



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

**Trabajo de tesis realizado como requisito para
optar al título de DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS, LECTINHISTOQUIMICOS Y
ULTRAESTRUCTURALES EN ILEON DE BOVINO NORMAL Y CON LESIONES
DE PARATUBERCULOSIS**

Presentado por: Med. Vet. Massone, Adriana Raquel

Director: Dr. Gimeno, Eduardo Juan

Codirector: Dr. Idiart, Julio Roberto

Lugar de Trabajo: Instituto de Patología "Dr. Bernardo Epstein"

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

Miembros del Jurado: Perfumo, Carlos Juan
Carfagnini, Julio César
Gomez Dumm, César

2003

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a todos los que contribuyeron para la realización del presente trabajo, en particular:

- ▼ A mis directores, Dr. Eduardo J. Gimeno y Dr. Julio R. Idiart por el permanente asesoramiento, estímulo y apoyo incondicional.
- ▼ Al Dr. Alcides A. Martin quien colaboró en la elección del tema a trabajar.
- ▼ A los Profesores Kunio Doi y S. I. Itagaki, quienes me ayudaron en el aprendizaje de las técnicas de inmunohistoquímica y lectinhistoquímica.
- ▼ Al Dr. Miguel A. Petruccelli por su colaboración en el estudio de microscopía electrónica.
- ▼ A los Dres Jorge Ruager, Guillermo S. Ibarгойen, Enrique L. Portiansky y Gabriel Travería por su colaboración en la obtención y en el procesamiento del material.
- ▼ A los Histotecnólogos Alfredo M. Cinelli, Analía Catucci y Silvio Igal por su apoyo técnico y excelente disposición.
- ▼ A mis amigas María Alejandra Quiroga y Mariana A. Machuca.
- ▼ A Enrique F. Costa, Alberto D. Armocida, José I. Aguirre, Mónica E. Diessler y a mis compañeros de Cátedra Quique, Carolina y Lorena por compartir con alegría el trabajo.
- ▼ A Fernando, Josefina, Ferny y Facundo por estar conmigo.

INDICE DE CONTENIDOS

Título	1
Palabras claves	1
Resumen	1
Title	3
Key words	3
Summary	3
I- <u>Introducción</u>	5
1) Antecedentes	6
1.1) Aspectos históricos de la enfermedad	6
1.2) Características del microorganismo	8
1.3) Susceptibilidad del huésped	10
1.4) Patogenia	12
1.5) Inmunidad del intestino bovino. Tejido linfoide asociado al intestino (GALT)	17
1.6) Lesiones macro y microscópicas	23
1.7) Diagnóstico	25
1.8) Inmunohistoquímica	30
1.9) Lectinhistoquímica	32
1.10) Microscopía electrónica	34
2) Objetivos	35
II- <u>Materiales y métodos</u>	36
1) Material de estudio	36
2) Signos clínicos	37
3) Lesiones macroscópicas	39
4) Técnicas de inmunohistoquímica	43
5) Técnicas de lectinhistoquímica	48
6) Microscopía Electrónica	51

III- <u>Resultados</u>	53
1) Estudios histológicos	53
2) Estudios inmunohistoquímicos	61
3) Estudios lectinhistoquímicos	67
4) Estudios ultraestructurales	80
IV- <u>Discusión</u>	83
V- <u>Bibliografía</u>	95

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS, LECTINHISTOQUIMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN ILEON DE BOVINO NORMAL Y CON LESIONES DE PARATUBERCULOSIS

Palabras claves: Paratuberculosis, *Mycobacterium paratuberculosis*, lectinhistoquímica, inmunohistoquímica, microscopía electrónica.

Resumen

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina de íleon de 16 bovinos con signos clínicos y lesiones compatibles con paratuberculosis.

Los resultados obtenidos en la detección del *Mycobacterium paratuberculosis* (Mp) mediante las técnicas de Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP), Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC), Streptavidina-Biotina Marcada (LSAB) y de Plata-Inmuno-Oro (IGSS), utilizando un antisuero policlonal específico Mp cepa 2E, se compararon entre sí y con los obtenidos mediante la coloración de Ziehl-Neelsen. El Mp fue detectado, mediante las técnicas de inmunohistoquímica, en 14 de los 16 animales.

Los métodos inmunohistoquímicos resultaron los más efectivos para poner en evidencia escasas cantidades de bacilos. La técnica IGSS resultó ser la de mayor sensibilidad aunque es de realización más compleja.

Mediante el uso de las lectinas biotiniladas *Dolichus biflorus* (DBA), *Glycine maxims* (SBA), *Ulex europaeus-I* (UEA-I), *Triticum vulgare* (WGA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Concanavalia ensiformis* (Con A), *Griffonia simplicifolia*

I (GS I) y *Ricinus communis-I* (RCA-I) se demostraron diferencias cuando se compararon los patrones de afinidad de los animales afectados y de 5 animales utilizados como control. Estas diferencias demostrarían deficiencias de los enterocitos y de las células caliciformes en la producción de mucinas.

También se realizaron estudios ultraestructurales en 6 casos con lesiones severas de la enfermedad. Se observaron cambios degenerativos en los enterocitos, bacterias libres en el citoplasma y también en los fagosomas de los macrófagos. En los fagolisosomas se constataron microorganismos intactos y fragmentados.

IMMUNOHISTOCHEMICAL, LECTINHISTOCHEMICAL AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES IN NORMAL AND PARATUBERCULOSIS-AFFECTED BOVINE ILEUM

Key words: Paratuberculosis, *Mycobacterium paratuberculosis*, immunohistochemistry, lectin histochemistry, electron microscopy.

Summary

Immunohistochemical studies were performed in formalin-fixed, paraffin-embedded ileum samples of 16 bovines with clinical signs and lesions compatible with paratuberculosis.

In order to detect *Mycobacterium paratuberculosis* (Mp) the following immunohistochemical methods were employed: Peroxidase-Antiperoxidase (PAP), Avidin-Biotin-Complex (ABC), Labelled Streptavidin-Biotin (LSAB) and Immuno-Gold-Silver-Stain (IGSS) using a commercial hyperimmune serum against Mp strain 2E. The results were compared to each other and with those obtained by means of Ziehl Neelsen (ZN). The Mp was detected in 14 of the 16 animals.

The immunohistochemical techniques were more effective to detect small number of bacilli. The IGSS provided higher sensitivity although it is a more complex to be carried out.

The lectin binding pattern was also studied in 16 affected animals as well as in 5 normal animals. The following biotinylated lectines were applied: *Dolichus biflorus* (DBA), *Glycine max* (SBA), *Ulex europaeus*-I (UEA-I),

Triticum vulgare (WGA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Griffonia simplicifolia-I* (GS I) and *Ricinus communis-I* (RCA-I). The modifications observed would demonstrate deficiencies of the enterocytes and the goblet cells in the production of glycoconjugates.

Ultrastructural studies were also carried out in advanced cases of the disease. Degenerative changes were seen in the epithelial cells free bacilli in both the cytoplasm and the phagosomes of the macrophages were also found. In addition, intact and fragmented microorganisms were observed into the phagolysosomes.

I - Introducción

La paratuberculosis (pTBC) o enfermedad de Johne es una enteritis crónica infecciosa de los rumiantes producida por el *Mycobacterium paratuberculosis* (Mp). Es una de las enfermedades que más afectan la producción bovina mundial (9, 79, 82). Probablemente sea una de las afecciones más frecuentes en algunas regiones de nuestro país, a pesar de que muchas veces pasa completamente inadvertida (57).

Resulta muy difícil estimar su incidencia real debido a las dificultades para formular un diagnóstico definitivo en el animal vivo. Un control efectivo sólo puede lograrse mediante la detección temprana de los animales afectados (9, 100, 127).

Se han descrito diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de la pTBC. No obstante, la inadecuada sensibilidad o especificidad continúan siendo un problema en todas ellas. El aislamiento de Mp a partir de materia fecal permite un diagnóstico definitivo, pero el microorganismo requiere de 6 a 12 semanas para su crecimiento en medios de cultivo enriquecidos. Además, este procedimiento es engorroso y muy costoso. La identificación de componentes antigénicos del microorganismo en materia fecal constituye una posibilidad muy promisoriosa (28, 100, 134).

1) - Antecedentes

1.1) Aspectos históricos de la enfermedad

En el año 1826, d'Aroval comunicó una forma de enteritis presente en el ganado vacuno con diarrea crónica. Años más tarde, en 1881, Hansen y Nielsen observaron un marcado engrosamiento de la mucosa intestinal en bovinos muertos por esta forma especial de enteritis (24, 30).

En 1895, Johne y Frothingham (30) describieron esta enfermedad y lograron demostrar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en segmentos de intestino de animales afectados. La presencia de estos bacilos los llevó a pensar en una forma atípica de tuberculosis. Posteriormente, en 1906, Bang determinó que la enfermedad no era tuberculosis y la llamó enteritis pseudotuberculosa o enfermedad de Johne (24).

En 1910, Twort aisló el microorganismo productor de la enfermedad y lo denominó *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*. Posteriormente, la enfermedad fue denominada paratuberculosis o enfermedad de Johne y el microorganismo causal *Mycobacterium paratuberculosis* (24, 30).

En 1920, la pTBC fue descrita en Africa y Asia y, a partir de 1930, en América del Sur, con lo que se reconoció su distribución mundial (30).

En años recientes se ha avanzado mucho en el estudio de la enfermedad. Cabe destacar, entre otras investigaciones, la descripción de la secuencia de nucleótidos en el DNA del Mp hecha simultáneamente por Des Collins en Nueva Zelanda y por Mc Fadden en Inglaterra, en 1989 (30). Más del 99% del DNA del Mp es idéntico al del *Mycobacterium avium*. La importancia de

este estudio genético radica en poder diferenciar al Mp del *M. avium*. La presencia de copias múltiples de cadenas cortas de DNA se denomina secuencia de inserción. La primera de estas secuencias descubiertas, única en el Mp, recibió el nombre de IS900. Las sondas de DNA utilizadas para la detección del Mp en animales clínicamente enfermos se basan en la detección de IS900. Una segunda secuencia de inserción, llamada IS901, en un 60% similar a la secuencia de DNA IS900, fue descubierta en *M. avium* (3, 30, 60, 81, 130). La importancia de dicho hallazgo radica también en la posibilidad de detectar Mp sin recurrir al cultivo de la bacteria en un medio artificial (30, 97, 117, 154).

1.2) Características del microorganismo

El Mp es un bacilo pequeño (0,5 por 1,5 μm), recto o levemente curvado y algunas veces ramificado, Gram positivo, pero no fácilmente coloreable. Dada la constitución bioquímica de la cápsula, cuando se utiliza la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN), el Mp se observa de color rojo. El microscopio de barrido revela la rugosidad de su pared. El microscopio electrónico de transmisión muestra la estructura trilaminar de la pared celular y de las vacuolas intracelulares. El bacilo es rico en lípidos en el citoplasma y en la pared celular. Estos son básicamente ceras que contienen ácidos micólicos, con largas cadenas ramificadas solubles en cloroformo (29).

El cultivo de este microorganismo es difícil. En los cultivos crece solamente con el agregado de bacterias muertas por calor. Este requerimiento puede ser satisfecho suplementando el medio de cultivo con compuestos llamados micobactinas. Todos los miembros del género *Mycobacterium*, a excepción de Mp, producen micobactinas (5, 98, 101, 138). En medios así enriquecidos el crecimiento bacteriano es lento, necesitándose 3 a 4 meses para su aislamiento primario. El tamaño, el color y la superficie de las colonias dependen, en parte, del medio de cultivo. En el medio agar huevo de Herrold, el más comúnmente utilizado, las colonias aparecen pequeñas, blanco amarillentas y rugosas (29, 98).

El Mp puede sobrevivir fuera del huésped durante mucho tiempo: permanece viable hasta 163 días en el agua de río, hasta 270 días en aguas estancadas y hasta 11 meses en las heces bovinas (28, 128). Sin embargo, en la orina de bovino no sobrevive más de una semana (29, 98). Existen publicaciones que indican que el Mp resiste la pasteurización. Sobrevive

mejor en soluciones ácidas (pH menor que 6) que en soluciones neutras (29, 98).

Las micobacterias son resistentes a antibióticos efectivos para otras bacterias. Sólo unos pocos pueden ser utilizados en infecciones con Mp. Esto mismo sucede con el *Mycobacterium avium*, resistente a antibióticos efectivos contra la tuberculosis. El Mp, al igual que otras micobacterias, es resistente a desinfectantes comunes, resultando efectivos los compuestos fenólicos y cresílicos (29).

1.3) Susceptibilidad del huésped

La pTBC afecta a bovinos, ovinos y caprinos. También afecta a rumiantes salvajes, constituyendo un verdadero problema entre las poblaciones de jardines zoológicos (17, 28). Los terneros de menos de 30 días de edad son los más susceptibles a la infección, especialmente en las primeras 24 horas de vida, ya que en este momento las macromoléculas pueden penetrar la mucosa intestinal mediante mecanismos de absorción. Esto puede explicar porqué los mecanismos de defensa del intestino son menos eficaces contra el Mp en este momento. Se ha estimado que sólo un tercio de los terneros expuestos al bacilo resultan crónicamente infectados. La cantidad de bacilos ingeridos y los mecanismos de defensa del huésped determinan la gravedad y la duración de la infección. No se conoce la cantidad de bacilos necesarios para producir la infección, pero la alta morbilidad sugiere que la ingestión de una escasa cantidad es suficiente, al menos en animales susceptibles (32).

La enfermedad es de curso crónico, con largos periodos de incubación. Algunos animales expuestos al bacilo nunca desarrollan la enfermedad en su forma clínica, pero se transforman en portadores asintomáticos y eliminan bacilos con las heces durante toda su vida. El portador asintomático verdadero nunca desarrolla la enfermedad clínica. Teniendo en cuenta el largo periodo de incubación, resulta difícil diferenciar entre enfermos subclínicos y portadores (32, 65).

Se han estudiado diversos animales de laboratorio como modelos experimentales de la enfermedad. Entre ellos podemos citar a ratones, ratas, gatos, conejos, hamsters y cobayos (28). En estos animales se pueden

apreciar fenómenos inflamatorios en el tracto intestinal y en los linfonódulos satélites (28, 84).

La enfermedad de Crohn o ileítis regional, es una ileocolitis crónica, granulomatosa del hombre. Esta enfermedad debe su nombre al investigador que la diferenció de la tuberculosis intestinal en 1932. Los pacientes afectados sufren pérdida de peso, dolor abdominal, diarrea o constipación, vómitos y malestar generalizado (33). En 1984, Chiodini y colaboradores describieron una especie no clasificada de *Mycobacterium* en los pacientes que padecían la enfermedad (16, 26, 27, 75). Lo propio hicieron otros investigadores, años más tarde (16, 26). Estudios genéticos más recientes demostraron que el microorganismo aislado en esos estudios es idéntico al Mp (16, 97).

Desde que la enfermedad de Crohn fue descrita, se ha propuesto una gran cantidad de agentes etiológicos. Estos incluyen alérgenos, agentes infecciosos y también reacciones autoinmunes. Numerosos estudios sugirieron que la enfermedad de Crohn es un desorden en la respuesta inmune intestinal a estímulos o insultos persistentes del intestino, causados por la acción de agentes infecciosos tales como el Mp (16). El posible carácter zoonótico de la pTBC ha sido enfatizado con frecuencia en años recientes (26, 75, 116).

1.4) Patogenia

La infección ocurre luego de la ingestión del microorganismo, siendo la ruta fecal-oral el modo de transmisión más frecuente. La ingestión de los bacilos ocurre más comúnmente en los primeros días de vida, o bien cuando los animales son mantenidos en suelos contaminados con heces. En zonas endémicas pueden estar expuestos a grandes volúmenes de materia fecal contaminada. Alrededor del 7% de las vacas enfermas en lactación excretan Mp en la leche (28, 29, 32). La leche contaminada con materia fecal, a partir de ubres sucias, es una fuente de infección mucho más importante que la eliminación de microorganismos con la leche (32). Las lesiones histopatológicas tempranas de paratuberculosis son multifocales, lo que sugiere una infección múltiple (136).

Se han recuperado bacilos de testículos (28), semen (28, 84), glándulas bulbouretrales (28, 84), próstata (28, 84), vesículas seminales (84), glándula mamaria (28, 144), útero (28) y fetos (28). El aislamiento del Mp del semen y del tracto reproductivo de los machos, como así también del semen procesado y congelado para inseminación artificial, sugiere la posible infección por vía genital (28, 84, 143).

Las bacterias logran atravesar la pared intestinal a través de las células M, especializadas en la captación de antígenos (18, 72, 148), y luego migran a las placas de Peyer, transportadas por los macrófagos (4, 148).

El hierro y las proteínas unidas al hierro resultan esenciales en el crecimiento bacteriano y en la resistencia del huésped contra la infección. Las micobacterias producen micobactinas y exoquelinas; estudios *in vitro* sugieren que toman del huésped proteínas unidas al hierro, tales como ferritina,

transferrina y lactoferrinas. Mediante estudios inmunohistoquímicos se demostró la presencia de ferritina y lactoferrina en el íleon de bovinos con lesiones de pTBC, así como pequeñas cantidades de transferrina (103).

Poco es lo que se conoce sobre los mecanismos que regulan el crecimiento del Mp. Mediante la comprobación de diferencias en el tiempo necesario para su desarrollo en cultivos de macrófagos, con o sin hierro, se ha demostrado que este elemento regula su crecimiento intracelular. La presencia de proteínas ligadas al hierro en células del sistema fagocítico mononuclear, resulta de importancia en el crecimiento de la bacteria y permite sustentar la hipótesis de que el Mp puede crecer *in vivo* sin el aporte de micobactina (28).

Al igual que el *Mycobacterium tuberculosis*, el Mp no produce toxinas. Tampoco causa destrucción de las células en las que se aloja (8, 32, 136).

Inmediatamente después de invadir la lámina propia intestinal, el organismo es fagocitado por macrófagos no activados residentes de la mucosa. Los mecanismos bactericidas de los macrófagos son menos potentes que los empleados por los neutrófilos. De esta forma, se favorece la colonización de los macrófagos. Existe un lapso entre la invasión y la expresión de la inmunidad celular debido a la citocinética de la infección. Este tiempo es necesario para el procesamiento del antígeno, la formación por recombinación de clones de células T antígeno-específicos, la expansión de dicho clon y la activación de los componentes celulares de la inmunidad (104, 115, 136).

Una vez que se activan los mecanismos inmunes, el Mp continúa proliferando, mientras que los mecanismos T-dependientes atraen

células mononucleares fagocíticas al sitio de activación. Los macrófagos activados recientemente rodean la lesión inicial y comienza la formación del granuloma (64, 102). Los macrófagos no activados son lisados y liberan las bacterias que habían fagocitado, las que son endocitadas inmediatamente por macrófagos activados. El Mp posee mecanismos que inhiben su digestión dentro del macrófago (8, 32, 71, 111, 122).

Estos fenómenos inmunológicos, ocurridos tempranamente, determinan si la infección progresará hacia su forma clínica o si se resolverá. Esto depende de la cantidad de exposiciones al microorganismo, de la forma en que el antígeno es presentado a la población de células T y de la habilidad del huésped de enviar poblaciones celulares adecuadas al sitio de inflamación (8, 64, 71).

Todos estos acontecimientos son controlados exclusivamente por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), con escasa o nula estimulación de la respuesta inmune periférica (8, 32).

Los focos de infección contienen una gran carga bacteriana. Debido a la incapacidad del huésped para detener el desarrollo del Mp, éste sigue proliferando y continúan llegando células mononucleares fagocíticas al foco de inflamación. Finalmente, el granuloma inicial se expande, ya sea por la migración normal de los macrófagos fuera del foco de infección o por la ausencia o la disminución de los fenómenos citocinéticos (32, 34).

Los agregados de macrófagos que se localizan en la profundidad de la mucosa se dirigen hacia las vénulas poscapilares y, posteriormente, hacia los linfonódulos, activando de esta manera la respuesta inmune periférica. La magnitud de la migración celular hacia la circulación

depende del número de lesiones cercanas a las vénulas poscapilares y de la expansión de cada de uno de los focos de infección. El tipo de antígeno expresado por estos macrófagos determina el tipo de respuesta (humoral o celular) (18).

La incapacidad del GALT para establecer una respuesta inmune efectiva determina la llegada de más células inflamatorias y, por lo tanto, la expansión de las lesiones. Las lesiones multifocales se expanden con bordes poco definidos y tienden a unirse (18).

La respuesta humoral no se activa en los estadios intermedios de la enfermedad. Esta respuesta comienza a desarrollarse cuando la infección progresa y una mayor cantidad de macrófagos emigra desde el tracto intestinal, con liberación de antígenos del Mp a la circulación general (28, 32, 34).

La respuesta inmune que se produce durante la infección crónica es compleja (7, 8). Los animales afectados atraviesan períodos de respuesta mediada por células, respuesta humoral o anergia (8, 115). Inicialmente, cuando los bacilos son ingeridos por los macrófagos, la respuesta es celular. Luego comienza la respuesta humoral. Generalmente, hay una relación inversa entre la respuesta celular y la respuesta humoral. La infección temprana se caracteriza por una respuesta mediada por células y, a medida que la enfermedad progresa, la respuesta se transforma en humoral. En los estadios finales de la enfermedad hay un estado de anergia inmunológica (34).

La emaciación ocurre durante la infección crónica debido a la pérdida proteica como consecuencia de la enteritis. Las lesiones en la mucosa y en la

submucosa y la obstrucción linfática pueden provocar la interferencia parcial del transporte de aminoácidos (21, 65, 67, 136).

1.5) Inmunidad del intestino del bovino: tejido linfoide asociado al intestino (GALT)

El GALT ha sido caracterizado en bovinos, ovinos, cerdos, equinos, caninos, felinos, ratas y humanos (18, 85, 125). Consiste en células linfoides intraepiteliales, células linfoides y reticuloendoteliales en la lámina propia y agregados linfoides organizados en la mucosa y en la submucosa. También forman parte del GALT las placas de Peyer (46, 64, 67, 68, 77, 85, 86, 88).

Agregados linfoides

El estudio microscópico de los agregados linfoides permite diferenciar dos tipos. Unos forman nódulos, constituidos por un centro germinal y una capa periférica de linfocitos cubierta por un epitelio asociado, caracterizado por escasos enterocitos, células sin un ribete en cepillo bien definido, linfocitos intraepiteliales y escasas células caliciformes (19, 85) (Fig. 1). Los otros forman un complejo linfoglandular. En este caso, los folículos linfoides están ubicados debajo de la muscular de la mucosa. Mediante cortes seriados se puede observar un divertículo epitelial que se extiende desde el epitelio de las criptas, a través de la muscular de la mucosa, hasta penetrar en el tejido linfoide donde se ramifica en numerosos divertículos pequeños. En el centro, una parte del tejido linfoide protruye hacia la luz. Este tejido está cubierto por epitelio asociado al folículo, de igual manera que en los nódulos linfoides (85, 86, 87, 129) (Fig. 2).

