22 de los 23 casos estudiados (Rowland and Lawson, 1975; Rowland, 1978; Lomax and Glook, 1982; Jones *et al.*, 1993; Cook, 1996; Cooper and Gebhart, 1998).

De los casos que presentaron lesiones histológicas se detectaron microorganismos curvos con la coloración de plata (WS) en 16 de los 23 casos estudiados (69,5%). Es necesario tener en cuenta que la técnica de plata es menos específica para *Lawsonia intracellularis*, debido a que existen otros

microorganismos que morfológicamente son similares; adicionalmente, la detección de la bacteria en los tejidos afectados varía dependiendo del curso de la enfermedad (Lawson and Gebhart, 2002b). En contraste, con la técnica de IHC, usando un anticuerpo policlonal, se pudo detectar el antígeno bacteriano en 18 de los 23 casos (78,2%). El antígeno bacteriano se encontró en el citoplasma apical de los enterocitos que proliferaban, en el epitelio de la mucosa intestinal y en el citoplasma de células mononucleares en la lámina propia. Estos hallazgos permiten sugerir, primero, que esta técnica es más sensible y podría ser de gran ayuda en aquellos casos que presenten severa destrucción del epitelio de la mucosa y que, segundo, el antígeno bacteriano se puede encontrar en macrófagos de la lámina propia (Kim *et al.*, 2000, Guedes *et al.*, 2002a).

Si se compara con la tinción de WS y la H&E, la técnica de IHC tiene mayor sensibilidad, gracias a la unión específica de los anticuerpos al antígeno bacteriano (cuando se usa un anticuerpo policlonal) o a la unión específica del anticuerpo monoclonal a la proteína de membrana de 21 KD (LsaA) (McCluskey, 2002). Jensen *et al.* (1997) utilizaron las técnicas de WS e IHC para estudiar 65 intestinos delgados de cerdos que habían mostrado lesiones macroscópicas proliferativas y 22 intestinos de cerdos sin lesiones macroscópicas aparentes, pero sospechosos de la enfermedad. Llamó la atención que detectaron 62 (95%) y 63 (98%) casos positivos, respectivamente, en el grupo de cerdos con lesiones características. Estos hallazgos fueron similares a los del presente trabajo. No obstante, en dicha investigación se detectó la presencia de casos positivos en 4 (18%) y 14 (64%) casos del grupo de lesiones inaparentes (Guedes *et al.* 2002a).

En este trabajo fue interesante observar que en 17 de los casos estudiados (94,4%), las criptas afectadas presentaban el antígeno bacteriano en su citoplasma de un 50 a un 90% (figura 7), lo que sugirió que las muestras fueron tomadas en un curso agudo de la infección o cuando los animales estaban se-

veramente afectados desde el punto de vista clínico. Esta observación fue demostrada en un estudio reciente de tipo experimental realizado por MacIntyre *et al.* (2003), donde se encontró que entre los 14 y los 21 días post-infección el mayor número de criptas están afectadas con lesiones de tipo proliferativo, lo que indicó que la replicación bacteriana depende enteramente de la proliferación celular. Se debe mencionar que anteriormente Jensen *et al.* (2000) habían reportado que las células infectadas de las criptas tienen una alta tasa de síntesis de ADN en el nucleolo comparada con células epiteliales no infectadas, lo que se asocia con una alta actividad mitótica. Este hallazgo fundamentaría la naturaleza proliferativa de la enfermedad.

Dentro de las observaciones que merecen destacarse también está el hallazgo del antígeno bacteriano en macrófagos de la lámina propia y en las placas de Peyer, lo que indicaría que la bacteria llega en alguna forma a la lámina propia y es fagocitada por los macrófagos, iniciando así el proceso inflamatorio y la respectiva respuesta inmune celular propia de este microorganismo. Este hallazgo también fue reportado por MacIntyre *et al.* (2003) y Guedes *et al.* (2002a).

La correspondencia estadística encontrada entre las pruebas sugiere que hay similitud entre los resultados que producen y que eventualmente se podría utilizar cualquiera de ellas. No obstante, se debe tener en cuenta que la coloración de plata no es específica, que se basa en la detección de microorganismos y no en la de antígenos y que en algunos casos es necesario su confirmación, debido a que en los casos crónicos y subclínicos la detección disminuye ampliamente, como se demostró en el estudio de cerdos de sacrificio (Guedes and Gebhart, 2002b).