La función de los agregados linfoides consiste en presentar antígenos a los linfocitos subepiteliales y regular la respuesta inmune (46, 64, 67, 89).

Placas de Peyer (PP)

Estas consisten en un conjunto de folículos linfoides localizados en la lámina propia y en la submucosa del intestino delgado. Están cubiertas por epitelio asociado al folículo y poseen vasos linfáticos eferentes, pero no aferentes. Estos vasos linfáticos drenan en el linfonódulo mesentérico correspondiente.

Las funciones de estas estructuras son las mismas que las descritas para los agregados linfoides (46, 64, 67, 89).

Epitelio asociado al folículo

La superficie de los agregados linfoides está cubierta por un epitelio especializado llamado epitelio asociado al folículo. Está constituido por células epiteliales con capacidad de absorción, escasa cantidad de células caliciformes y células M entremezcladas con las células epiteliales. También se pueden observar escasos linfocitos y ocasionales macrófagos (18, 88, 90).

Células M

El epitelio que cubre los folículos linfoides y las PP contiene células especializadas: las células M. Estas células, ubicadas estratégicamente en la proximidad de los vasos linfáticos, facilitan el transporte de las macromoléculas desde la luz y, por lo tanto, el contacto de los antígenos de la luz intestinal con los linfocitos intraepiteliales y subepiteliales, como así también con los macrófagos.

Las células M han sido descritas en una gran variedad de mamíferos. En la bolsa de Fabricio de las aves también se han observado células epiteliales capaces de transportar macromoléculas. Existen variantes significativas en la relación entre las células M y otras células epiteliales. En conejos, las células M constituyen el 90% de las células que recubren las PP, mientras que sólo representan el 10 % en humanos, ratones y ratas. Estas células también se encuentran en los bronquios de los conejos y sobre los agregados linfoides de las tonsilas humanas (18, 148).

Las células M pueden ser identificadas con certeza mediante el microscopio electrónico aunque, con microscopía óptica, la discontinuidad del ribete en cepillo puede sugerir su presencia. La figura 3 muestra la estructura típica de las células M de los mamíferos. La superficie apical posee regular cantidad de microvellosidades o micropliegues mucho más cortos e irregulares que las microvellosidades presentes en los enterocitos. El núcleo se encuentra localizado en la región basal de la célula. En el citoplasma se observan el aparato de Golgi poco desarrollado, algunas mitocondrias y escasos ribosomas libres o adheridos al retículo endoplásmico. Los lisosomas

son escasos en relación con los existentes en los enterocitos (18, 90). Las células M se encuentran unidas a sus vecinas mediante complejos de unión. En sus paredes laterales (en los espacios que no se encuentran en contacto con las células mononucleares) se hallan presentes los desmosomas. Al igual que los enterocitos, se apoyan sobre una delgada membrana basal. La célula precursora y el sitio de diferenciación de las células M son aún desconocidos. Algunos estudios afirman una diferenciación a partir de los enterocitos maduros de la superficie de los agregados linfoides (18), mientras que otros sostienen que se desarrollan a partir de células indiferenciadas intestinales (18, 148).

La función de las células M es transportar macromoléculas mediante fenómenos de endocitosis, sin modificarlas. Las macromoléculas se adhieren a la superficie apical de la célula M e inmediatamente después es posible encontrarlas en el citoplasma, en la superficie lateral o, directamente, en el espacio intercelular (18, 148).

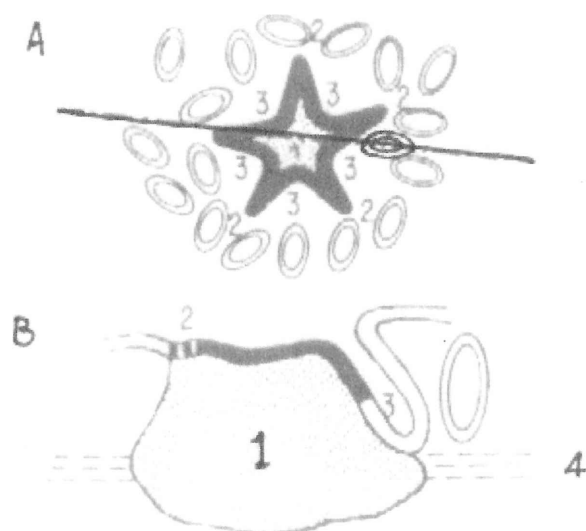


Figura 1: Esquema de un nódulo de la lámina propia con un folículo linfoide (1), vellosidades y criptas adyacentes (2 y 3) y muscular de la mucosa (4). La línea negra gruesa representa el epitelio asociado al folículo.

A) Plano paralelo y cercano a la superficie intestinal.

B) Plano perpendicular a la superficie intestinal (indicado en A con una línea).

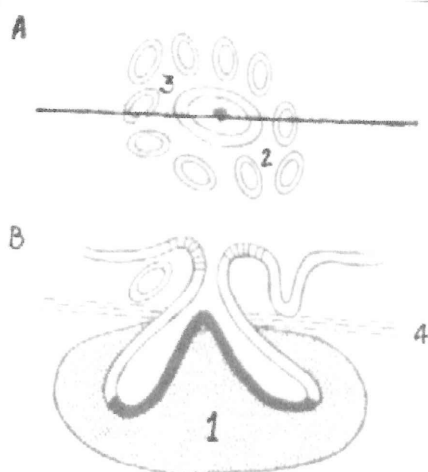


Figura 2: Complejo linfoglandular. Tejido linfoide (1), vellosidades y criptas adyacentes (2 y 3) y muscular de la mucosa (4). La línea negra gruesa representa el epitelio asociado al folículo y las rayas transversales el epitelio de entrada al complejo linfoglandular .

A) Plano paralelo y cercano a la superficie intestinal.

B) Plano perpendicular a la superficie intestinal (indicado en A con una línea).

Figuras extraídas de: Liebler, E.M.; Pohlenz, J.F.; Woode, G.N. (1988). "Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of calves I. Distribution and histology". *Vet. Pathol.* 25:503-508.

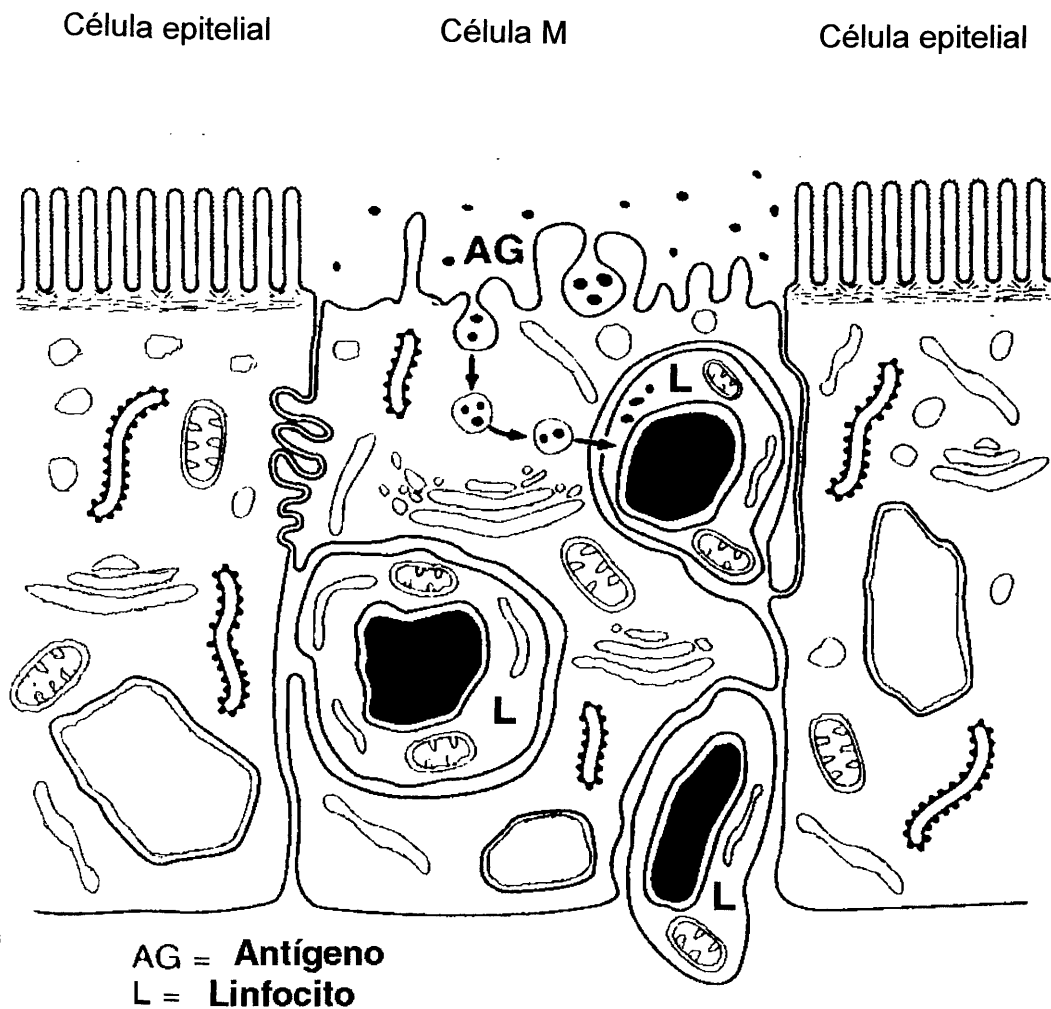


Figura 3: Esquema de la una célula M con linfocitos intraepiteliales migrando a través de la misma.

Extraído de: Strombeck, D.R.; Guiford, W.G. (1990). Small Animal Gastroenterology. 2nd ed. Stonegate Publishing Company. Davis, Ca.

1.6) Lesiones macro y microscópicas

En los bovinos, las lesiones se caracterizan por la presencia de un granuloma difuso, sin necrosis ni fibrosis (6, 12, 17, 28).

Los animales afectados sufren emaciación, con marcada pérdida de masa muscular, atrofia serosa de los tejidos adiposos y edema intermandibular y en las cavidades corporales. Los cambios macroscópicos primarios ocurren en el intestino delgado y grueso y en los linfonódulos satélites. La pared intestinal aparece algunas veces edematosa y la mucosa presenta pliegues transversales a veces muy notorios (aspecto cerebroide). Entre estos pliegues se observan congestión y pequeñas úlceras. En los casos menos severos, la mucosa presenta una superficie granular (6, 12, 20, 28).

Las lesiones intestinales pueden hallarse desde el duodeno hasta el recto. La válvula ileocecal, considerada como el sitio inicial de lesión, frecuentemente aparece engrosada (6, 12).

Los linfonódulos mesentéricos, en especial los ileocecales, están siempre agrandados, pálidos y edematosos, no observándose claramente la diferencia entre corteza y médula. Los vasos linfáticos pueden observarse como gruesos cordones (6, 12, 28). Puede verse, además, mineralización de la pared de las arterias de gran calibre.

Los cambios microscópicos más evidentes se presentan en la lámina propia y en la submucosa y consisten en acúmulos de macrófagos con citoplasma abundante y finamente vacuolado y gran cantidad de células epitelioides. Estas células contienen grandes cantidades de bacilos en su

citoplasma. Además, se observan linfocitos, ya sea en forma difusa o formando acúmulos (6, 12, 28).

La inflamación de los vasos linfáticos mesentéricos es uno de los cambios más constantes. Inicialmente, los vasos linfáticos están rodeados de linfocitos y de células plasmáticas y pueden contener células epitelioides en la luz (6, 12, 28). Frecuentemente, a la observación microscópica, se observa linfadenitis granulomatosa.

Otras lesiones observadas con microscopía óptica incluyen degeneración de miocardiocitos y mineralización de las fibras elásticas de las grandes arterias.

1.7) Diagnóstico

Se han descrito numerosos métodos de diagnóstico de la enfermedad. En la actualidad existen pruebas basadas en la detección del agente causal, de anticuerpos específicos en el suero del animal sospechoso o de la inmunidad mediada por células mediante la evaluación del engrosamiento cutáneo tras la inoculación de extractos de micobacterias. Cinco de estas pruebas existen en el comercio a disposición de los laboratorios de diagnóstico. La mayoría requiere un equipamiento complejo de laboratorio (1, 2, 3, 31, 35, 36, 73, 96).

La sensibilidad de estas pruebas (porcentaje de animales infectados que resultan positivos) varía considerablemente en relación con la patogenia de la enfermedad. En los estadios primarios de la infección, antes de que el animal comience a eliminar microorganismos por materia fecal o que comience a desarrollar respuesta inmune, las pruebas arrojan resultados negativos. A medida que la infección avanza, los resultados comienzan a ser positivos. Las pruebas poseen la máxima sensibilidad cuando los animales muestran signos clínicos de infección, tales como diarrea o pérdida de peso (31, 35).

No existe, por lo tanto, una prueba que abarque todas las fases de la enfermedad. Cuando se elige una prueba diagnóstica, es importante tener en claro:

- La presencia de falsos negativos y falsos positivos y
- La epidemiología de la enfermedad

Una opción confiable para el diagnóstico de la pTBC es detectar el microorganismo responsable de la infección. Si partimos de la base

de que la bacteria no se encuentra en las heces de los animales sanos, la detección del Mp debe interpretarse como prueba de infección. La detección del Mp puede llevarse a cabo mediante:

- Cultivo bacteriano
- Sondas de DNA

El cultivo bacteriano ha sido utilizado desde hace más de 100 años. Muchos laboratorios han perfeccionado el cultivo en todo el mundo. El cultivo del Mp requiere escaso equipamiento y es técnicamente sencillo de realizar. Sin embargo, es caro y se necesita un entrenamiento adecuado para identificar el crecimiento bacteriano en el medio. Este método es utilizado como rutina para detectar, en forma individual, animales enfermos. El cultivo de materia fecal correctamente realizado es el método más sensible y específico. Desafortunadamente, el microorganismo se detecta en materia fecal entre uno y dos años después de la aparición de los signos clínicos. La mayor desventaja de este método es el prolongado período (12 a 16 semanas) necesario para el desarrollo del Mp (48, 73, 123).

Con las sondas de DNA es posible detectar el Mp sin necesidad de recurrir al cultivo bacteriano. Esta prueba puede llevarse a cabo en menos de 3 días. La mayor desventaja de este método de diagnóstico es su alto costo (3, 28, 31).

La detección de anticuerpos contra Mp en el suero es una fuerte evidencia de que el animal está infectado (31, 35, 49). Existen tres técnicas para la detección de estos anticuerpos:

- Fijación del complemento (FC)
- Inmunodifusión en agar-gel (IDAG)

- Enzimoimmunoensayo (ELISA)

FC: produce numerosos falsos positivos y falsos negativos y, además, es de baja sensibilidad (31). Su ventaja es que permite detectar rápidamente los animales con infecciones muy manifiestas, pero no permite detectar animales con baja carga bacteriana (50, 135).

IDAG: valiosa en aquellos casos en que el animal presenta pérdida de peso y/o diarrea. La mayor desventaja es la baja sensibilidad. Generalmente no logra detectar animales que eliminan microorganismos en la materia fecal pero no presentan signos clínicos (31, 50, 135, 139).

ELISA: detecta anticuerpos en el suero de los animales sospechosos (155). Esta prueba cuantifica la respuesta inmune a los antígenos del Mp. Posee la ventaja de ser un método rápido (2 a 4 días) y de bajo costo y permite procesar una gran cantidad de muestras al mismo tiempo (139). Vale aclarar en este punto que los bovinos pueden estar expuestos a gran variedad de micobacterias, por lo que los anticuerpos detectados mediante la prueba de ELISA no corresponden exclusivamente al Mp. Se ha descrito una variante para detectar los anticuerpos contra Mp en leche, pero no existen demasiados estudios para poder evaluar su sensibilidad (36).

Las pruebas que se basan en la medición de la respuesta inmune del animal consisten en la inyección de extractos de micobacterias y en la posterior observación del engrosamiento de la piel horas más tarde. Si bien esta técnica es de suma utilidad para la detección de tuberculosis en humanos y en animales, no lo es para la detección de la pTBC bovina. Estas pruebas son:

- Inoculación intradérmica de johnina

- Inoculación intradérmica de derivado proteico purificado bovino (PPD-bovino) y aviar (PPD-aviar)

Inoculación intradérmica de johnina: produce una reacción inflamatoria en los animales sensibilizados, con engrosamiento en el sitio de inyección. El resultado se lee usualmente a las 48 horas. Se considera reacción positiva el engrosamiento de la piel superior a los 5 mm (31) producido entre 24 y 48 horas posteriores a la inoculación.

Inoculación intradérmica de derivado proteico purificado bovino (PPD-bovino) y aviar (PPD-aviar): se realiza mediante la inoculación de PPD-bovino y PPD-aviar. Se inocula 0,1 ml de cada una de ellos en la tabla del cuello con una separación de 12 cm. A las 72 horas se realiza la lectura. Se considera positivo un aumento en el grosor de la piel de más de 3 mm. Si las respuestas son mayores al PPD-aviar se considera infección por *Mycobacterium avium* u otras micobacterias relacionadas (31).

Existen otros métodos para el diagnóstico de la enfermedad, tales como la biopsia de la mucosa rectal y , experimentalmente, la biopsia del linfonódulo ileocecal (10).

Biopsia de la mucosa rectal: se procede a realizar biopsias por raspado y luego se extiende el material extraído sobre portaobjetos. Posteriormente se tiñen con coloraciones para microorganismos ácido-alcohol resistentes y se evalúan microscópicamente. Posee la desventaja de no ser una prueba específica ya que en el recto podemos hallar otros microorganismos ácido-alcohol resistentes (por ejemplo *Mycobacterium phlei*, una bacteria saprófita). Además, solo el 25 %

de los animales infectados desarrolla lesión en la mucosa rectal, por lo que pueden ocurrir numerosos resultados falsos negativos.

La coloración de Ziehl-Neelsen es la técnica tradicional para detectar Mp en los tejidos. En los casos positivos, los organismos ácido-alcohol resistentes se hallan agrupados, libres o en el interior de los macrófagos. Diversas técnicas de inmunohistoquímica han resultado más sensibles para la detección del Mp en cortes de tejidos (94, 95). También puede utilizarse el método de Fite.

1.8) Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ), al combinar técnicas histológicas, inmunológicas y bioquímicas, permite localizar componentes tisulares definidos *in situ* mediante el empleo de anticuerpos específicos y de moléculas marcadoras. La IHQ se inició en la década del 40 con el desarrollo de las técnicas de inmunofluorescencia (38, 39).

Con el desarrollo de anticuerpos marcados con enzimas se logró un enorme adelanto; muchos antígenos pudieron ser detectados en tejidos fijados en formaldehído e incluidos en parafina, con microscopios de luz de uso corriente y en cortes en los cuales se mantenían los detalles morfológicos (45).

Las técnicas de IHQ para detectar micobacterias poseen mayor sensibilidad que las tinciones específicas para gérmenes ácido-alcohol resistentes (66, 93). Estudios comparativos entre métodos inmunohistoquímicos, tinciones para agentes ácido-alcohol resistentes y cultivos de materia fecal para detectar Mp en cabras afectadas, demostraron mayor porcentaje de efectividad de los métodos inmunohistoquímicos que los otros dos (109, 147).

La simplicidad y la rapidez de las técnicas de IHQ son cualidades valiosas en el momento de elegir las como métodos de diagnóstico de pTBC en cortes de tejidos. Otra ventaja es que permiten utilizar tejidos fijados en formol. De un pequeño trozo de tejido puede obtenerse una gran cantidad de cortes, los que pueden ser utilizados en diversas pruebas de IHQ (45, 112).

Principales técnicas de inmunohistoquímica

Todos los métodos de IHQ se basan en la conjugación de distintos marcadores con moléculas de inmunoglobulinas. Luego de producida la unión antígeno-anticuerpo, el marcador es localizado de diversas maneras, generalmente por una reacción tintorial, detectando de esta forma dónde se localiza el antígeno problema (45). Las técnicas más difundidas se basan en la marcación con peroxidasa de rábano picante ("horseradish peroxidase"), con fosfatasa alcalina o con oro coloidal. En todos los métodos inmunoenzimáticos se utiliza una reacción enzima-sustrato que transforma la unión antígeno anticuerpo en un producto final coloreado (45).

1.9) Lectinohistoquímica

Las lectinas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas o glicoproteínas, de origen no inmune, que tienen como propiedad la habilidad de reconocer y unirse con alta especificidad y en forma reversible a hidratos de carbono (HC). De esa propiedad resultan dos características salientes de las lectinas: a) aglutinar eritrocitos y b) precipitar glicoconjugados (47, 49, 94, 118).

Las lectinas se obtienen a partir de vegetales (semillas y plantas), tejidos animales y bacterias. Su valor como método histoquímico reside en su habilidad para localizar, identificar y distinguir HC tisulares de gran sensibilidad y especificidad, tanto en tejidos normales como patológicos. En los primeros, las técnicas de lectinohistoquímica se aplican al estudio de los procesos de reconocimiento, maduración, diferenciación y especialización celular funcional, existiendo una marcada especificidad por receptores de célula, tejido y especie animal (47, 55). El reconocimiento celular es un paso inicial en los procesos de interacción celular, como por ejemplo: fertilización, embriogénesis, migración celular, organogénesis e infección microbiana. En los tejidos lesionados, se han logrado avances más espectaculares principalmente en el estudio de las inflamaciones crónicas, displasias y neoplasias de los sistemas digestivo, respiratorio y genitourinario, mediante el análisis comparativo con tejidos normales. Las lectinas se han utilizado para estudiar la diferenciación normal y anormal de numerosas células, incluyendo las del tracto gastrointestinal de los mamíferos (41, 42, 43, 44, 69).

Los cambios en los glucoconjugados del intestino están asociados con cambios en la edad de los animales y en la dieta. Las

enfermedades inflamatorias y neoplásicas y la administración de drogas pueden alterar la naturaleza de las glicoproteínas intestinales (47, 49, 52, 70, 105).

En ratas, se observan cambios significativos en la superficie de las células del epitelio intestinal de acuerdo con su grado de maduración en la cripta. Otros estudios demuestran que los glicoconjugados de las células caliciformes de la mucosa del yeyuno de humanos varían con la maduración normal de la célula (16).

Se han realizado estudios de los cambios en la composición de los mucopolisacáridos de las células caliciformes del íleon en los bovinos con pTBC. Esto resulta de interés ya que en la pTBC subclínica, estos cambios aparecen antes de apreciarse modificaciones morfológicas (94).

En el caso específico del íleon bovino normal, existen muy pocos estudios lectinohistoquímicos para determinar la composición de los glicoconjugados. Lo mismo sucede con el íleon de bovinos afectados de pTBC (94).

1.10) Microscopía electrónica

Existen escasos trabajos sobre la ultraestructura de las lesiones de pTBC. En muchos aspectos, los resultados de dichos trabajos son poco esclarecedores.

En estos estudios se observaron macrófagos con bacterias libres en el citoplasma y otros en los fagosomas y en los fagolisosomas. Los fagolisosomas contenían bacterias intactas y escasa cantidad de bacterias lisadas. Estas bacterias lisadas presentaban un aspecto laminar similar a la mielina (78, 80, 114).

También se han descrito alteraciones de las organelas de los macrófagos, en correlación con el número de bacterias en los fagosomas y en los fagolisosomas (78, 80, 114).

2) Objetivos

Los objetivos propuestos para el presente trabajo fueron los siguientes:

- a)** Evaluar la utilidad de diferentes técnicas de inmunohistoquímica en cortes de íleon de bovinos enfermos o sospechosos de padecer pTBC.
- b)** Comparar las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de diagnóstico citados por la literatura con las técnicas de inmunohistoquímica.
- c)** Estudiar posibles variaciones en la expresión de glucoconjugados en el íleon de animales afectados con pTBC.

Estudiar la ultraestructura de las lesiones inflamatorias del íleon de animales bovinos espontáneamente afectados por pTBC.

II - Materiales y métodos

1) Material de estudio

El material de estudio fue seleccionado de los archivos del Instituto de Patología “Dr. Bernardo Epstein” de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, donde se encuentran protocolizados y archivados todos los casos recibidos desde 1966. Asimismo se recibió material de animales sospechosos de padecer paratuberculosis, remitidos por el Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (C.E.D.I.V.E) de Chascomús y provenientes de establecimientos de la zona.

Se seleccionaron 16 casos (13 hembras y 3 machos) con diagnóstico anatomopatológico de paratuberculosis. Todos estos casos correspondieron a bovinos mayores de 2 años, tanto machos como hembras, provenientes de diferentes zonas de la provincia de Buenos Aires. Los animales pertenecían a rodeos lecheros (Holando Argentino) o de cría (Aberdeen Angus y Hereford).

Asimismo, se utilizaron, como control, muestras de íleon de 5 bovinos (3 machos y 2 hembras) de 2 años de edad, normales y sin lesiones de pTBC. Como control positivo, se utilizaron muestras de íleon de 2 bovinos, con aislamiento de m pTBC, a los cuales se les realizó cultivo del agente a partir de materia fecal en el Instituto de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”.

2) Signos clínicos

En la tabla 1 se consignan algunos signos clínicos y la severidad de cada uno de ellos.

Las historias clínicas de los animales seleccionados indicaban desde cuadros graves de diarrea incoercible hasta otros donde este signo clínico, si bien estaba presente, no era muy significativo. En algunos animales se observaron remisiones parciales de la diarrea. Asociado a la diarrea se observó deshidratación de ligera a marcada y pelo hirsuto. Algunos bovinos presentaban emaciación marcada y acentuada pérdida de peso.

La historia clínica describía, en algunos de los animales afectados, fiebre intermitente, con apetito normal en los estadios iniciales, para disminuir marcadamente en los estadios finales de la enfermedad. En los estadios terminales de algunos animales se constataron heces diarreicas con sangre y edema del vientre, además de debilidad y emaciación.

El edema submaxilar sólo se observó en dos de los animales sospechosos de padecer infección.

Tabla 1: Grados de severidad de algunos signos clínicos en los animales seleccionados

	<i>Diarrea</i>	<i>Emaciación</i>	<i>Edema submaxilar</i>
1	++	+	-
2	++	++	-
3	+++	++	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+++	++	-
7	++	-	+
8	+	+	-
9	++	-	++
10	++	-	-
11	+	+	-
12	+++	++	-
13	++	+	-
14	++	+	-
15	+++	+++	-
16	+++	+++	-

Grado de severidad: +++ marcado
 ++ moderado
 + leve
 - ausente

3) Lesiones macroscópicas

En la tabla 2 se consignan algunos de los hallazgos macroscópicos descriptos.

Las lesiones macroscópicas intestinales se observaron, al realizar las necropsias, desde el duodeno hasta el recto, constatándose un mayor número de localizaciones en el yeyuno e íleon.

La pared intestinal se observó engrosada en forma variable y, en algunos casos, edematosa. La mucosa presentaba pliegues transversales que no desaparecían al estirar el segmento de intestino afectado. La mucosa, entre estos pliegues, mostraba pequeñas úlceras y áreas congestivas. En los casos menos severos de la enfermedad, la mucosa presentaba un aspecto aterciopelado o con pequeños nódulos de 1 a 2 mm de diámetro.

En la serosa del intestino se observó marcada linfangiectasia y, en algunos casos, presencia de múltiples y pequeños nódulos de consistencia firme en el trayecto de los vasos linfáticos (Fig. 4 y 5). La linfadenomegalia de los linfonódulos ileoceales fue, en algunos casos, notoria, observándose edematosos al corte, sin una clara diferenciación entre la corteza y la médula.

En algunos animales se constataron distintos grados de emaciación, atrofia serosa del tejido adiposo, edema submaxilar y colecta serosa en las cavidades corporales.

Figura 4: Ileon de bovino afectado por pTBC. Pared engrosada, edematosa y dilatación de los vasos linfáticos (→).

Figura 5: Severa dilatación de los vasos linfáticos y pequeños nódulos amarillos en el trayecto de los mismos (→).



Figura 4

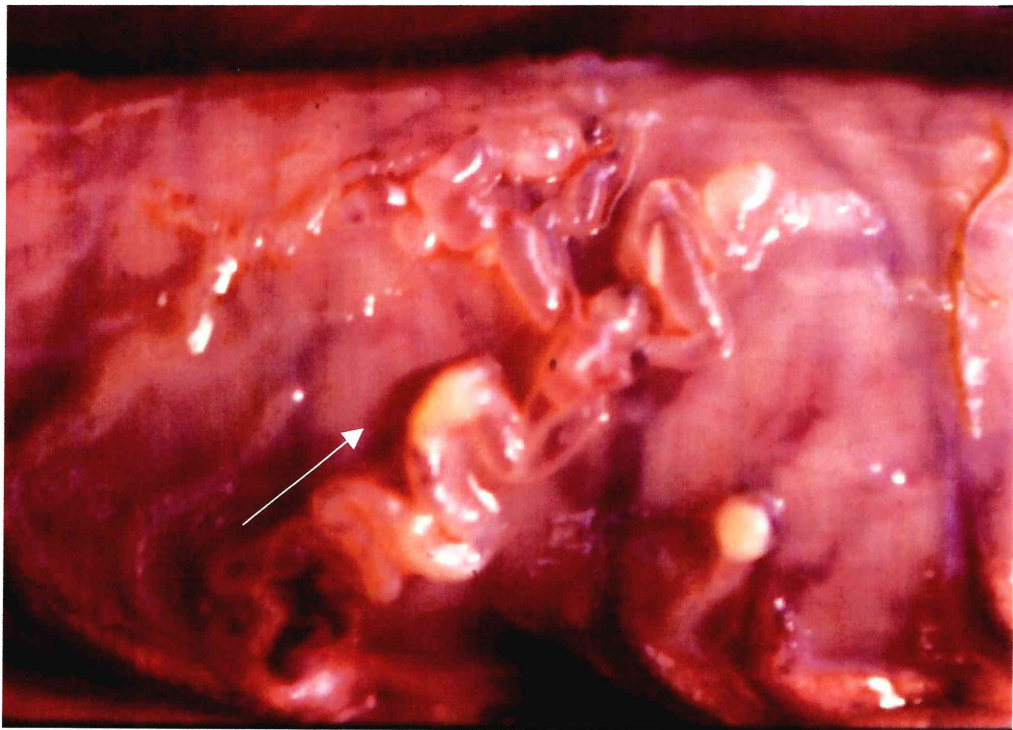


Figura 5

Tabla 2. Algunos hallazgos macroscópicos en los casos seleccionados y grados de severidad

	<i>Engrosamiento de la pared intestinal</i>	<i>Linfoadenomegalia y edema de los linfonódulos ileocecales</i>
1	+	+
2	++	++
3	+++	++
4	+	-
5	+	+
6	+++	+++
7	++	+
8	+	+
9	++	+
0	+	+
11	+	+
12	+++	++
13	+	+
14	++	++
15	+++	+++
16	+++	+++

Grado de severidad: +++ marcado
 ++ moderado
 + leve
 - ausente

4) Técnicas inmunohistoquímicas

Suero primario

Se utilizó suero comercial hiperimmune anti Mp cepa ZE (Dako Co., USA), diluido en PBS 1: 500.

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron sobre cortes de íleon. Se prepararon portaobjetos revestidos con una película adhesiva, sumergiéndolos en una solución de neoprene al 0,2% en toluol. Sobre estos portaobjetos se adhirieron cortes de 3 μm de espesor.

Técnicas de inmunoperoxidasa:

Las técnicas utilizadas fueron:

- a) Complejo Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP).
- b) Método del Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC).
- c) Método de la Streptavidina-Biotina Marcada (LSAB).

a) Complejo Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP)

Este método implica el empleo de 3 reactivos: un anticuerpo primario específico, un anticuerpo secundario y el complejo PAP (Dako Co., USA) compuesto por tres moléculas de peroxidasa y dos de inmunoglobulina antiperoxidasa. El anticuerpo secundario o “puente” es capaz de unirse al anticuerpo primario y al complejo PAP al mismo tiempo.

PROCEDIMIENTOS DE MARCACION

Los cortes del material seleccionado se desparafinaron e hidrataron mediante dos baños de xilol de 10 minutos cada uno y dos baños de alcohol absoluto de 3 minutos cada uno. Se bloqueó la actividad de la

peroxidasa endógena incluyendo los cortes en una solución de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto al 3% durante 30 minutos. Luego se continuó con la hidratación mediante pasajes por una batería decreciente de alcoholes de 5 minutos cada uno. A continuación, se incubaron los cortes con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% durante 30 minutos, para bloquear las adherencias inespecíficas. Se cubrieron las muestras con el antisuero primario 18 horas a 4 °C. Luego de lavar se incubaron los cortes con el complejo PAP durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se reveló con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y finalmente se utilizó hematoxilina de Gill para la coloración de contraste.

Se realizaron controles negativos, omitiéndose colocar el suero primario.

La observación fue realizada por dos operadores utilizando un objetivo de 40 X.

b) Método del Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC)

Este método se basa en la unión entre la avidina y la biotina conjugada con la peroxidasa. Comprende tres pasos: incubación con el anticuerpo primario, incubación con el anticuerpo biotinilado y aplicación del complejo avidina-biotina-peroxidasa.

Se utilizó el kit Vectastain ABC System, Vector Lab.

PROCEDIMIENTOS DE MARCACION

Luego de desparafinar, hidratar e inactivar la peroxidasa endógena, como en la técnica anterior, los cortes se incubaron durante 30 minutos con suero normal de conejo para bloquear las adherencias inespecíficas. Se cubrieron las muestras con el antisuero primario durante 18

horas a 4 °C. Después de lavar con PBS se incubaron los cortes con el anticuerpo biotinilado durante 30 minutos. A continuación, se cubrieron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 30 minutos y se procedió a revelar con DAB, utilizándose hematoxilina de Gill como coloración de contraste.

Se realizaron controles negativos omitiéndose colocar el suero primario.

La observación fue realizada por dos operadores utilizando un objetivo de 40 X.

c) Método de la Streptavidina-Biotina Marcada (LSAB)

Se fundamenta en la unión entre la avidina y la biotina conjugada con la peroxidasa. En el primer paso se incubó con el anticuerpo primario, luego con el anticuerpo biotinilado y, por último, con una solución de streptavidina marcada con peroxidasa.

Se utilizó el kit LSAB 2 HRP (DAKO, Co. USA).

PROCEDIMIENTOS DE MARCACION

Luego de desparafinar, hidratar e inactivar la peroxidasa endógena como en la técnica anterior, los cortes se incubaron con suero normal de conejo durante 30 minutos para bloquear las adherencias inespecíficas. Luego se cubrieron con el antisuero primario durante 18 horas a 4 °C. A continuación, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo puente marcado con biotina durante 10 minutos. Posteriormente se cubrieron con la solución de streptavidina, biotina y peroxidasa durante 10 minutos. Finalmente, se cubrieron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 30

solución de streptavidina, biotina y peroxidasa durante 10 minutos. Finalmente, se cubrieron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 30 minutos y se procedió a revelar con DAB, realizándose coloración de contraste con hematoxilina de Gill.

Se realizaron controles negativos, omitiéndose colocar el suero primario.

La observación fue realizada por dos operadores utilizando un objetivo de 40 X.

Técnicas basadas en el empleo de oro coloidal:

Durante la década del 70 se extendió el uso de las técnicas del oro coloidal en microscopía electrónica basados en la unión de partículas de oro (de 5 a 120 nm de diámetro) a inmunoglobulinas. Sigue siendo el método más empleado para localizar antígenos a nivel ultraestructural; la opacidad de las partículas de oro a los electrones permite visualizarlas con facilidad (44).

Método de Plata-Inmuno-Oro (IGSS)

Las partículas de oro son demasiado pequeñas para permitir su observación con el microscopio óptico; esa limitante fue superada por Holgate y col. Un anticuerpo específico no conjugado se une al antígeno celular. El segundo anticuerpo, marcado con una partícula de oro, se une al anticuerpo primario. El tercer paso consiste en detectar la presencia de la partícula de oro en el corte; esto se consigue aplicando al preparado una

solución argéntica de color negro que se deposita sobre la partícula, permitiendo su observación con microscopio óptico (44).

Se utilizó el kit IGSS (Jansen, Bélgica).

PROCEDIMIENTOS DE MARCACION

Luego de desparafinar, hidratar e inactivar la peroxidasa endógena, como en las técnicas descritas anteriormente, los cortes se incubaron con suero normal de conejo durante 30 minutos para bloquear las adherencias inespecíficas. Se cubrieron las muestras con el antisuero primario durante 18 horas a 4 °C. Luego de lavar el material con PBS, se procedió a incubarlo con la solución de Auro-Probe y se incubó durante 30 minutos. A continuación, se cubrieron los cortes con anticuerpo secundario marcado con partículas de oro. Se realizó coloración de contraste con hematoxilina de Gill.

Se realizaron controles negativos, omitiéndose cubrir los cortes con el anticuerpo primario.

La observación fue realizada por dos operadores utilizando un objetivo de 40 X.

5) Técnicas lectinhistoquímicas

En el presente trabajo se utilizaron ocho lectinas biotiniladas (Vectastain Elite, Vector Lab Inc. Burlingame CA. USA). En la tabla 3 se indican sus especificidades por los hidratos de carbono, sus abreviaturas y las concentraciones utilizadas.

Las técnicas de lectinhistoquímica se realizaron sobre cortes de íleon de los 16 bovinos seleccionados y de íleon de bovinos utilizados como controles. Los portaobjetos fueron tratados de la misma manera que para los estudios inmunohistoquímicos.

PROCEDIMIENTOS DE MARCACION

Los cortes se desparafinaron y rehidrataron mediante pasajes por xilol y alcohol en concentraciones decrecientes. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó mediante la incubación de los cortes con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol absoluto, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La tinción inespecífica de fondo se redujo cubriendo las muestras con una solución de BSA al 1% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron, durante 12 horas a 4 °C, con las lectinas biotiniladas en las concentraciones indicadas en la tabla 3. Posteriormente, se adicionó una solución del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC), preparada según las indicaciones de su fabricante, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se reveló mediante inmersión de los cortes en una solución de DAB. Se realizó un doble

control negativo, bloqueándose cada lectina con el azúcar específico y sustituyendo las lectinas por PBS.

La observación fue realizada por dos operadores utilizando un objetivo de 40 X.

Digestión con neuraminidasa:

Con el propósito de remover los residuos sialoglicoconjugados en las terminales de ácido siálico, los cortes se incubaron en una solución de neuraminidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (Nakara Chemicals Co., Kyoto, Japón) durante 18 horas a 39-41 °C, previo a la incubación con la lectina PNA.

Tabla 3. Lectinas utilizadas para la identificación de residuos hidrocarbonados en cortes de tejidos.

<u>Lectina</u>	<u>Acrónimo</u>	<u>Especificidad por HC</u>	<u>Concentración</u> <u>($\mu\text{g/ml}$)</u>
<i>Dolichus biflorus</i>	DBA	α - D – GalNAc	30
<i>Glycine maximus</i>	SBA	α - D – GalNAc; β – D- GalNAc	30
<i>Ulex-europaeus-I</i>	UEA – I	α - N – Fuc	30
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β – D – GlcNAc; NeuNAc	30
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	β – D – Gal; β 1-3 -D–GalNAc	10
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con A	α - D – Man; α – D – Glc	30
<i>Griffonia simplicifolia I</i>	GS – I	α - D – Gal	30
<i>Ricinus communis</i>	RCA - I	β – Gal; α – Gal; Gal NAc	30

Especificidad de las lectinas por los hidratos de carbono (HC) según Goldstein y Hayes (1978).

Fuc: Fucosa; Gal: galactosa; Gal NAc: N–acetilgalactosamina; Glc: glucosa; GlcNAc: N–acetilglucosamina; Man: Manosa; NeuNAc: ácido N–acetilneuramínico (ácido siálico)

7) Microscopía Electrónica

El reprocesado de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina, para ser estudiadas mediante el microscopio electrónico de transmisión es un procedimiento de gran utilidad para su utilización en estudios retrospectivos. Se debe tener en cuenta, en este caso, la estructura fina de las células se encuentra alterada. Sin embargo, las bacterias son muy resistentes a los cambios autolíticos, incluso en tejidos extraídos de animales, varias horas después de su muerte.

En la actualidad, existen varios métodos para reprocesar material embebido en parafina para su observación mediante microscopio electrónico.

En el presente trabajo se utilizó material previamente fijado en formol al 10% de 4 bovinos (casos 3, 6, 12 y 14) con lesiones macroscópicas evidentes de pTBC y también se realizó, en los casos 15 y 16, el procesamiento para microscopía electrónica de fijación e imbibición con resinas epoxi.

PROCEDIMIENTO

Fijación e inclusión con resinas epoxi

Las muestras se fijaron, a 4 °C durante 2 horas, en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% en PBS 0,1M (pH 7,4). Se realizó una posfijación en tetróxido de osmio al 1% en el mismo buffer. La infiltración e imbibición de las muestras se realizó en resinas epoxi (Quetol 812, Nisshin EM Co. Ltd., Tokio, Japón). Los cortes ultrafinos se tiñeron con acetato de uranilo/citrato de plomo y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM-1200 EX (JEOL Co. Ltd., Tokio, Japón).

Reprocesamiento de muestras fijadas en formol

El material se cortó en trozos pequeños (no más de 1mm de espesor) y se lavó con buffer fosfato durante 2 días. Se refijó el material con tetraóxido de osmio durante 2 horas y luego se procedió de acuerdo con la técnica descrita anteriormente

III - Resultados

1) Estudios histológicos

En la tabla 4 se consignan algunos de los hallazgos microscópicos que se describen a continuación.

Las lesiones histopatológicas observadas en los animales seleccionados fueron clasificadas en tres grupos de acuerdo con el infiltrado celular de la mucosa del íleon y de la atrofia de las vellosidades. De los 16 animales seleccionados, 8 animales mostraron leve, 7 moderada y 1 marcada infiltración de la mucosa. También fue tenido en cuenta el grado de atrofia de las vellosidades intestinales de los segmentos estudiados: 9 mostraron atrofia escasa, 5 presentaron atrofia moderada y 2 atrofia severa.

En los animales con infiltrado celular leve, se observó escaso infiltrado de células epitelioides y de Langhans en la lámina propia de las vellosidades intestinales. Las primeras se observaron diseminadas en la paracorteza de los linfonódulos ileocecales estudiados.

Los cambios histológicos observados en los animales con moderada infiltración se describieron como pequeños grupos de células epitelioides en la lámina propia de las vellosidades intestinales, en la submucosa, en el espacio subcapsular de los linfonódulos ileo cecales y en la zona paracorteza de los mismos (Fig. 6).

En los cortes de íleon con severa infiltración, se observaron lesiones coincidentes con las descripciones halladas en la literatura. Gran cantidad de células epitelioides se hallaban infiltrando la lámina propia y la

submucosa de varios segmentos intestinales, hasta el límite con la capa muscular interna (Fig. 7 y 8). Estos agregados de células inflamatorias, desplazaban a las criptas (Fig. 9 y 10) y consistían en acúmulos de células epitelioides y macrófagos rodeados por una corona de linfocitos. Los vasos linfáticos, se observaron sumamente dilatados y algunos con incipientes acúmulos de células inflamatorias adheridas a su pared (Fig. 11).

Las vellosidades intestinales se apreciaban distorsionadas y con distinto grado de atrofia considerando el largo de las mismas (Fig. 6). Las glándulas presentaban distensión y, en algunos casos, abundante mucus en su interior.

La respuesta granulomatosa observada en varios de los cortes estudiados, se extendía hacia los linfonódulos mesentéricos satélites. Los vasos linfáticos aferentes se apreciaron distendidos e infiltrados de macrófagos y, en algunos casos, de células epitelioides. Los senos subcapsulares se hallaban infiltrados por estas células. Los nódulos linfoides se observaban disminuídos de tamaño.

Con la técnica de ZN se constató la presencia de moderada a abundante cantidad de bacilos ácido-alcohol resistentes en dos casos y escasa cantidad en once casos (Fig. 12). En tres casos no se observaron bacilos. Los bacilos estaban en el interior de los macrófagos que infiltraban la mucosa y la submucosa del íleon y el espacio subcapsular y la paracorteza de los linfonódulos. Algunos bacilos se hallaban también libres entre las células.

Tabla 4: Grados de severidad de algunos hallazgos microscópicos en los casos seleccionados.

	<i>Edema de la mucosa.</i>	<i>Infiltrado celular en la mucosa</i>	<i>Atrofia de las vellosidades</i>	<i>Infiltrado celular en la zona subcapsular del linfonódulo</i>
1	-	+	+	+
2	++	++	+++	++
3	++	++	++	++
4	+	+	++	-
5	-	+	+	+
6	++	++	++	+++
7	-	+	+	+
8	-	+	+	-
9	-	++	+	+
10	-	+	+	+
11	+	+	+	++
12	+	++	+	++
13	-	+	+	+
14	+	++	++	+
15	+	++	+	+++
16	++	+++	+++	+++

Grados de severidad: +++ marcado
 ++ moderado
 + leve
 - ausente

Figura 6: Vellosidades intestinales con atrofia e infiltración de células epitelioides y linfocitos en la lámina propia (H & E. Obj. 20 X).