Se puede afirmar que la palpación del íleon para detectar el aumento del grosor del intestino en cerdos de sacrificio que puedan estar relacionados con la enfermedad es de escaso valor diagnóstico y, por lo tanto, su uso no sería recomendable. Esta observación es similar a la descripción de Jensen *et al.* (1999). Sin embargo, se debe mencionar

que en el estudio de cerdos de sacrificio se encontró un caso que era grado 1 en la escala de palpación, presentó una lesión leve al examen histológico, a tinción de plata fue negativo y se detectó como positivo por medio de la inmunohistoquímica, lo que podría sugerir una mayor sensibilidad de esta metodología (Guedes and Gebhart, 2002b). De igual modo, esto podría implicar que los casos de campo se resuelven totalmente por los tratamientos con antibiótico que se administran en forma continua en la mayoría de las granjas del país o que las infecciones podrían estar en fase de resolución o ser subclínicas, pasando así desapercibidas por los métodos rutinarios de diagnóstico *post mortem* (Winkelman, 1996).

Finalmente, debido a la dificultad de cultivar el microorganismo, los laboratorios de diagnóstico deben usar otros métodos para demostrar la existencia de esta enfermedad en una granja o región geográfica en particular. El examen *post mortem* de un cerdo afectado junto con el estudio histopatológico de las lesiones intestinales y la coloración de plata constituyen una alternativa adecuada para el diagnóstico de casos clínicos de campo. No obstante, se pudo observar que la fijación con formalina preserva los antígenos bacterianos, lo que constituye una magnífica ventaja para revelar la presencia de *Lawsonia intracellularis* en los tejidos mediante el uso de inmunoperoxidasa indirecta.

## CONCLUSIONES

- Se demostró por primera vez la presencia del antígeno de *Lawsonia intracellularis* en el citoplasma apical de los enterocitos de las vellosidades y las criptas intestinales, empleando un anticuerpo policlonal en la técnica de inmunohistoquímica. Adicionalmente, se observó el antígeno bacteriano dentro del citoplasma de macrófagos de la lámina propia y los vasos sanguíneos de la mucosa intestinal.
- La coloración de plata puede ser de gran ayuda para el diagnóstico preliminar ante la detección de lesiones sospechosas en

casos de campo, pero se requiere en casos subclínicos y crónicos donde la lesión es confusa o imperceptible si no se tiene amplia experiencia en su diagnóstico.

- Los casos estudiados procedían de diferentes regiones del país. Por consiguiente, sería recomendable realizar estudios por métodos serológicos (como la inmunofluorescencia indirecta), para conocer la prevalencia de la enfermedad, y por métodos directos (como PCR), para detectar los patrones de infección en granjas comerciales.
- Se debe destacar que la palpación intestinal como método de monitoreo en plantas de sacrificio para detectar lesiones macroscópicas como el engrosamiento de la pared intestinal no es apropiado, debido a que su metodología es subjetiva, es decir, depende de la sensación que perciba la persona que está evaluando.
- En general, se pudo comprobar la importancia del uso de técnicas inmunológicas en combinación con el análisis histológico tradicional para la detección de microorganismos de difícil aislamiento, como la *Lawsonia intracellularis*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bane N, Gardner I, Roof J, Knittel J, Brush E and Gebhart C. The epidemiology of porcine proliferative enteropathy. IPVS. 107, 1998.
2. Cook R. Small intestine. In: Sims LD, Glastonbury (JRW/Eds.), Pathology of the pig. A diagnostic guide, Australia, pp. 57-87, 1996.
3. Cooper D and Gebhart C. Comparative aspects of proliferative enteritis. JAVMA. 212: 1446-1451, 1998.
4. Gebhart C. Antemortem diagnosis of proliferative enteritis. Allen D. Leman Swine Conference. 57-59, 1996.
5. Gebhart C and Guedes R. Proliferative enteropathy: diagnostics and immunity. American Associations of Swine Veterinarians Proceedings. 353-357, 2001.
6. Guedes R, Gebhart C, Winkelman N, Mackie Nuss R and Marsteller T. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. Allen D. Leman Swine Conference. 70-72, 2000.
7. Guedes R, Gebhart C, Winkelman N, Mackie Nuss R, Marsteller T and Deen J. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. Can J Vet Res. April, 66 (2): 99-1087, 2002a.
8. Guedes R and Gebhart C. Proliferative enteropathy (ileitis): learning how to use and interpret diagnostic tests. International Pigletter. 22: 19-22, 2002b.
9. Guedes R. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. J. Swine Health Prod. 12: 134-138, 2004a.
10. Guedes R and Gebhart C. Progression of *Lawsonia intracellularis* infection and mucosa immune response in pig. Proceedings of 18th IPVS congress. Vol 1: 250, 2004.
11. Jensen TK, Møller K, Christensen G, Leser T and Jorsal S. Monitoring ileitis and *Lawsonia intracellularis* in abattoir pigs. Vet Rec. 145, 613-615, 1999.
12. Jensen T, Lindecrona R, Pedersen A and Møller K. Observations on intestinal epithelial cell kinetics in pigs infected by *Lawsonia intracellularis*, *Bachyspira pilosicoli* and *Brachyspira hiodysenteriae*. IPVS. 65, 2000.
13. Jones G, Davies P, Rose R, Ward G and Murtaugh M. Comparison of technique for diagnosis of proliferative enteritis of swine. Am J Vet Res. 54: 1980-1985, 1993.
14. Kim J, Choi C, Cho W and Chae C. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for the detection of *Lawsonia intracellularis* in porcine intestinal tissues whit proliferative enteropathy. J Vet Med Sci. 65: 771-773, 2000.
15. Lawson G and Gebhart C. Proliferative enteropathy. J. Comp. Path. 122: 77-100, 2000.
16. Lomax I and Glock R. Naturally occurring porcine proliferative enteritis: pathologic and bacteriologic findings. Am J Vet Res. 43: 1608-1614, 1982.