Figura 7: Infiltración de células epitelioides, macrófagos y linfocitos en la lámina propia de la mucosa y en la submucosa hasta el límite con la capa muscular interna (H & E. Obj. 20X).

Figura 8: Mayor detalle de la figura 7 (H & E. Obj. 40 X).

Figura 9: Grupo de células epitelioides rodeado de linfocitos en la mucosa y ausencia de criptas (H & E. Obj. 20 X).

Figura 10: Mayor detalle de la figura 9 (H & E. Obj. 40 X).

Figura 11: Dilatación de los vasos linfáticos de la submucosa, acúmulos de células inflamatorias adheridos a sus paredes e infiltración linfocitaria perivascular (H & E. Obj. 20 X).

Figura 12: Abundante cantidad de bacilos ácido-alcohol resistentes libres y en el interior de los macrófagos. Mucosa de íleon (Ziehl Neelsen Obj. 100 X).

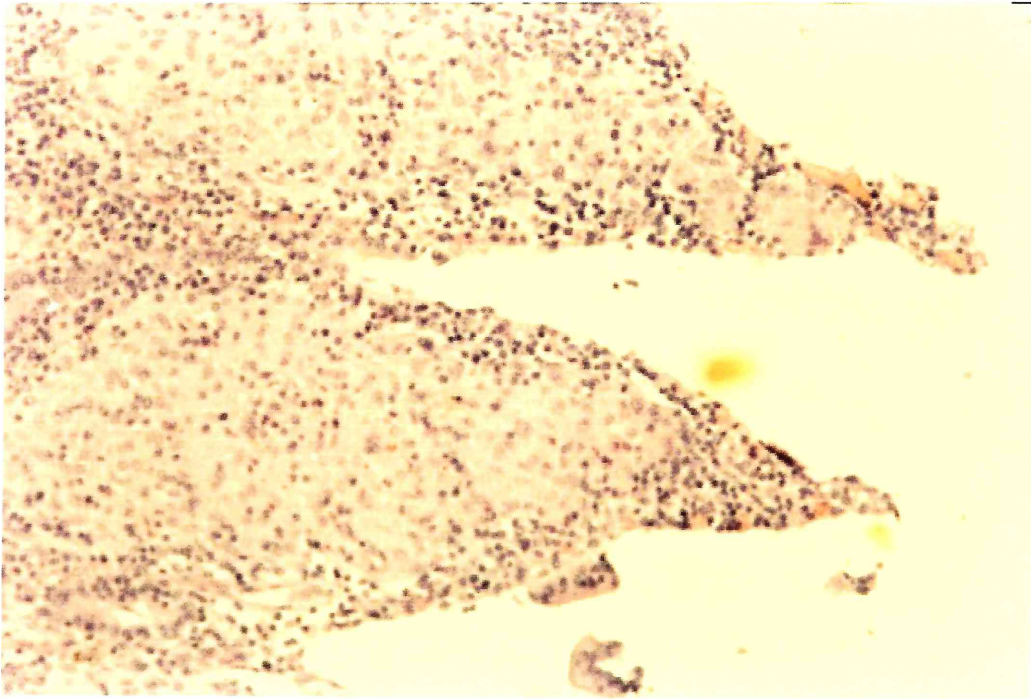


Figura 6

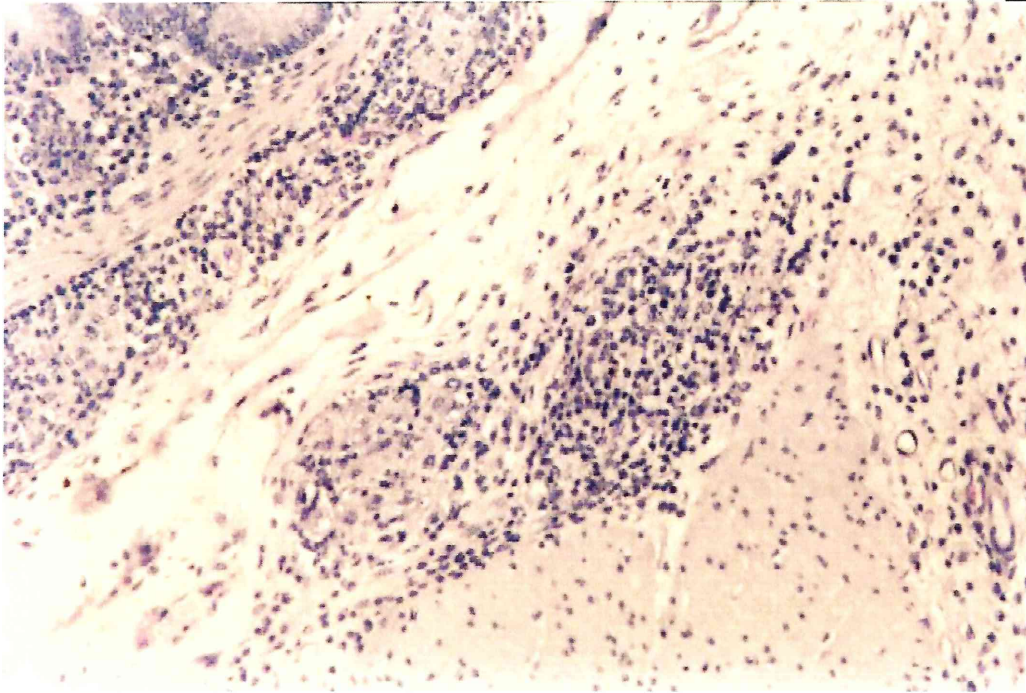


Figura 7

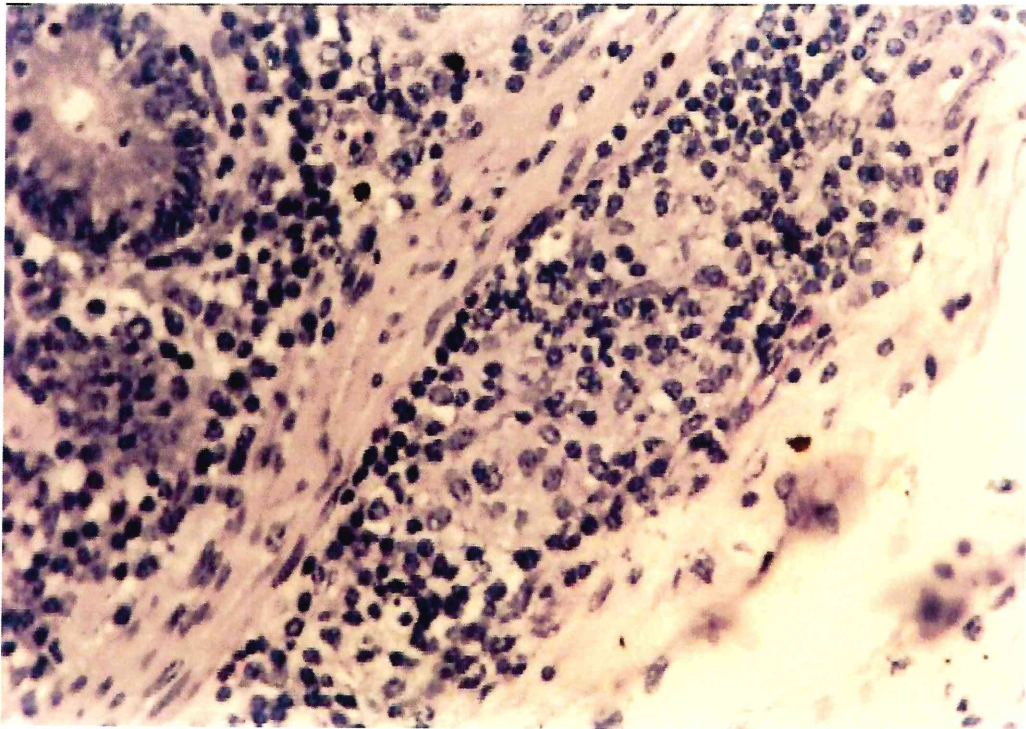


Figura 8

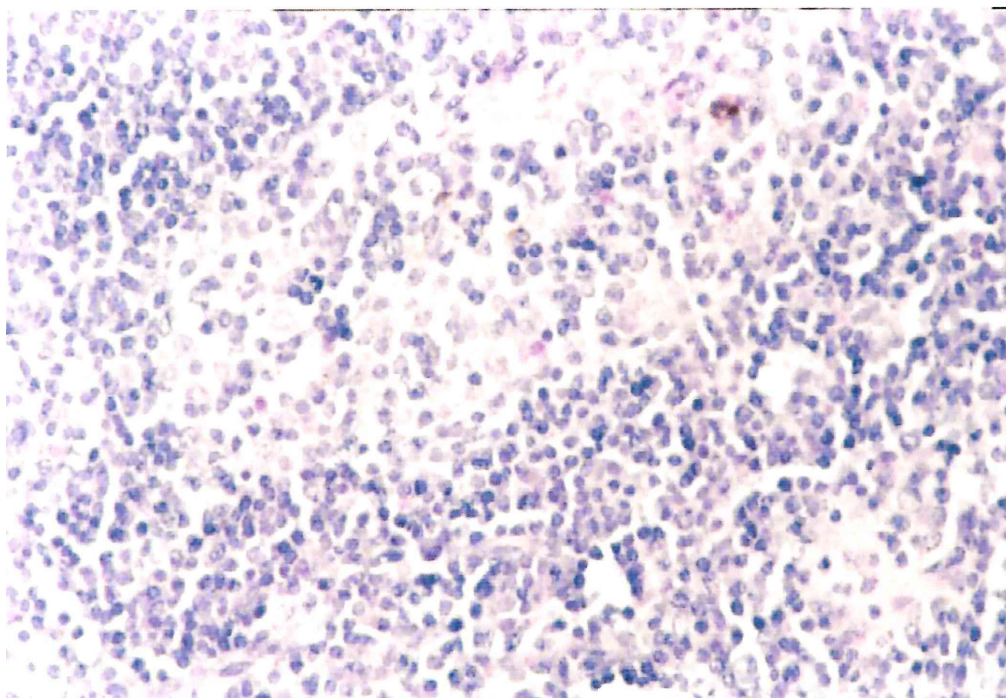


Figura 9

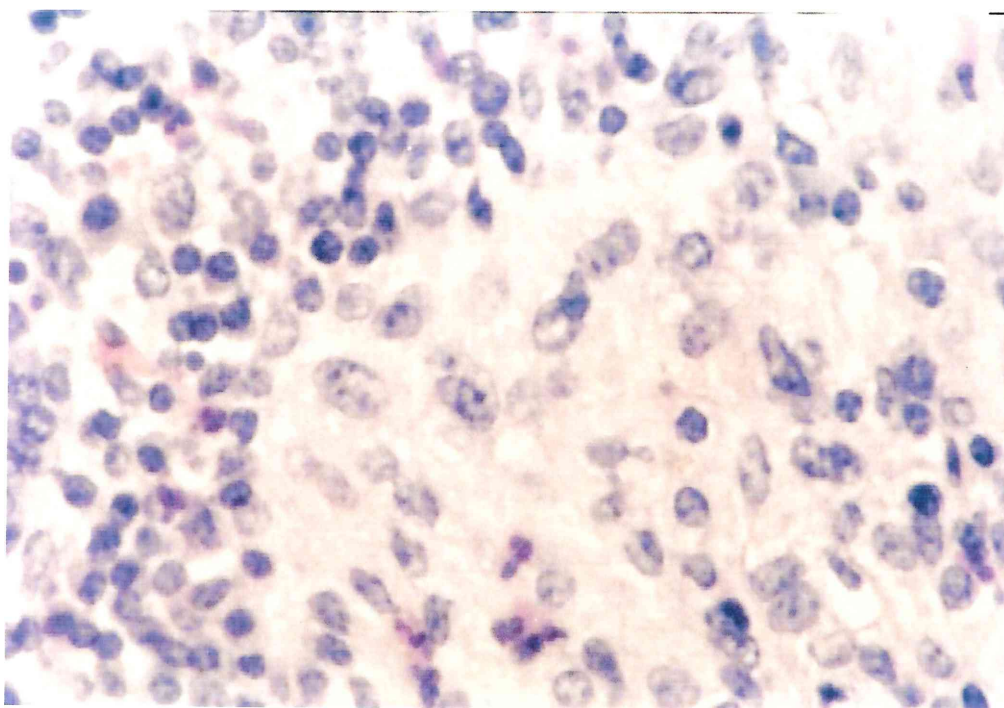


Figura 10

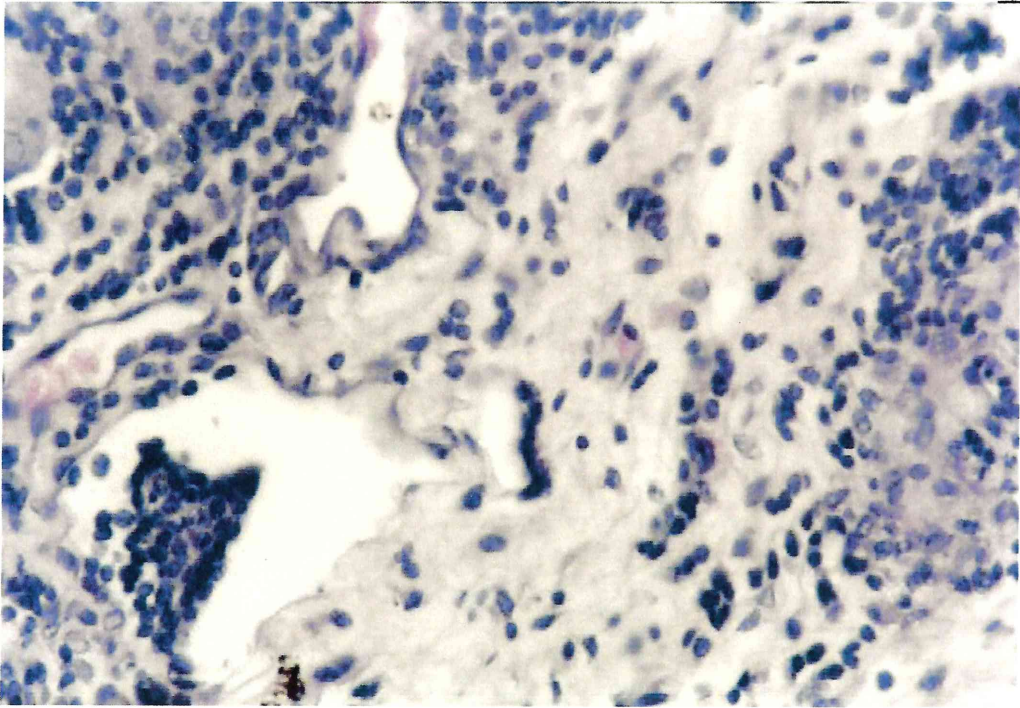


Figura 11

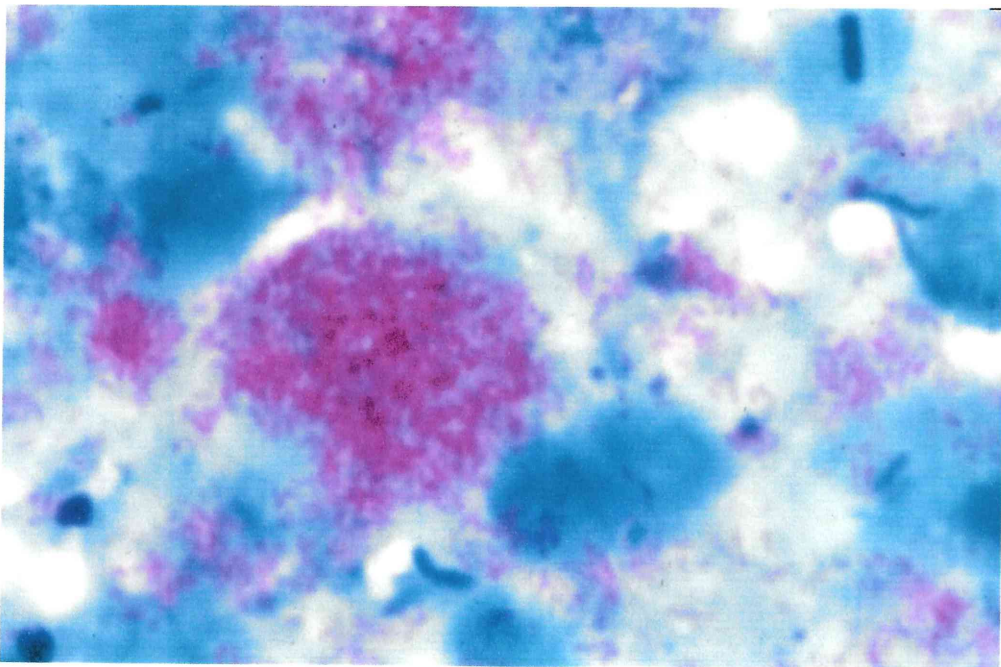


Figura 12

2) Estudios inmunohistoquímicos.

En la tabla 5 se comparan los grados de intensidad de la marcación con las técnicas de inmunohistoquímica descriptas y de la coloración de ZN.

Mediante las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas, se demostró la presencia de Mp en 14 de los casos seleccionados.

La técnica PAP mostró una inmunorreactividad moderada del Mp en 6 de los casos estudiados, en 6 fue leve y negativa en 4 resultó negativa (Fig. 13).

En cuanto a la técnica ABC, 6 casos fueron moderadamente positivos, 6 fueron levemente positivos y 4 resultaron negativos.

Por su parte, la técnica de LSAB mostró una reacción marcada en 6 de los casos, 6 fueron moderadamente positivos y cuatro resultaron negativos (Fig. 14 y 15).

En la técnica IGSS, la inmunorreactividad resultó positiva en forma marcada en 8 de los casos seleccionados, moderada en 4 de ellos y negativa en 4 (Fig. 16).

La inmunorreactividad de la bacteria se observó en el citoplasma de los macrófagos y libres en la mucosa y submucosa intestinal. Los linfonódulos ileocecales mostraron macrófagos con bacterias en su interior inmunorreactivos en los senos corticales. En las técnicas de inmunohistoquímica, la reacción positiva se caracterizó por la presencia de gránulos teñidos de color pardo oscuro. Los mismos se originan en aquellos sitios en los cuales la peroxidasa (enzima) oxida al cromógeno. Indirectamente está marcando los lugares donde se produjo la unión específica antígeno-

anticuerpo. Esto coincidió con la localización de los bacilos ácido alcohol resistentes.

La demostración del agente fue mucho más evidente mediante las técnicas inmunohistoquímicas. El método de ZN resultó inferior, particularmente en tejidos donde las bacterias eran escasas en número.

Se realizó una evaluación de los resultados obtenidos para determinar la mayor o menor especificidad o sensibilidad de las diferentes técnicas. Los tres métodos de inmunohistoquímica brindaron resultados similares. Los controles fueron completamente negativos.

Tabla 5. Grado de intensidad de la marcación de Mp con distintas técnicas de inmunohistoquímica y presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes detectados mediante ZN en cortes de íleon de los bovinos seleccionados.

Caso N ^o	ZN	PAP	ABC	LSAB	IGSS
1	Si	-	-	-	-
2	Si	+	+	++	++
3	Si	++	++	+++	+++
4	Si	+	+	++	+++
5	Si	++	++	+++	+++
6	No	+	+	++	+++
7	Si	++	++	+++	++
8	No	-	-	-	-
9	Si	+	+	++	+++
10	Si	-	-	-	-
11	Si	+	+	++	++
12	Si	++	++	+++	+++
13	Si	-	-	-	-
14	Si	+	+	++	++
15	Si	++	++	+++	+++
16	Si	++	++	+++	+++

Grado de intensidad +++ marcado
 ++ moderado
 + leve
 - nulo

Figura 13: Moderada inmunorreactividad del *M. paratuberculosis* en el interior de los macrófagos. Mucosa del íleon (Técnica de PAP. Obj. 20 X).

Figura 14: Marcada inmunorreactividad del *M. paratuberculosis* en el interior de los macrófagos. Mucosa del íleon (Técnica de LSAB. Obj. 10 X).

Figura 15: Mayor detalle de la figura 14 (Técnica de LSAB. Obj. 40 X).

Figura 16: Marcada inmunorreactividad del *M. paratuberculosis* en el interior de los macrófagos. Mucosa del íleon (Técnica de IGSS. Obj. 10 X).

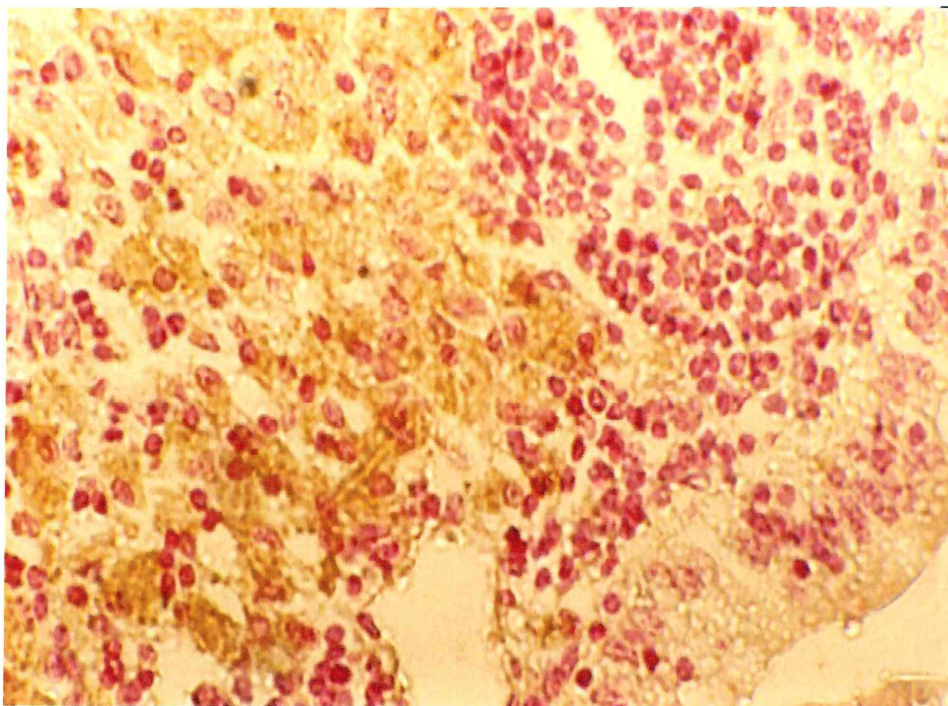


Figura 13

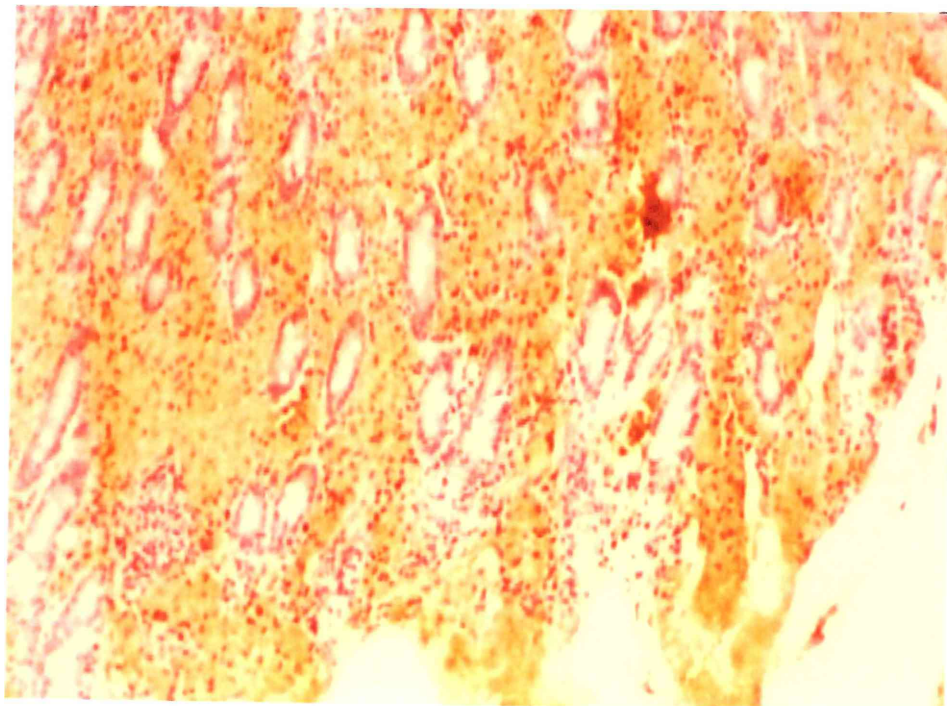


Figura 14

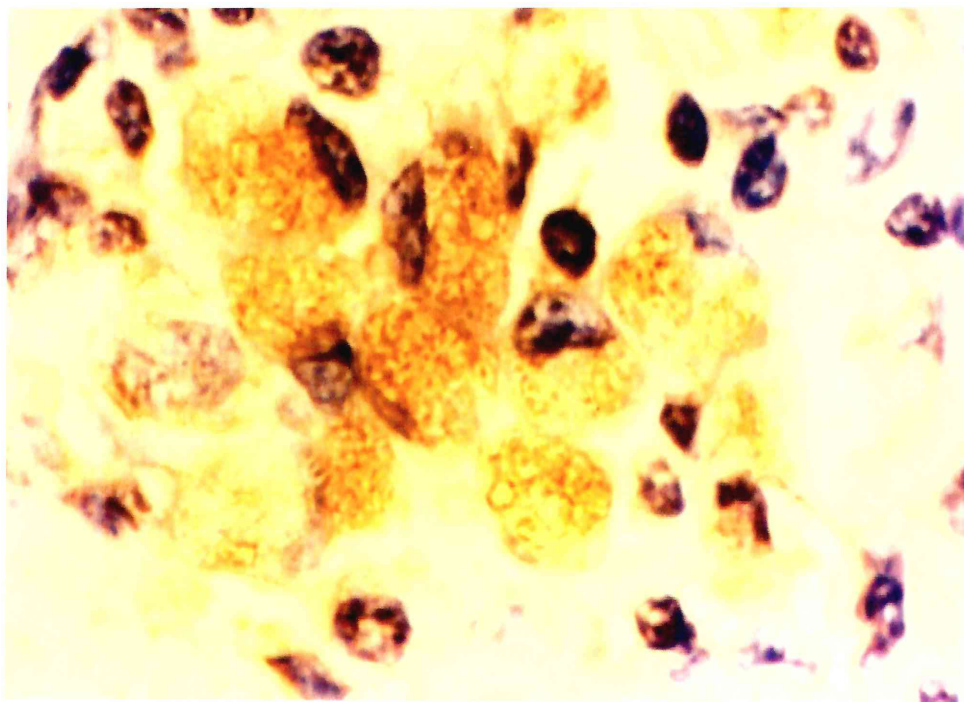


Figura 15

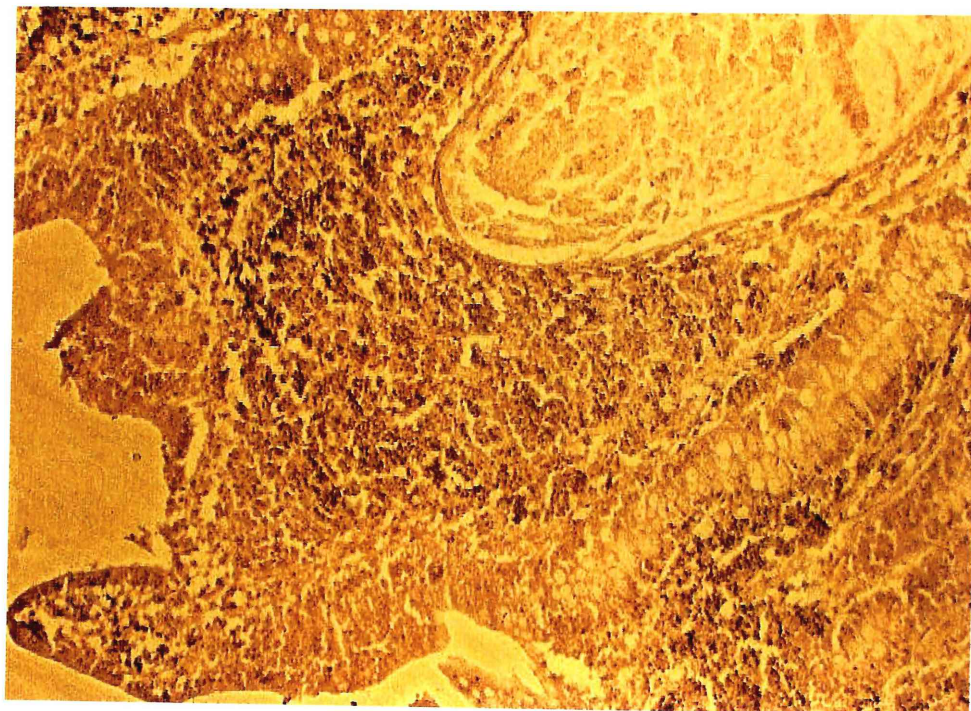


Figura 16

3) Estudios lectinohistoquímicos

Existen dos clases de mucinas, la membranoasociada y la secretora. La primera de ellas es producida por las células caliciformes. La otra, es la mucina que se encuentra en el borde apical (ribete en cepillo) y en la zona supranuclear de los enterocitos. Por ello, se consideró oportuno analizar la reactividad lectinohistoquímica de estas células por separado.

La lectina **DBA** fue positiva en todos los casos control estudiados, con leves variaciones entre ellos. Las células caliciformes mostraron marcada positividad, aumentando su intensidad hacia el extremo apical de la vellosidad. También se observaron ligeras variaciones de una célula a otra. En todos los casos control las células epiteliales resultaron positivas en el ápice de la vellosidad. En el íleon de 14 de los 16 animales seleccionados, la lectina **DBA** resultó fuertemente positiva en todas las células caliciformes ubicadas en el tercio apical de las vellosidades y esta misma reactividad se observó también en los enterocitos del tercio apical (Fig. 17).

La lectina **SBA** resultó positiva en 3 de los 5 casos control. Esta lectina resultó fuertemente positiva en las células caliciformes, en el tercio apical de las vellosidades. Las células del epitelio de revestimiento mostraron débil marcación en el citoplasma y moderada marcación en la zona del ribete en cepillo. En los animales afectados se observó fuerte positividad, tanto en las células caliciformes como en los enterocitos, de manera uniforme en toda la vellosidad (Fig. 18).

La lectina **UEA-1** mostró marcada afinidad por las células caliciformes en 4 de los 5 animales testigo, mientras que en el restante la

marcación fue leve. La distribución de la reactividad fue uniforme en toda la cripta, haciéndose sólo ligeramente más evidente hacia la superficie. En cuanto a los enterocitos, especialmente en el ribete en cepillo, se observó marcada positividad sólo en las vellosidades (Fig. 19). En los animales afectados, esta lectina fue positiva en las células caliciformes en 10 de los 16 casos estudiados, mientras que las células epiteliales resultaron fuertemente positivas, en todos los casos, únicamente en la porción más superficial de la vellosidad.

La marcación con la lectina **WGA** fue moderadamente positiva en las células caliciformes en los casos control. No se observaron diferencias entre las células de la base de la cripta y las células del ápice de la vellosidad. El epitelio resultó moderadamente positivo en toda la vellosidad. En los casos de bovinos afectados, las células caliciformes mostraron intensidad ligeramente más marcada frente a la lectina **WGA** que la observada en los cortes control (Fig. 20). Los enterocitos mostraron una marcada unión a esta lectina sólo en el ribete en cepillo de las células del tercio más apical de la vellosidad.

Las células caliciformes de los animales control resultaron negativos frente a la lectina **PNA**. Sólo en el intestino de uno de estos animales esta lectina mostró ligera afinidad por dichas células (Fig. 21). Los enterocitos mostraron moderada positividad en la región supranuclear. Esta distribución de la afinidad por la lectina **PNA** no fue uniforme en todo el material estudiado. Luego del tratamiento con neuraminidasa, todas las células caliciformes y los enterocitos mostraron tinción evidente con la lectina. (Fig. 22). En los animales afectados, se observó marcada positividad en el citoplasma de las células

caliciformes (Fig. 23). La misma intensidad se observó en el epitelio cilíndrico con una distribución uniforme en todo el corte previo a la incubación con neuraminidasa (Fig. 24).

La lectina **Con A** resultó negativa en la totalidad de los animales utilizados como control, tanto en las células caliciformes como en los enterocitos. En los animales afectados, sólo algunos mostraron leve afinidad.

La lectina **GS-I** fue negativa en las células caliciformes y en sólo escasa afinidad en algunos enterocitos de los controles. A diferencia de lo ocurrido con la lectina **Con A**, expresado anteriormente, las células caliciformes de 12 animales afectados mostraron marcada afinidad por la lectina **GS I** y los otros 4 animales mostraron sólo leve reactividad. Este comportamiento fué similar en los enterocitos.

En los animales control, la lectina **RCA-I** fué levemente positiva en la zona supranuclear, mientras que resultó fuertemente positiva en los enterocitos y negativa en las células caliciformes de los animales afectados.

Las fibras colágenas resultaron positivas a las lectinas **SBA**, **DBA**, **GS I** y **WGA**. La reactividad fue más intensa y disminuyó sólo frente a la lectina **DBA** (Fig. 25). Los fibroblastos mostraron escasa afinidad con la lectina **Con A** en ambos grupos de muestras.

Las células endoteliales resultaron positivas a las lectinas **DBA**, **GS I**, **WGA**, **RCA-I**, **SBA** y **PNA** en los animales control y, a las tres primeras, en los afectados (Fig. 25).

En el intestino de los animales control la fibras musculares mostraron afinidad por las lectinas **DBA**, **WGA** y **RCA-I**. En las muestras de los

animales afectados resultaron positivas las lectinas **DBA, WGA y PNA** (Fig. 25 y 26).

Las neuronas de los plexos de Meissner y de Auerbach presentaron afinidad por las lectinas **Con A, DBA, GS I, WGA, RCA-I y PNA** (Fig. 26).

Los linfocitos de los animales control resultaron positivos a las lectinas **Con A, DBA, GS-I, PNA y RCA-I**. En los animales afectados, estas células reaccionaron solamente con las lectinas **Con A y DBA** (Fig. 27).

EL Mp reaccionó fuertemente con **DBA, PNA, WGA, Con A** y **RCA-I**, moderadamente con **SBA** y **GS-I** y fue negativo sólo a la lectina **UEA-I**. La reactividad se observó tanto en los bacilos fagocitados por los macrófagos, como en los extracelulares ubicados en la lámina propia del íleon (Fig. 28 y 29 A/B). Esta distribución fue coincidente con la observada, mediante las técnicas de inmunohistoquímica, en el íleon de los animales afectados.

Todos estos resultados se hallan consignados en las tablas 6 y 7.

Tabla 6: Reactividad lectinhistoquímica en cortes de íleon de bovinos control.

	<i>DBA</i>	<i>SBA</i>	<i>UEA-I</i>	<i>WGA</i>	<i>PNA</i>	<i>Con A</i>	<i>GS-I</i>	<i>RCA - I</i>
Enterocitos								
Zona supranuclear	3	1	0	1	2	0	0 - 1	1
Ribete en cepillo	2 - 3	2	3	2	0 <i>a</i>	0	0 - 1	0
Células caliciformes	3	3	3 - 1	2	0 <i>a</i>	0	0	0
Colágeno	3	1	0	2	0	0	2	0
Fibroblastos	0	0	0	0	0	1	0	0
Linfocitos	2	0	0	0	1	0 - 1	3	1
Fibras musculares	3	0	0	2	0	0	0	2
Células endoteliales	2 - 3	2	0	2	3	0	2	3
Neuronas	3	0	0	2 - 3	3	1	3	3

3: marcada; 2: moderada; 1: leve; 0: ausente. 0-1 indica variación en la reactividad.

a: marcada reactividad luego del tratamiento con neuraminidasa.

Tabla 7: Reactividad lectinhistoquímica en cortes de íleon de bovinos afectados de paratuberculosis.

	DBA	SBA	UEA-I	WGA	PNA	Con A	GS-I	RCA - I
Enterocitos								
Zona supranuclear	3	0	0	0	2	0-1	0	2
Ribete en cepillo	3	3	3	3	3	0	3	3
Células caliciformes	3	3	3	3	3	0	3	3
Colágeno	1	3	0	3	0	0	2	0
Fibroblastos	0	0	0	0	0	1	0	0
Linfocitos	2	0	0	0	0	2-3	0	0
Fibras musculares	3	0	0	2	1	0	0	0
Células endoteliales	2	0	0	2	0	0	1	0
Neuronas	3	0	0	3	1	1	1	3
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	3	2	0	3	3	3	2	3

3: marcada; 2: moderada; 1: leve; 0: ausente. 0-1 indica variación en la reactividad.

Figura 17: Marcada afinidad de las células caliciformes de las criptas del íleon de un animal afectado frente a la lectina DBA. Obj. 40 X.

Figura 18: Marcada afinidad de los enterocitos de una cripta del íleon de un animal afectado frente a la lectina SBA. Obj. 40 X.

Figura 19: Marcada afinidad del ribete en cepillo (→) de los enterocitos de vellosidades del íleon de un animal control y leve afinidad de las células caliciformes (*) frente a la lectina UEA-I. Obj. 20 X.

Figura 20: Moderada afinidad de las células caliciformes de las criptas del íleon de un animal afectado frente a la lectina WGA. Obj. 20 X.

Figura 21: Leve afinidad de las células caliciformes de las criptas del íleon de un animal control frente a la lectina PNA, previo a la incubación con neuraminidasa. Obj. 20 X.

Figura 22: Marcada afinidad de las células caliciformes de las criptas del íleon de un animal control frente a la lectina PNA, luego de la incubación con neuraminidasa. Obj. 40 X.

Figura 23: Marcada afinidad de las células caliciformes y del mucus de las criptas del íleon de un animal afectado frente a la lectina PNA, previo a la incubación con neuraminidasa. Obj. 20 X.

Figura 24: Marcada afinidad del epitelio cilíndrico del íleon de un animal afectado frente a la lectina PNA, previo a la incubación con neuraminidasa. Obj. 40 X.

Figura 25: Marcada afinidad de las fibras colágenas y moderada afinidad de las células endoteliales del íleon de un animal afectado frente a la lectina WGA. Obj. 40 X.

Figura 26: Moderada afinidad de las neuronas del plexo de Auerbach del íleon de un animal afectado frente a la lectina WGA. Obj. 20 X.

Figura 27: Marcada afinidad de los linfocitos en el íleon de un animal afectado frente a la lectina Con A. Obj. 20X.

Figura 28: Marcada afinidad del *M. paratuberculosis* en el interior de los macrófagos de una lesión granulomatosa frente a la lectina PNA. Obj. 20 X.

Figura 29 A y B: Marcada afinidad de los bacilos fagocitados por los macrófagos (→) y de los bacilos extracelulares (*) frente a la lectina PNA. Obj. 40 X.