17. MacIntyre N, Smith D, Shaw D, Thomson J and Rhind S. Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Vet Pathol* 40: 421-432, 2003.
18. McCluskey J, Hannigan J, Harris J, Wren B and Smith D. LsaA an antigen involved in cell attachment and invasion, expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection in vitro and in vivo. *Infection and Immunity* 70: 2899-2907, 2002.
19. McOrist S, Jasni R, Rowland A, Lawson G, Gebhart C and Bosworth A. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: Possible pathogenetic mechanisms. *J. Comp. Path.* 115: 35-45, 1996.
20. McOrist S, Smith S, Collins A, Smith S and Collins A. Ileitis and *Lawsonia intracellularis*: what do we know today? *Proceedings SDCSP.* 19-24, 2000.
21. McOrist S, Hardge T, Ohlinger V, Pohlenz J, Voets H and Walter D. Porcine Proliferative Enteropathy-Ileitis. *Technical Manual 1.0.* Boehringer Ingelheim, 2004.
22. Mogollón J, Ruiz S, Sanabria M, Hurtado M, Rincón M, Arbeláez G, Orjuela N y Hernández I. Evaluación serológica preliminar para la detección de anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis* en cerdos de granjas colombianas de producción intensiva. ICA, 2002.
23. Petrie A and Watson P. *Statistic for veterinary and animal science.* Blackwell science, 2000.
24. Rowland A and Lawson G. Porcine intestinal adenomatosis: A possible relationship with enteritis, regional ileitis and proliferative haemorrhagic enteropathy. *Vet Rec.* 97: 178-180, 1975.
25. Rowland A. Necrotic enteritis and regional ileitis in pig at slaughter. *Vet Rec.* 103: 338-339, 1978.
26. Schwartz K. Current status of "ileitis" in the Midwest. *Proceedings SDCSP.* 25-34, 2000.
27. Smith D and Lawson G. *Lawsonia intracellularis*: Getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet Microb* 82: 331-345, 2001.
28. Thompson S. Microscopic histochemical methods for the demonstrative of infectious microorganisms and immunohistochemical tecnies. In: *Selected histochemical and histopathology methods.* Ed: Charles Thomas publisher. Illinois pp 1048-1049, 1966.
29. Thrusfield M. *Epidemiología veterinaria.* Editorial Acribia. Zaragoza, 1990.
30. Ward G and Winkelman N. Recognizing the three forms of proliferative enteritis in swine. *Vet Med Food Anim Pract* 85: 197-203, 1990.
31. Wills R. Diarrhea in growing-finishing swine. *Vet Clinic of North American Food Animal Practice.* 16: 135-161, 2000.
32. Winkelman N. Treatment and control of proliferative enteritis: research and empirical information. *Allen D. Leman Swine Conference.* 60-62, 1996.