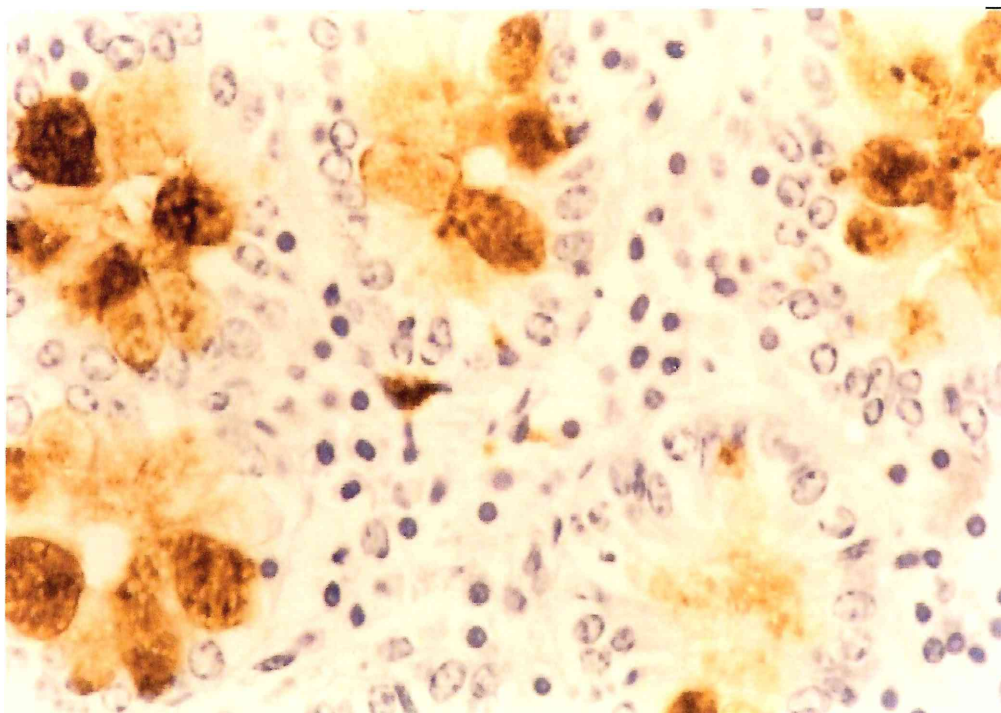


Figura 17

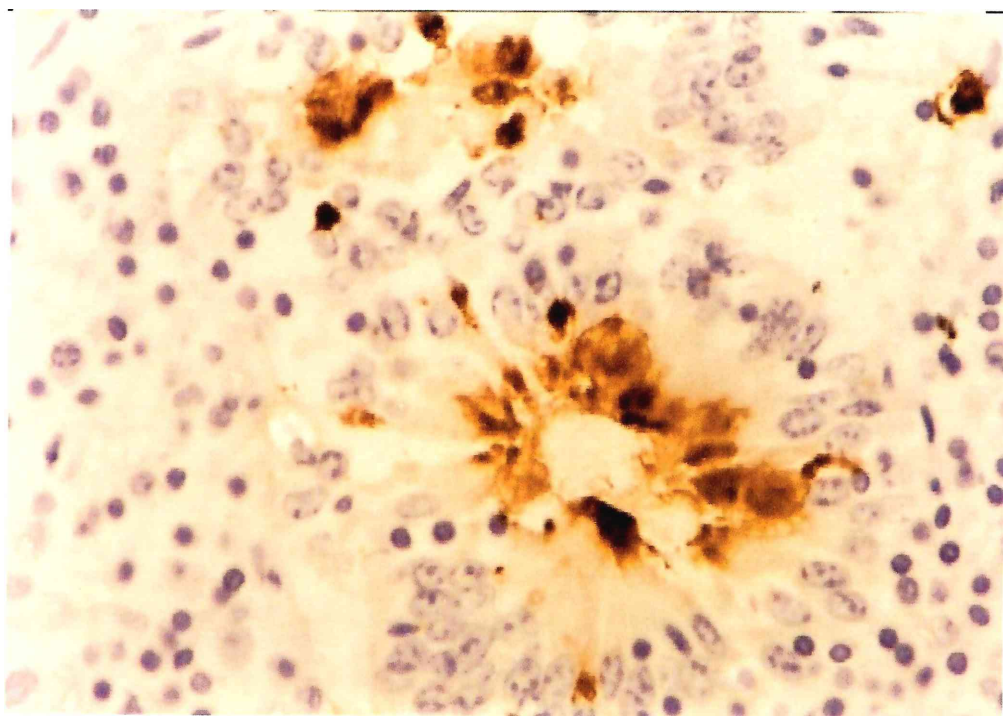


Figura 18

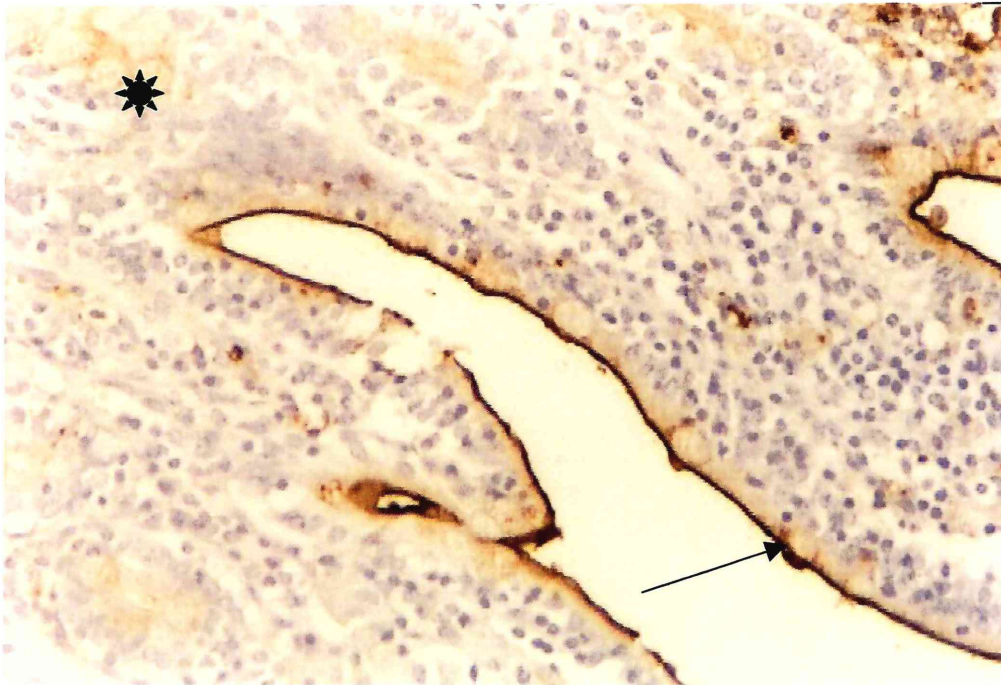


Figura 19

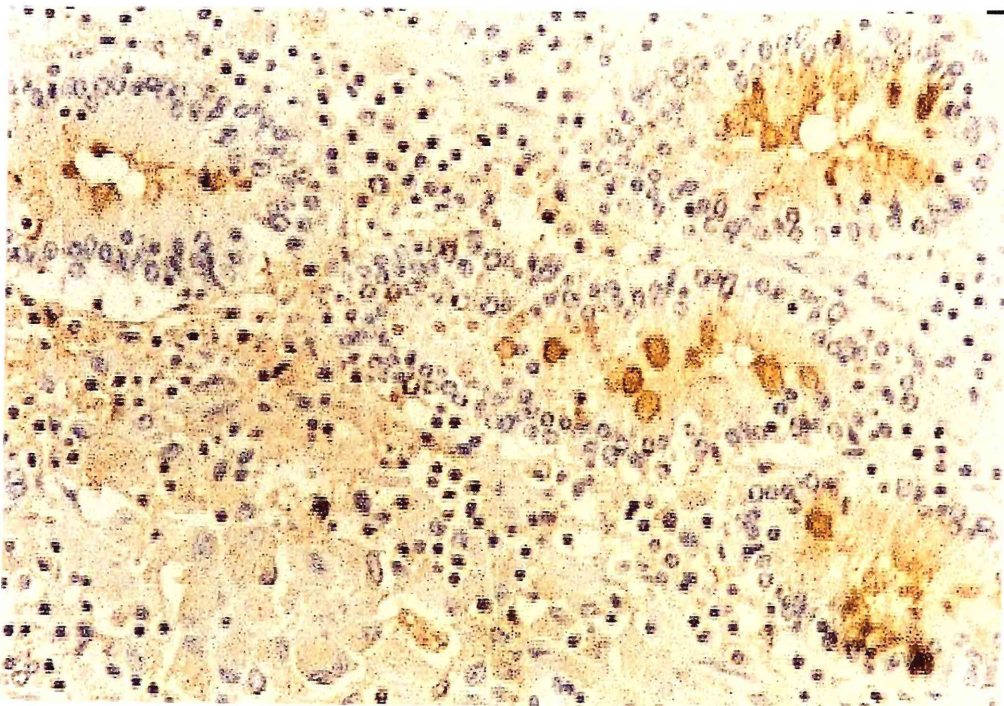


Figura 20

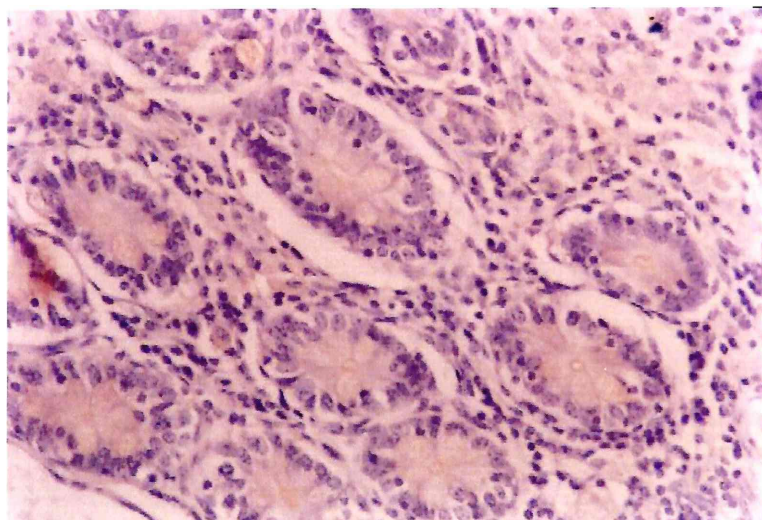


Figura 21

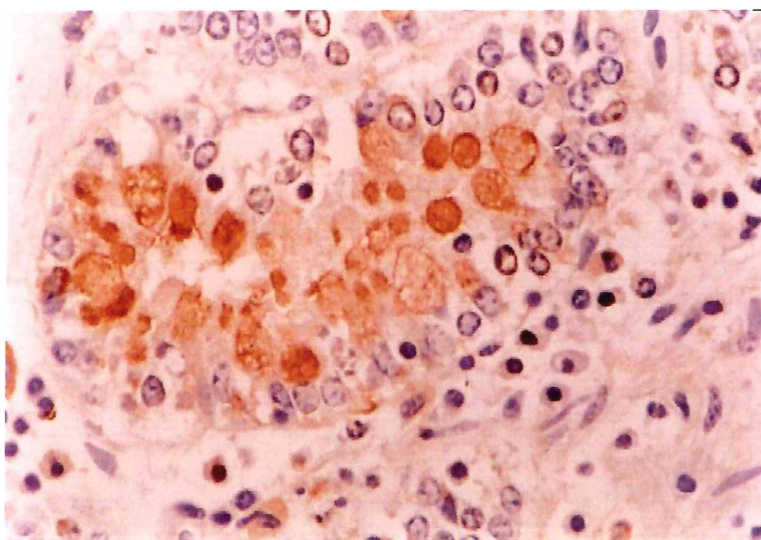


Figura 22

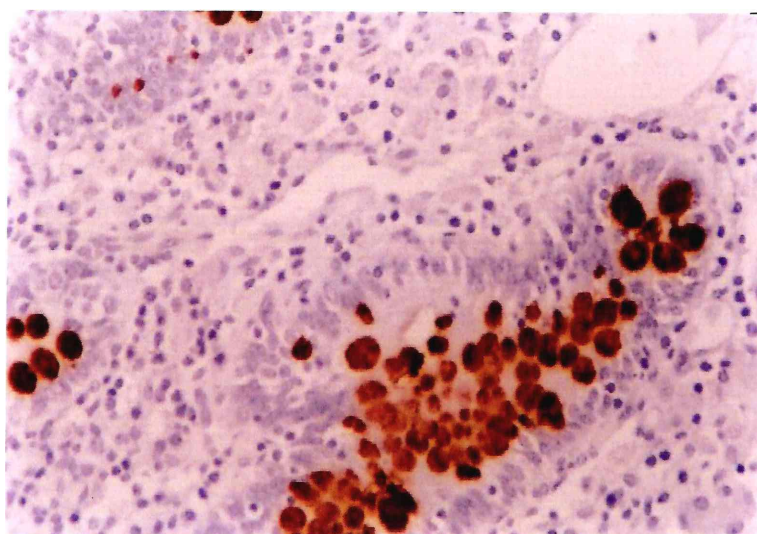


Figura 23

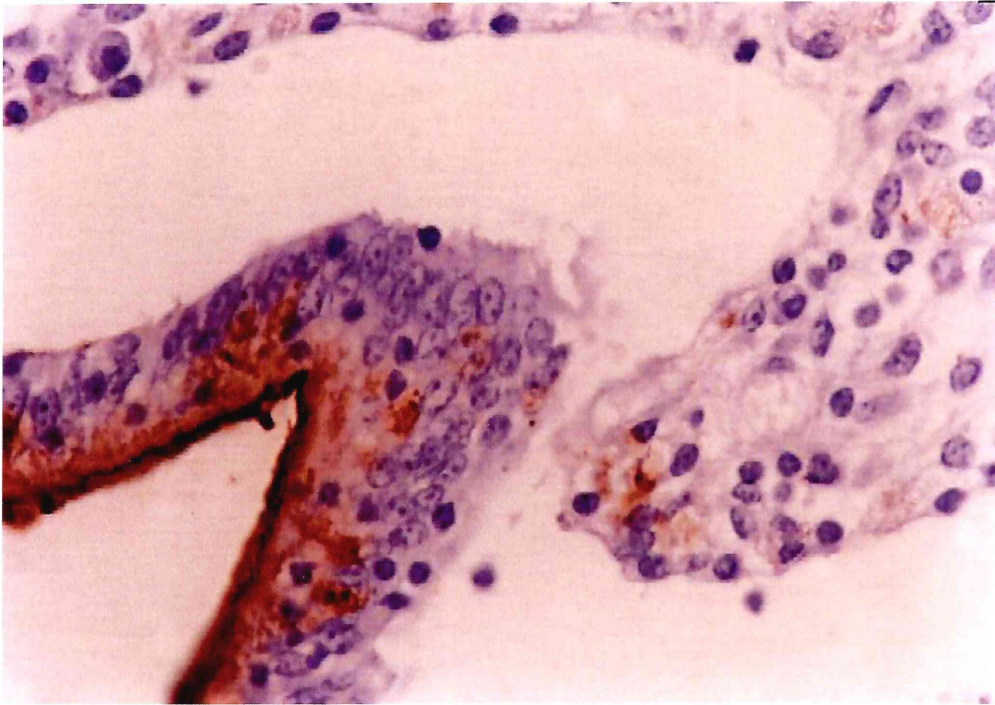


Figura 24



Figura 25

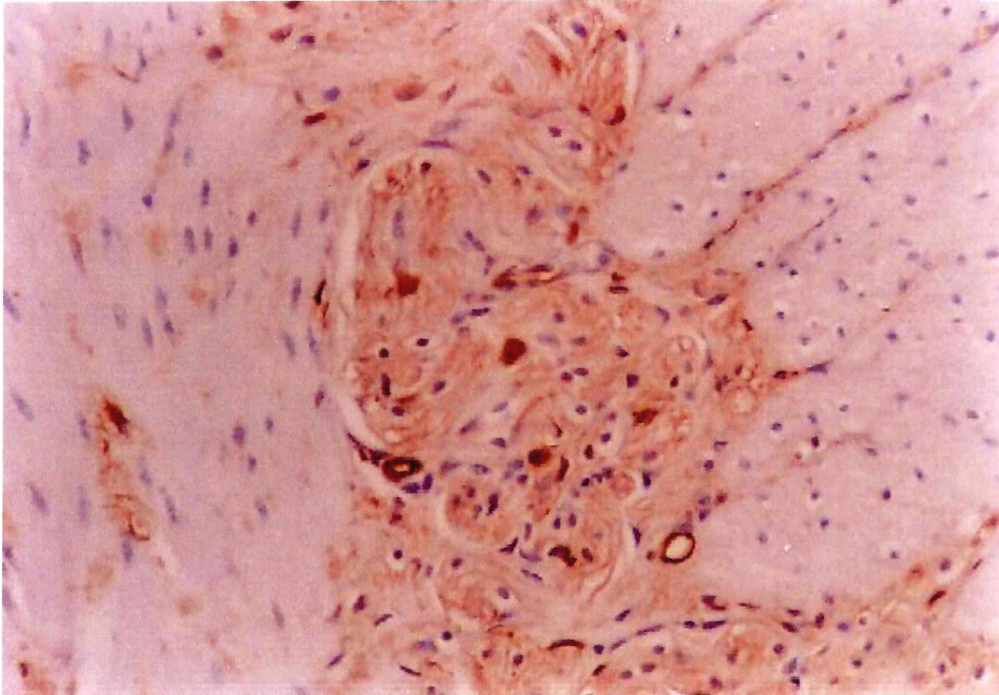


Figura 26

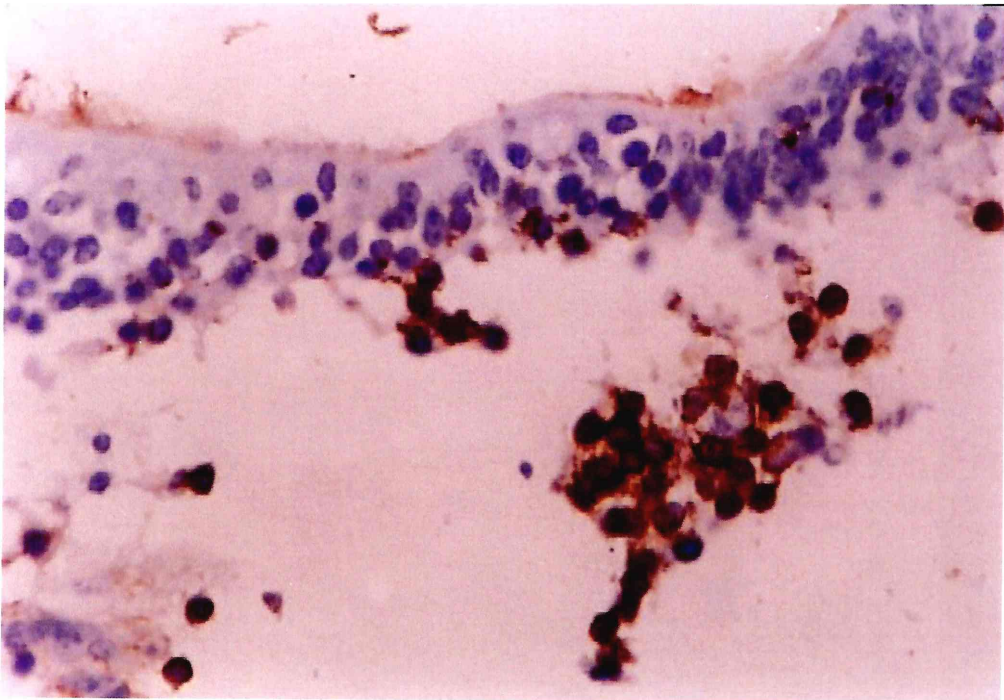


Figura 27

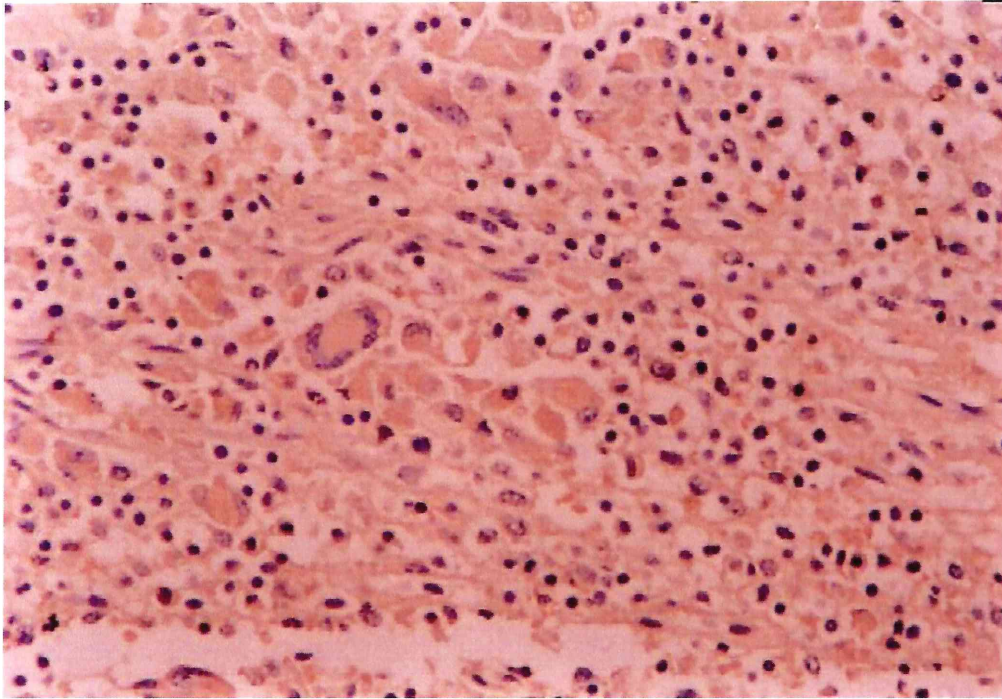


Figura 28

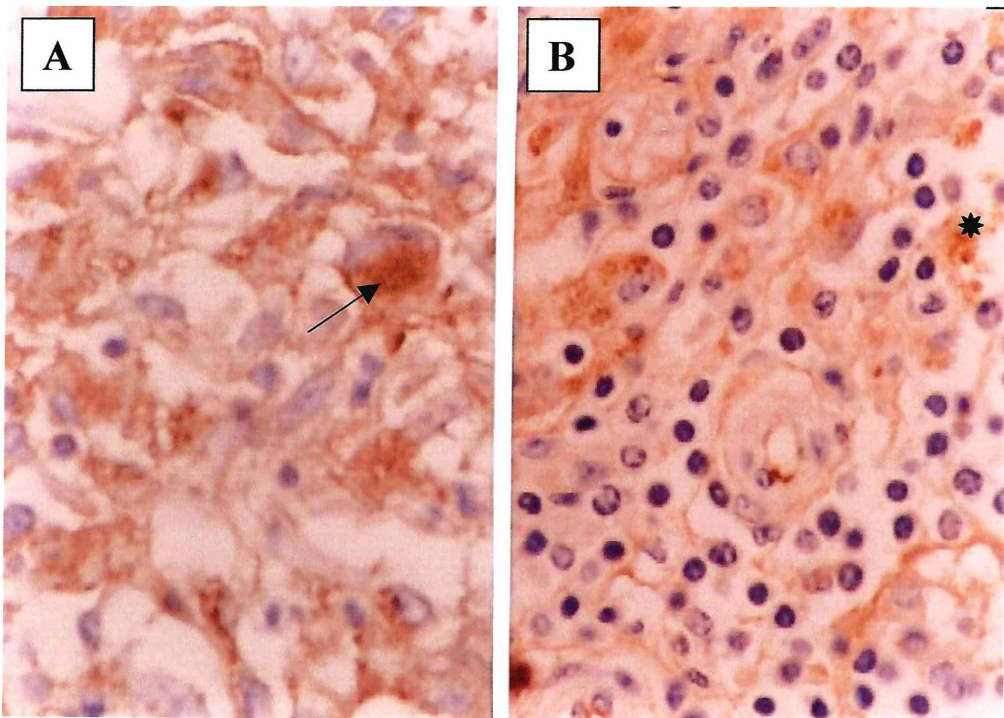


Figura 29 A y B

4) Estudios ultraestructurales

El estudio ultraestructural de los cortes de íleon de los animales afectados permitió observar a los enterocitos tumefactos, con el retículo endoplásmico rugoso dilatado. La mayoría de las mitocondrias mostraron tumefacción. En algunas células epiteliales se observó condensación de la cromatina. Las células epitelioideas presentaron núcleos grandes, únicos y centrales y un citoplasma con abundantes ribosomas y escaso número de mitocondrias y escaso retículo endoplásmico rugoso. En las células epitelioideas no se observaron bacilos.

En los macrófagos se observaron bacterias (Fig. 30), en los fagosomas, en los fagolisosomas y libres en el citoplasma (Fig. 31).

El espacio intercelular se hallaba distendido por edema, detritus celulares y bacterias libres.

Se observaron cambios degenerativos en las células endoteliales de los capilares sanguíneos, con edema intracelular, mitocondrias tumefactas y con el retículo endoplásmico rugoso dilatado.

Figura 30: Presencia de bacterias en el interior de los macrófagos (A). Célula epitelioide sin bacilos en su interior (B) (Caso 6).

Figura 31: Presencia de bacterias en los fagosomas (↑) y libres en el citoplasma (→) de un macrófago (Caso 6).

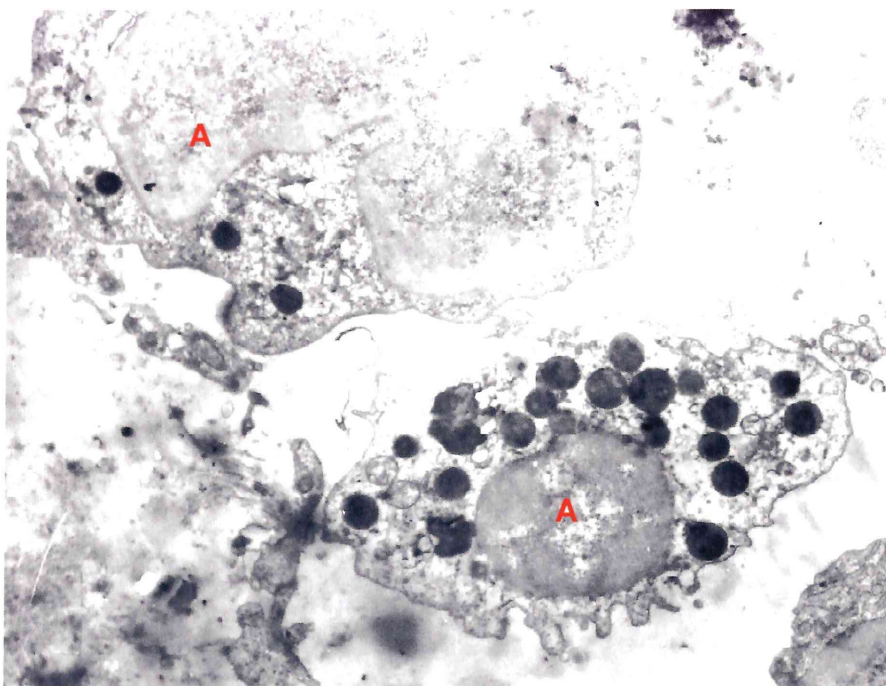


Figura 30

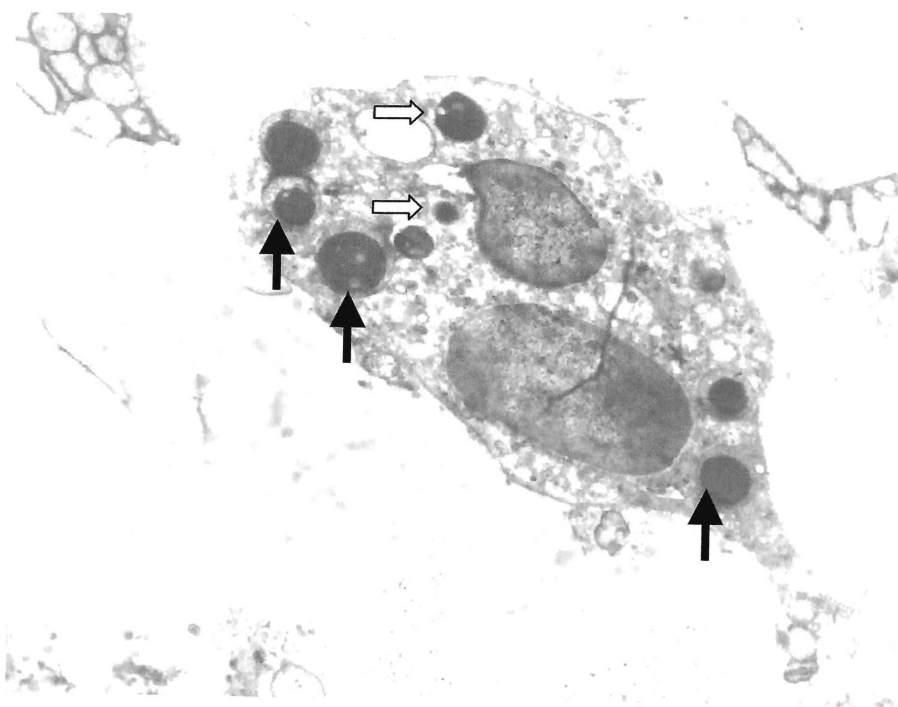


Figura 31

IV - Discusión

La respuesta inflamatoria granulomatosa observada en el intestino y en los linfonódulos de los animales afectados fue de leve a marcada, coincidiendo con el engrosamiento leve a marcado de la pared intestinal. Las lesiones estaban compuestas principalmente por macrófagos, células epitelioides y células gigantes. En los casos con lesiones leves predominaban las células epitelioides.

Coincidentemente, en los casos leves, con la coloración de ZN se observaron escasos bacilos en el interior de los macrófagos. La utilidad de esta coloración se discute en relación a los resultados obtenidos mediante las técnicas de inmunohistoquímica.

En ninguno de los casos seleccionados se observaron necrosis ni caseificación, tal como se puntualiza en la bibliografía consultada con referencia a los bovinos. La ausencia de estas lesiones puede ser de utilidad para diferenciar microscópicamente las lesiones de pTBC de las lesiones de tuberculosis (28, 48, 57).

Las técnicas inmunohistoquímicas se han convertido en una herramienta de enorme utilidad en patología. La mayor ventaja de estos métodos, con respecto a otras técnicas, reside en su utilidad para localizar antígenos con exactitud en células y tejidos (120). En el caso particular de los agentes infecciosos, permiten identificar en pocas horas agentes que tardarían días o semanas en ser cultivados, con la ventaja adicional de evitar la manipulación de agentes potencialmente peligrosos para el personal técnico (22).

La técnica de inmunoperoxidasa indirecta para el diagnóstico de pTBC fue descrita por Nguygen y col. (112). Este método fue propuesto para comprobar la presencia de microorganismos en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina obtenidos de animales clínicamente enfermos.

En un estudio comparativo entre las técnicas de inmunohistoquímica, ZN y el cultivo del Mp a partir de materia fecal de cabras infectadas, con el análisis inmunohistoquímico se obtuvo un mayor porcentaje de positivos que con las otras dos técnicas empleadas (147). Se ha comprobado una mayor sensibilidad de la inmunohistoquímica cuando se la comparó con varias técnicas de detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (Ziehl-Neelsen, Fite y Kingorem) (66).

El Mp fue detectado específicamente por las 4 técnicas de inmunohistoquímica empleadas en el presente estudio. En 12 de los casos seleccionados, el bacilo pudo observarse en el material incluido en parafina, hasta un máximo de 17 años. La inmunomarcación del Mp se correlacionó con las estructuras ZN positivas. De todas formas, los métodos inmunohistoquímicos resultaron más efectivos para detectar escasos bacilos presentes en el tejido. Además, pusieron en evidencia bacterias ZN negativas y bacilos lisados (93, 140). Esto coincide con resultados propios y de otros autores (14, 93, 95, 109).

El antisuero policlonal específico fue producido contra antígenos solubles e insolubles de Mp cepa 2E, por lo que, pueden producirse reacciones cruzadas con antígenos de otras cepas de Mp e incluso con los de otras especies. Las reacciones cruzadas de sueros policlonales contra antígenos compartidos por distintas especies de *Mycobacterium* han sido bien documentadas. Hove y col (66) consiguieron la inmunomarcación de diversas

especies del género empleando un suero policlonal de conejo anti-BCG (bacilo de Calmette-Guérin) (61).

En el presente estudio, el método LSAB requirió periodos de incubación más cortos que las otras técnicas de inmunohistoquímica empleadas. El método IGSS es el más costoso y el que consume más tiempo. Comparativamente, es el método más sensible. La simplicidad y la rapidez de las técnicas de inmunohistoquímica les confieren un valor diagnóstico considerable. Las coloraciones para bacterias ácido-alcohol resistentes, realizadas en extendidos obtenidos a partir de raspados de la mucosa intestinal o en cortes de tejidos, son relativamente sencillas pero no son muy específicas. Además, existen otros organismos como *Nocardia* y *Corynebacterium* que son positivos a ZN, por lo que el diagnóstico definitivo resulta imposible (94, 95).

La detección de Mp en materia fecal mediante extendidos coloreados con ZN ha resultado poco confiable hasta el momento (128). La inmunohistoquímica podría aumentar la sensibilidad de ese método. No obstante, no debemos olvidar que un alto porcentaje de animales infectados no eliminan Mp con la materia fecal (28).

Las lectinas son proteínas que se unen en forma no covalente a carbohidratos específicos. En los últimos años, las lectinas conjugadas con fluoresceína o biotina se han utilizado como marcadores histoquímicos específicos, con el fin de evaluar la distribución de los hidratos de carbono estructurales o secretorios en la mucosa intestinal normal (38, 52, 152) y sus

cambios en los procesos inflamatorios (55, 69, 152) y en las enfermedades neoplásicas en humanos y en otras especies (13, 53, 76, 134).

En el curso de las transformaciones malignas en el colon se han observado cambios en los glucoconjugados secretorios(13, 53, 76, 134).

En la literatura consultada, no se han encontrado datos previos sobre la distribución de los glucoconjugados en íleon de bovinos normales y afectados de pTBC. Nuestros estudios demostraron diferencias entre los patrones lectinhistoquímicos de los tejidos normales y de los afectados de pTBC (93).

La lectina **DBA** se une al terminal hidrocarbonado N-acetil-D-galactosamina. La ausencia parcial de reactividad de las células entéricas es un resultado poco específico (54). Las células caliciformes de los animales control mostraron marcada reactividad con esta lectina en la base de la vellosidad. Los enterocitos evidenciaron una afinidad creciente por a esta lectina, desde la base de la vellosidad hasta su porción apical. Estos hallazgos se corresponden con lo observado por Filipe y Fenger, en 1979, quienes describieron cambios en la composición de la mucina desde la cripta a la vellosidad en el intestino delgado humano.

Estos hallazgos sugieren que la maduración de las células desde la cripta a la vellosidad, se asocia con la diferenciación de los glucoconjugados mediante el agregado de residuos hidrocarbonados. Esto se corresponde con lo expresado por Vecchi y col. (152). Lo anteriormente expuesto se explicaría por la acción de enzimas específicas en las células productoras de mucinas. Las galactotransferasas, responsables de transferir galactosa a oligosacáridos de las células, se hallan en las células de las criptas

(55, 152). Cuando la célula inmadura migra hacia la porción apical de la vellosidad, se produce la adición del residuo hidrocarbonado, por lo que la expresión de la **DBA** es más marcada. En los intestinos con lesiones, la reacción a la lectina **DBA** sólo se observó en la porción más superficial de la vellosidad, lugar donde se expondría el residuo α -N-acetil galactosamina, ya que en estas células estaría presente la enzima. Estos estudios coinciden con lo observado en personas con cáncer de colon (131).

La lectina **SBA** pertenece al mismo grupo que la **DBA**, por presentar afinidad por los residuos α -N-acetilgalactosamina y β -N-acetilgalactosamina (58). Esto explica la similitud de los resultados obtenidos con las dos lectinas.

La lectina **UEA-1** presenta afinidad por el residuo α -L-fucosa. Los animales utilizados como control mostraron afinidad leve e irregular en las células caliciformes. Los enterocitos de la vellosidad resultaron altamente reactivos.

En el íleon de los animales afectados, la distribución de la positividad fue uniforme e intensa en la porción superior de la vellosidad y se observó en las células caliciformes y en las células epiteliales. Estos hallazgos se corresponden con numerosos estudios realizados en personas con diagnóstico de úlcera colónica, adenocarcinoma, enteritis ulcerativa y enfermedad de Crohn (42, 44, 52, 53). En estos trabajos se observaron variaciones poco manifiestas atribuidas a diferentes estadios de las enfermedades mencionadas.

En condiciones normales, se acepta que la glicosidación de las mucinas de las células caliciformes se produce mediante la adición de

residuos tales como fucosa y galactosa (44, 53). Las células caliciformes maduras contienen mayor cantidad de residuos terminales de fucosa que las células inmaduras (13). La expresión de dichos residuos terminales son modificados, entre otros factores, por la microflora entérica que tiene la propiedad de degradar carbohidratos (53). Por lo tanto, la actividad lectinohistoquímica de la mucina no está determinada solamente por la biosíntesis de factores, sino también, por elementos que degradan sus componentes (44). Como resultado de una renovación celular aumentada en los procesos inflamatorios, la expresión de estos residuos es más intensa y más constante en la porción apical de la vellosidad de los animales afectados (53, 131). Esto se explica por el menor tiempo disponible por parte de la célula para adicionar residuos como la fucosa. A esto podría deberse la ausencia de reacción frente a la lectina **UEA-I** a lo largo de toda la vellosidad en los casos de animales afectados de pTBC.

La lectina **WGA** resulta positiva en aquellos tejidos donde se expresan los residuos β -D-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico. Los cambios observados no mostraron variaciones significativas entre los casos control y los animales afectados. Estos resultados coincidieron con los estudios realizados en personas afectadas de colitis ulcerativa, procesos neoplásicos o enfermedad de Crohn (44, 69, 126, 152). La reducción de la unión con esta lectina, refleja que las células caliciformes y los enterocitos de los animales afectados producirían menos cantidad de estos glucoconjugados que los animales utilizados como control.

La lectina **PNA** presenta afinidad por los residuos β -D-galactosa y N-acetil D-galactosamina. Esta lectina resultó negativa tanto en las

células caliciformes como en los enterocitos de los animales control. Sin embargo, ambas células mostraron una reacción leve luego del tratamiento de los cortes con neuraminidasa. En los animales afectados, esta lectina mostró una marcada reactividad previo al tratamiento con la enzima. En las lesiones neoplásicas (110, 152) e inflamatorias del hombre (41, 42, 43), incluida la enfermedad de Crohn (126), se han observado cambios similares.

En el intestino normal de humanos, la lectina **PNA** se une sólo a la porción supranuclear de las células caliciformes y de los enterocitos, en relación con las glicoproteínas recién liberadas por el aparato de Golgi, previo a la adición a estos hidratos de carbono del ácido siálico terminal. Los pacientes con lesiones ulcerativas y lesiones pretumorales (displasias) presentan una distribución anormal de los sitios de unión con dicha lectina. Estos cambios también se han observado en carcinomas de colon, adenomas y en tejidos fetales (44).

El camino normal de la síntesis glicoproteica se inicia en el retículo endoplásmico y se continúa en el aparato de Golgi hasta completar la cadena de carbohidratos. En condiciones normales, la lectina **PNA** es positiva sólo en una pequeña porción supranuclear. Esto indica la presencia de oligosacáridos de reciente formación previo a la adición del ácido siálico (negativo a dicha lectina). Para este paso es necesaria la acción de la enzima sialiltransferasa (42). La positividad frente a **PNA**, observada en los pacientes con lesiones pretumorales y tumorales y en el feto, se adjudica a la síntesis incompleta de glicoproteínas por ausencia de dicha enzima en las células intestinales inmaduras (41, 42, 44, 107). Esta síntesis incompleta explica nuestros hallazgos en los casos de bovinos afectados de pTBC. Neutra y col.

(110) demostraron que, en las células de las criptas de la mucosa rectal humana, no se incorpora ácido siálico a las glicoproteínas. En estos casos la **PNA** es positiva. El ácido siálico es incorporado solamente en las células caliciformes y enterocitos más superficiales.

La lectina **Con A**, con afinidad por los residuos α -D-manosa y α -D-glucosa resultó negativa, tanto en los cortes de animales control como en los animales afectados. Estos resultados coinciden con los estudios de More (105) y Jaeger (70) realizados en cerdos.

Con respecto a la lectina **GS-I**, con afinidad por el residuo α -D-galactosa, no presentó reacción en los animales control. Las células caliciformes y enterocitos de los animales afectados mostraron marcada afinidad por esta lectina sin necesidad de incubar los cortes con la enzima. Se han descrito cambios similares en lesiones neoplásicas y preneoplásicas en humanos y en lesiones inflamatorias, incluyendo la enfermedad de Crohn (12, 44).

La lectina **RCA-I**, con afinidad por los residuos galactosa y por N-acetilgalactosamina levemente positiva en la zona supranuclear, mientras que resultó fuertemente positiva en los enterocitos y negativa en las células caliciformes de los animales afectados. Estos cambios en la intensidad de la afinidad de la lectina, coincide con lo observado por diferentes autores en lesiones neoplásicas y preneoplásicas en colon (47, 52, 53, 76).

Observados en conjunto, nuestros resultados, demuestran claramente que las células caliciformes de una misma cripta no sintetizan la misma mucina. Esta biosíntesis de mucina depende del grado de madurez de la

células. Las poblaciones de células caliciformes y de enterocitos no pudieron ser caracterizadas por la unión a una lectina en particular. Estas observaciones coinciden con trabajos realizados en ratones y en cerdos (105).

En función de nuestros resultados y, atendiendo a numerosos factores (edad, dieta, etc.), el estudio lectinhistoquímico de las células caliciformes y de los enterocitos puede utilizarse sólo como un indicador de madurez y diferenciación de estas células.

El estudio lectinhistoquímico de las células caliciformes de los bovinos con pTBC revelaron diferencias en la composición de mucopolisacáridos del mucus. Los cambios en el patrón lectinhistoquímico fueron evidentes en todos los casos en los que se observó respuesta inflamatoria en el intestino.

El estudio de la afinidad lectinhistoquímica de las células caliciformes y enterocitos en el íleon de animales sospechosos de padecer pTBC resulta de interés, ya que se pueden observar variaciones antes que las evidencias morfológicas de la enfermedad (93).

Las neuronas y las fibras musculares presentan diferente reactividad lectinhistoquímica debido a su polaridad y a su función sumamente especializada (93). La unión a lectinas de las neuronas entéricas de los bovinos coincide parcialmente con las descripciones realizadas en neuronas del sistema nervioso central en ovinos (93). Las neuronas de ambas especies no presentaron afinidad con **Con A** y **WGA**.

Las diferencias en la reactividad de las fibras musculares lisas, neuronas entéricas, linfocitos y fibras de colágeno de los animales control y de los afectados de pTBC, reflejan cambios funcionales aún no aclarados.

UEA-1 y **RCA-I** reaccionan intensamente con las células endoteliales de ratas y humanos (93), pero no con las células endoteliales de ratón. En esta especie, estas células muestran afinidad por la lectina **DBA** (89). De acuerdo con nuestros resultados, las células endoteliales de bovinos no reaccionan con **UEA-I** pero sí con **SBA**, **DBA**, **GS-I**, **WGA**, **RCA-I** y **PNA**. Las causas de las diferencias entre la reactividad lectinohistoquímica frente a **SBA** y **PNA** de los animales afectados y del grupo control, permanecen sin explicación.

En cuanto al amplio rango de unión de las lectinas con el Mp puede inferirse que el mismo es una consecuencia directa de los numerosos constituyentes que forman parte de la pared bacteriana, capaces de interactuar con numerosas lectinas (94).

Existen muy pocos estudios ultraestructurales en casos de paratuberculosis espontánea; solamente encontramos dos referencias en bovinos (78, 80) y una en cabras (114). Los enterocitos de los animales afectados presentaron cambios degenerativos. Estos hallazgos coinciden con los observados por Kim y col. (78) y Paliwal y Rehinder (114). Merkal y col. sugieren que estos cambios degenerativos se deben a una deficiencia nutricional ocasionada por una reacción de hipersensibilidad retardada que produce liberación de citotoxinas (98). Estas citotoxinas ejercerían su efecto sobre las células endoteliales de los capilares, impidiendo la correcta nutrición de las células entéricas (98, 114).

Las células epitelioides no mostraron bacilos en su interior, coincidiendo estos hallazgos con los observados por otros autores (78, 114).

En los macrófagos se observaron bacterias libres en el citoplasma y también en los fagosomas y en los fagolisosomas. En los fagosomas se evidenciaron los microorganismos intactos. Con respecto a los fagolisosomas, se observaron intactos, fragmentados y algunos lisados. Si bien el macrófago tiene la capacidad de destruir al Mp, bajo algunas circunstancias, la bacteria puede multiplicarse y diseminarse (114).

La duración de la enfermedad tiene que ser considerada en el momento de evaluar la producción de lesiones y la respuesta celular. Como ya fue manifestado en material y métodos, nuestro estudio ultraestructural fue realizado en casos avanzados de la enfermedad. En estos casos, la replicación bacteriana es muy grande. La capacidad del Mp para multiplicarse, tanto en el interior como en el exterior de los macrófagos, ha sido bien documentada (8, 114).

Es evidente que los macrófagos pueden destruir al Mp; la presencia de bacterias lisadas dentro de los fagolisosomas así lo indica. Se ha propuesto que esa destrucción estaría inducida por linfocitos T con capacidad para activar a los macrófagos mediante una reacción de inmunidad humoral (36, 91). No obstante, y por razones aún no conocidas, muchas veces el Mp es capaz de evadir o neutralizar los mecanismos bactericidas intralisosomales (23). Se ha propuesto que esa resistencia obedecería a la existencia de una cubierta indigerible compuesta por ácido micólico (23). Otros postulan que la menor capacidad para destruir bacterias podría deberse a la inadecuada formación de lisosomas y a una escasa síntesis de enzimas lisosomales (114).

La observación de bacterias en el citoplasma podría indicar su capacidad para abandonar el fagosoma y ubicarse en el citosol, escapando

así a la acción del contenido lisosomal. Ese mecanismo de evasión de la fagocitosis está bien comprobado (59), aunque no ha sido postulado específicamente para el Mp.

Sorprendentemente, aún no se sabe si puede haber recuperación espontánea de la paratuberculosis. Todo parece indicar que las infecciones progresan lenta e inevitablemente hasta producir signología clínica y muerte (23).

VI - Bibliografía

1. AALUND, O. (1984). Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests applied to animals with subclinical infections of paratuberculosis. Workshop Commission European Communities Programme on Animal Pathology, Copenhagen, 9-24.
2. ABBAS, B.; RIEMANN, H.P.; HIRD, D.W. (1983). Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in Northern California cattle and note on its economic significance. *Cal. Vet.* 8: 20-25.
3. AMBROSIO, R.E.; HARRIS, Y.; HUCHZERMEYER, J. (1991). A DNA probe for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 26: 87-93.
4. ANDERSON, A.O.; ANDERSON, N.D. (1976). Lymphocyte emigration from high endothelial venules in rat lymph nodes. *Immunol.* 31: 731-740.
5. BARCLAY, R.; RATLEDGE, C. (1983). Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* and mycobactin dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J. Bacteriol.* 135: 1138-1146.

6. BARKER, I.K.; VAN DREUMEL, A.A.; PALMER, N. (1993). The alimentary system. En: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmet N (ed.). Pathology of Domestic Animals. 4th Edition. Vol 2. California. Pag 1 – 318.

7. BENDIXEN, P.H. (1987). Immunologic reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. Nord Vet. Med 30: 163 – 168.

8. BENDIXEN, P.H.; BLOCH, B.; JØRGENSEN, J.B. (1981). Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected in vitro and in vivo: light microscopic and electron microscopic observations. Am. J. Vet. Res. 42: 109 – 113.

9. BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A.A.; STELWAGEN, J. (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet. Rec. 121: 142-146.

10. BENEDICTUS, G.; HAAGSMA, J. (1986). The efficacy of mesenteric lymph node biopsy in the eradication of paratuberculosis from an infected farm. Vet. Quart. 8: 5 – 11.

11. BENSUSSAN, N.; GRAND, G.D.; LIPOWSKA, B.; GRSCCELLI, C.; BHAN, A.K. (1986). A monoclonal antibody specific for rat intestinal lymphocytes. J. Immunol 136: 76 – 82.

12. BERNABE, A.; GOMEZ, M.A.; NAVARRO, J.A.; GOMEZ, S.; SANCHEZ J.; SIDRACH, J.; MENCHEN, V. (1991). Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Ruminant Res.* 5: 377 – 390.

13. BOLAND, R.C.; AHMED, D.J. (1985). Binding of lectins to goblet cell mucin in malignant and premalignant colonic epithelium in the CF-1 mouse. *Gastroenterol.* 89: 127-137.

14. BREES, D.J.; REIMER, S.B.; CHEVILLE, N.F.; FLORANCE, A.; THOEN, C.O. (2000). Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 60-63.

15. BROWN, P.; BOURNE, J.; STEEL, M. (1974). Immunoperoxidase and immunofluorescence techniques in pig tissues. *Histochem.* 40: 434.

16. BRUNELLO, F.; PERA, A.; MARINO, L.; ASTEGIANO, M.; BARLETTI, C.; GASTALDI, P.; VERME, G.; EMANUELLI, G. (1991). Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 36: 1741-1745.

17. BUERGELT, C.D.; HALL, C.E.; McENTEE, K.; DUMCAN, J.R. (1978). Pathologic evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Path.* 15: 196-207.

18. BYE, W.A.; ALLA, N.C.; TRIER, J.S. (1984). Structure, distribution and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterol.* 86: 789-801.

19. CAMPHAUSEN, R.T.; JONES, R.L.; BRENNAN, P.J. (1988). Antigenic relationship between *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1307 – 1310.

20. CARBONELL, P. (1998). Histopathological diagnosis of Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 76: 499.

21. CARTER, P.H.; COLLINS, F.M. (1974). The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med* 139: 1189 – 1203.

22. CARTUN, R.W. (1994) Infectious diseases. In Taylor C.R. and Cole R.J. *Immunomicroscopy: A diagnosis test for the surgical pathologist.* W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA.

23. CHEVILLE, N.F.; HOSTETTER, J.; THOMSEN, B.V.; SIMUTIS, F.; VANDOUBLEECK, Y.; STEADHAM, E. (2001). Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss *paratuberculosis* in macrophages. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 108: 236-243.

24. CHIODINI, R.J.; ROSSITER, C.A. (1996). Paratuberculosis: a potential zoonosis. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice. 12: 457 – 467.

25. CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J. (1983). Eastern white – tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc 182: 168 –169.

26. CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S.; THAYER, W.R.; COUTU, J.A. (1984). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Chron´s disease. J. Clin. Microbiol. 20: 966 – 971.

27. CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; THAYER, W.R.; COUTOU, J.A.; MERKAL, R.S. (1985). Mycobacterial spheroplasts isolated from patients with Crohn´s disease. Gastroenterol. 88: 1348 – 1351.

28. CHIODINI, R.J.; VAN KRUIJNIGEN, H.; MERKAL, R.S. (1987). Paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74: 218-262.

29. CHIODINI, R.J. JOHNE'S INFORMATION CENTER. Biology of *M. paratuberculosis*. On line. Fecha de actualización: agosto de 1999. Fecha de acceso 2/11/1999. Páginas: 9. Disponible en URL: <http://www.vetmed.wisc.edu/pbs/johnes/pathogen.html>

30. CHIODINI, R.J. JOHNE'S INFORMATION CENTER. History of Johne's disease. On line. Fecha de actualización: agosto de 1999. Fecha de acceso 2/11/1999. Páginas: 5. Disponible en URL: <http://www.vetmed.wisc.edu/pbs/johnes/pathogen.html>

31. CHIODINI, R.J. JOHNE'S INFORMATION CENTER. Laboratory diagnosis of Johne's disease. On line. Fecha de actualización: agosto de 1999. Fecha de acceso 2/11/1999. Páginas: 9. Disponible en URL: <http://www.vetmed.wisc.edu/pbs/johnes/pathogen.html>

32. CHIODINI, R.J. JOHNE'S INFORMATION CENTER. Pathogenesis of Johne's disease. On line. Fecha de actualización: agosto de 1999. Fecha de acceso 2/11/1999. Páginas: 3. Disponible en URL: <http://www.vetmed.wisc.edu/pbs/johnes/pathogen.html>

33. CHIODINI, R.J. JOHNE'S INFORMATION CENTER. Zoonotic potential of Johne's disease. On line. Fecha de actualización: agosto de 1999. Fecha de acceso 2/11/1999. Páginas: 8. Disponible en URL: <http://www.vetmed.wisc.edu/pbs/johnes/pathogen.html>

34. CHIODINI, R.J. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 12: 313 – 343.

35. COLLINS, M.T. (1995). Diagnosis of paratuberculosis. En *Paratuberculosis*: RW. Sweeney (ed.). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12: 157 –371.

36. COLLINS, F.M. AND CAMPBELL, S.G. (1982) Immunity to intracellular bacteria. *Vet Immunol Immunopathol.* 3: 5-66.

37. COLLINS, M.T.; SOCKETT, D.C.; RIDGES, S.; COX, J.C. (1991). Evaluation of commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29: 272 – 276.

38. COLONY, P.C.; STEELY, J. (1987). Lectin binding patterns in developing rat colon. *Gastroenterol.* 92: 1116-1126

39. COONS, A.H. (1941). The beginnings of immunofluorescence. *J. Immunol.* 87: 499.

40. COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47: 200.

41. COOPER, H.S. (1984). Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry: The peanut (*Arachis hypogaea*) lectin. Human Pathol. 15: 904 – 906.

42. COOPER, H.S.; FARANO, P.; COPMAN, R.A. (1987). Peanut lectin binding sites in colon of patients with ulcerative colitis. Arch. Pathol. Lab. Med. 111: 270-275.

43. COOPER, H.S.; REUTER, J. (1983). Peanut lectin – binding sites in polyps of the colon and rectum. Lab. Inv. 49: 655-661.

44. COOPER, H.S. (1982). Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma. Lab. Invest. 47: 383-390.

45. CUELLO, A.C. (1985). Immunohistochemistry. IBRO Handbook series. Methods in Neurosciences, Vol. 3. John Wiley & Sons.

46. CURTAIN, C.C.; CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. (1971). The origins of immunoglobulin in the mucous secretions of cattle. Clin. and Exp. Immunol. 8: 335 – 344.

47. DAMJANOV, I. (1987). Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab. Invest. 57: 5 – 20.

48. DE DIEGO, A. (1991). Enfermedades de los bovinos. Editorial Hemisferio Sur. Bs. As. Argentina 19 – 49.

49. DOYLE, R.J. (1982). Lectins in diagnostic microbiology. Biotech 1: 5-9.

50. DUBASH, K.; SHULAW, W.P.; BECH-NIELSEN, S.; STILLS, H.F.; SELMONS, R.D. (1996). Evaluation of an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208: 401 – 403.

51. ETZLER, M.E.; BRANDSTRATOR, M.L. (1974). Differential localization of cell surface and secretory components in rat intestinal epithelium by use of lectins. J. Cell. Biol. 62: 329-343.

52. ETZLER, M.E. (1979). Lectins as probes in studies of intestinal glycoproteins and glycolipids. Am. J. Clin. Nutr. 32: 133-138.

53. FILIPE, M.I.; FENGER, C. (1979). Histochemical characteristics of mucins in the small intestine. A comparative study of normal mucosa, benign epithelial tumors and carcinoma. Histochem. J. 11: 277-287.

54. FISCHER, O.; PAVLÍK, I.; HORVÁTHOVÁ, A.; BARTL, J.; SVÁSTOVÁ, P.; ROZSYPALOVÁ, Z.; JUSTOVÁ, M.; MATOUSKOVÁ, O. (1999). Changes in the mucopolysaccharide composition of mucus in ileal mucosal goblet cells from cattle infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Vet. Med. Czech. 44: 253 – 258.

55. FREEMA, H.J.; LOTAN, R.; KIM, Y.S. (1980). Application of lectins for detection of goblet cell glycoconjugate differences in proximal and distal colon of the rat. Lab. Invest. 42: 405-411.

56. GELBERG, H.B.; COOPER, B.J. (2002) Nature and causes of disease: Interactions of host, pathogen and environment. In: SLAUSON, D.O. AND COOPER, B.J. Mechanisms of Disease: A Textbook of Comparative General Pathology, 3rd Edition, Edit. Mosby, St. Louis, USA.

57. GIMENO, E.J. (1984). Paratuberculosis (Enfermedad de Johne) Vet. Arg. 1: 210-219.

58. GOLDSTEIN, I.J.; HAYES, C.E. (1978). The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35: 127-340.

59. GOMEZ DUNN, C.L. (2002) Endocytosis. En: "Bases de Inmunología Animal". Capítulo 6. Editores: Pennimpede E, Gómez C, Stanchi N. Editado en CD, Páginas 6.1-6.28. La Plata.

60. GREEN, E.P.; TIZZARD, M.L.V.; MOSS, M.T.; THOMPSON, J.; WINTERBOURNE, J.J.; FADDEN, J.J.; HERMON-TAYLOR, J. (1989). Sequence and characteristics of IS900, and insertion element identified in a human Crohn's disease isolated of *M. paratuberculosis*. Nucleic Acids Res. 17: 9063 – 9072.

61. GUNNARSON, E.; FODSTAD, F.H. (1979). Analysis of antigens in *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Vet. Scand. 20: 200-215.

62. HAMILTON, H.L.; COOLEY, A.J.; ADAMS, J.L.; CZUPRYNSKI, C.J. (1991). *Mycobacterium paratuberculosis* monoassociated nude mice as a paratuberculosis model. Vet. Pathol. 28: 146-155.

63. HARDING, H.P. (1957). The detection of *M. johnei* in sections by fluorescent examination. J. Comp. Pathol. 67: 180-185.

64. HEIN, W.R.; MACKAY, C.R. (1991). Prominence of T cells in the ruminant immune system. Immunology Today. 12: 30 – 34.

65. HINES, M.; KREEGER, J.M.; HERRON, A.J. (1995). Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. *Lab. Animal Sc.* 45: 334-351.

66. HOVE, M.G.M.; SMITH, M.B. (1998). Detection of Mycobacteria with granulomatous lesions staining negative with routine acid-fast stains. *Appl. Immunohistochem.* 6: 169-179.

67. HUSLAND, A.J. (1987). Perspectives in mucosal immunity: a ruminant model. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 17: 357-365.

68. ISSEKUTZ, T.B. (1984). The response of gut-associated T lymphocytes to intestinal viral immunization. *J. Immunol* 133: 2955-2960.

69. JACOBS, L.R.; HUBER, W. (1985). Regional distribution and alterations of lectin binding to colorectal mucin in mucosal biopsies from controls and subjects with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 75: 112-118.

70. JAEGER, L.A.; LAMAR, C.H.; TUREK, J.J. (1989). Lectin binding to small intestine goblet cells of newborn, suckling, and weaned pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1984-1987.

71. JAMES, S.P. (1991). Mucosal T-cell function. *Gastroenterology Clinics of North America.* 20: 597-612.

72. JARRY, A.; ROBASZKIEWICZ, M.; BROUSSE, N.; POTET, F. (1989). Immune cells associated with M cells in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches in the rat. An electron and immuno electron microscopic study. *Cell Tiss. Res.* 255: 293-298.

73. JØRGENSEN, J.B. (1984). The diagnosis of clinical paratuberculosis in bovines. En: Jørgensen JB (Ed.). *Paratuberculosis, diagnostic methods, their practical application and experience with vaccination*. Commission of the European Communities. Agriculture series. Luxembourg. 1-9.

74. JULIAN, R.J. (1975). A short review and some observation on Johne's disease with recommendation for control. *Can. Vet J.* 16: 33-43.

75. KALD, B.; OLAISSON, G.; SJÖDAHL, R.; TAGESSON, C. (1990). Novel aspect of Crohn's disease: increased content of platelet-activating factor in ileal and colonic mucosa. *Digestion* 46: 199-204.

76. KATSUYAMA, T.; ONO, K.; NAKAYAMA, J.; AKAMATSU, T.; HONDA, T. (1985). Mucosubstance histochemistry of the normal mucosa and carcinoma of the large intestine. *Acta Pathol. Jp.* 35: 1409-1425.

77. KENT, T.H.; MOON, H.W. (1973). The comparative pathogenesis of some enteric disease. *Vet. Pathol* 10: 414-469.

78. KIM, J.C.; SANGER, V.L.; WHITENACK, D.L. (1976). Ultrastructural studies of bovine paratuberculosis (Johne's disease). *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 71: 78-83.

79. KREEGER, J.M. (1991). Ruminant paratuberculosis. A century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 373-382.

80. KUBO, M.; MORIWAKI, M.; WATASE, H. (1983). Electron microscopic observation on the intestine of cow with Johne's disease. *Jpn. J. Vet. Sci* 45: 259-262.

81. KUNZE, Z.M.; PORTAELS, F.; FADDEN, J.J. (1992). Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2366-2372.

82. LARSEN, A.B. (1972). Paratuberculosis: the status of our knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 161: 1539-1541.

83. LARSEN, A.B.; MERKAL, R.S.; CUTLIO, R.C. (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 36: 255 – 257.

84. LARSEN, A.B.; STALHEIM, O.H.; HUGHES, D.E.; APPELL, L.H.; RICHARDS, W.D.; HIMES, E.M. (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen donor bull. J. Am. Vet. Med. Assoc. 179: 169-171.

85. LIEBLER, E.M. (1986). Mucosa-associated lymphoid nodules in the large intestine of young calves: a morphological study with special regard to lymphoepithelial relationship and epithelial ultrastructure. MS Thesis, Iowa state University, AMES. Iowa.

86. LIEBLER, E.M.; POHLENZ, J.F.; CHEVILLE, N.F. (1988). Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of Calves II. Electron Microscopy. Vet. Pathol 25: 509-515.

87. LIEBLER, E.M.; POHLENZ, J.F.; MOENNING, V. (1995). Lymphocyte subpopulations in gut-associated lymphoid tissue of cattle with experimental mucosal disease. Adv. Exp. Med. Biol. 37: 825-827.

88. LIEBLER, E.M.; POHLENZ, J.F.; WOODE, G.N. (1988). Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of calves I. Distribution and histology. Vet. Pathol 25: 503-508.

89. LIEBLER, E.M.; PRESS, C.; LANDSVERK, J. (1994). Lymphocyte subpopulations in jejunal and ileal Peyer's of calves with experimental *Salmonella dublin* infection. *Zentralbl. Veterinarmed.* 41: 113-125.

90. LUGLON, I. (1999). Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol. Cell. Biol.* 77: 364-372.

91. MACKANESS, G.B. (1964) The immunological basis of acquire cellular resistance. *J. Exper. Med.* 120: 105-120.

92. MAJEED, S.; GOUSWAARD, J. (1971). Aortic lesions in goats infected with *Mycobacterium johnei*. *J. Comp. Path.* 81: 571-574.

93. MASSONE, A.R.; ITAGAKI, S.I.; DOI, K.; GIMENO, E.J. (1991). Lectin histochemical study on normal and paratuberculosis-affected bovine ileum. *J. Vet. Med. Sci* 53: 761-763.

94. MASSONE, A.R.; MARTIN, A.A.; IBARGOYEN, G.S.; GIMENO, E.J. (1990). Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. *Zentralbl. Veterinarmed.* 37: 251 – 253.

95. MASSONE, A.R.; IBARGOYEN, G.S.; MARTIN, A.A.; DOI, K.; GIMENO, E.J. (1991). Demonstration of *Mycobacterium paratuberculosis* in tissue

sections: comparative studies of histological and immunohistochemical methods. *Isr. J. Vet. Med* 46: 48-50.

96. MC DONALD, W.T.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F.; CONDRON, R. J. (1999). Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust. Vet. J.* 77: 113-119.

97. MC FADDEN, J.J.; BUTCHER, P.D.; CHODINI, R.J. (1989). Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol. Rev* 2: 90-117.

98. MERKAL, R.S.; CURRAN, B.J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.* 28: 276-279.

99. MERKAL, R.S. (1973). Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163: 1100-1102.

100. MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B.; BOOTH, G.D. (1975). Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 36: 837-838.

101. MERKAL, R.S.; MC CULLOUGH, W.G. (1982). A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Current Microbiol* 7: 333-335.
102. MOKRESH, A.H.; BUTLER, D.G. (1990). Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can. J. Vet. Res.* 54: 313-319.
103. MOMOTANI, E.; FURUGOURI, K.; OBARA, Y.; MIYATA, Y.; ISHIKAWA, Y.; YOSHINO, T. (1986). Immunohistochemical distribution of ferritin, lactoferrin and transferrin in granulomas of bovine paratuberculosis. *Infection and Immunity* 52: 623-627.
104. MOMOTANI, E.; ISHIKAWA, Y.; YOSHINO, T. (1986). Immunohistochemical distribution of immunoglobulin and secretory component in the ileum of normal and paratuberculosis infected cattle. *J. Comp. Pathol.* 96: 659-669.
105. MORE, J.; FIORAMONTI, J.; BENZAET, F. (1987). Histochemical characterization of glycoproteins present in jejunal and colonic goblet cells of pigs on different diets. *Histochemistry* 87: 189-194.
106. MOSS, M.T.; GREEN, E.P.; TIZARD, M.L.; MALIK, Z.P.; HERMONT-TAYLOR, J. (1991). Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by

DNA hybridization with fragment of the insertion element IS900. Gut 32: 395-398.

107. MURNAME, R.D.; AHER-RINDEL, A.J.; PRIEUR, D.J. (1987). Lectin histochemistry of an ovine lysosomal storage disease with deficiencies of β -galactosidase and α -neuraminidase. Am. J. Pathol 135: 623-630.

108. NAVARRO, J.A.; BERNABÉ, A.; GOMEZ, M.A.; SÁNCHEZ, J.; GOMEZ, S. (1991). Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. J. Vet. Med 38: 231 – 237.

109. NAVARRO, J.A.; SANCHEZ, J.; BERNABE,A.; GOMEZ, M.A.; GOMEZ, S.; SEVA, J. (1992). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* antigen with colloidal immunogold in naturally infected sheep. J. Vet. Med. 39: 421-427.

110. NEUTRA, M.R.; GRAND, R.J.; TRIER, J.S. (1977). Glycoprotein synthesis, transport and secretion by epithelial cells of the human rectal mucosa: Normal and cystic fibrosis. Lab. Invest. 36: 535-546.

111. NEYLY, T.; BOURNE, F.J. (1976). The nature of the local immune system of the bovine small intestine. Immunol. 31: 475-480.

112. NGUYEN, H.T.; BUERGELT, C.D. (1983). Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 11: 2173-2174.
113. ORDOÑEZ, N.G.; BATSAKIS, J.G. (1984). Comparison of *Ulex europaeus* I lectin and factor VIII related antigen in vascular lesions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108: 129-132.
114. PALIWAL, O.P.; REHBINDER, C. (1981). Ultrastructural studies of paratuberculosis (Johne's disease) in goats. *Acta Vet. Scand.* 22: 180-188.
115. PARSONS, K.R.; HOWARD, C.J.; JONES, B.V.; SOPP, P. (1989). Investigation of bovine gut associated lymphoid tissue (GALT) using monoclonal antibodies against bovine lymphocytes. *Vet. Pathol* 26: 396-408.
116. PATTERSON, D.S.P.; ALLEN, W.M. (1972). Chronic mycobacterium enteritis in ruminants as a model of Crohn's disease. *Proc. Royal Soc. Med.* 65:46-49.
117. PAVLÍK, I.; BEJCKOVÁ, L.; PAVLAS, M.; ROZYPALOVÁ, Z.; KOSKOVÁ, S. (1995). Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* 45: 311-318.

118. PERFUMO, C.J.; MASSONE, A.R. (2001). Lectinas en patología veterinaria. Información básica y aplicada. En Manual del decimotercer curso internacional de posgrado en técnicas de inmunohistoquímica, lectinhistoquímica y microscopía electrónica. Fac. C. Vet. UNLP. 1-12.

119. PETRUCCELLI, M.A.; QUIROGA, M.A. (2001). Obtención, acondicionamiento y envío de muestras para microscopía electrónica. En: Manual del decimotercer curso internacional de postgrado en técnicas de inmunohistoquímica, lectinhistoquímica y microscopía electrónica. Fac. C. Vet. UNLP. 1-12.

120. POLAK, J.M.; VAN NOORDEM, S. (1986). Immunocytochemistry. Modern methods and applications. 2nd Ed., J. Wrigth & Sons, Bristol.

121. PONDER, B.A.J.; WILKINSON, M.M. (1983). Organ- related differences in binding of *Dolichos biflorus* agglutinin to vascular endothelium. Dev. Biol. 96: 535-540.

122. PRESS, C.; MC CLURE, S.; LANDSVERK, T. (1991). Computer-assisted morphometric analysis of absorptive and follicle-associated epithelia of Peyer's patches in sheep foetuses and lambs indicates the presence of distinct T- and B- cell components. Immunology 72: 386-392.

123. REICHEL, M.P.; KITTELHERGER, R.; PENROSE, M.F.; MEYNELL, R.M.; CONSINS, D.; ELLIS, T.; MUTHARIA, L.M.; SUGDEN, E.A.; JOHNS, A.H.; DE LISLE, G.W. (1999). Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. (1999). Vet. Microbiol. 66: 135- 150.

124. REYNOLDS, T.H.; OWEN, G. (1986). Differential distribution of lymphocytes and accessory cells in mouse Peyer's patches. Anal. Rec. 215: 144 – 152.

125. REYNOLDS, J. (1980). Gut- associated lymphoid tissues in lambs before and after birth. Monogr. Allergy 16: 187 – 202.

126. RHODES, J.M.; BLACK, R.R.; SAVAGE, A. (1988). Altered lectin binding by colonic epithelial glycoconjugates in ulcerative colitis and Crohn disease. Dig. Dis. Sci. 33: 1359-1363.

127. RIEMANN, H.P.; ABLAS, B. (1987). Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine 27: 481 – 506.

128. RIS D.R., HAMEL K.L. AYLING J.M. (1988). The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the

comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. N. Z. Vet. J. 36: 112-114.

129. SALMI, M.; JALKANEN, S. (1991). Regulation of lymphocyte traffic to mucosa-associated lymphatic tissues. Gastroenterology Clinics of North America. 20: 493-510.

130. SAXEGAARD, F.; BAESS, I.; JANTZEN, E. (1988). Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. APMIS 96: 497 – 502.

131. SERAFIN, E.P.; KIRKWOOD, A.P.; CHAMBERS, T.J. (1981). Rate and pattern of epithelial cell proliferation in ulcerative colitis. Gut. 22: 648-652.

132. SHANAHAN, F. (1994). Current concepts of pathogenesis of inflammatory bowel disease. Ir. J. Med. Sci. 163: 544- 549.

133. SHARON, N.; LIS, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. Science 246: 227-233.

134. SHERMAN, D.M. (1985). Current concepts in Johne´ disease. Vet. Med. 80: 77-84.

135. SHERMAN, D.M.; GAY, J.M.; BOULEY, D.S.; NELSON, G.H. (1990). Comparison of the complement fixation and agar gel immunodiffusion tests for the diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 51: 461-465.
136. SHOENFELD, Y.; ISENBERG, D.A. (1988). Mycobacteria and autoimmunity. *Imm. Today* 9: 178-182.
137. SNEATH, P.H.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore. USA.
138. SNOW, G.A. (1970). Mycobactins. Irons- chelating growth factors from mycobacteria. *Bacterial Rev.* 34: 99-125.
139. SPANGLER, L.; BECH NIELSEN, S.; HEIDER, L.E. (1988). A prospective evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and agar gel immunodiffusion test (AGID) relative to fecal culture in the diagnosis of clinical and subclinical paratuberculosis in cattle in central Ohio. *Acta Vet Scand.* 84:243-245.
140. STABEL, J.R.; ACKERMANN, M.R.; GOFF, J.P. (1996). Comparison of polyclonal antibodies to three different preparations of *Mycobacterium paratuberculosis* in immunohistochemical diagnosis of Johne's disease in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest* 8: 469-473.

141. STABEL, J.R. (1998). Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci.* 81: 283-288.
142. STERENBERGER, L.A. (1986). *Immunocytochemistry*. 3rd. Ed. J. Wiley & Sons, New York.
143. SWEENEY, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* 12: 305-312.
144. TAYLOR, T.K.; WILKS, C.R.; MC QUEEN, D.S. (1981). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109: 532- 533.
145. THAYER, W.R.; COUTU, J.A.; CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S. (1984). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease II. Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 29: 1080 – 1085.
146. THOMSON, R.G. (1972). Bovine virus diarrhea. *Vet. Path.* 9: 83 – 84.

147. THORESEN, O.F.; FALK, K.; EVENSEN, O. (1994) Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J. Vet. Diagn. Invest* 6: 195 – 199.
148. TRIER, J.S. (1991). Structure and function of intestinal M cells. *Mucosal Immunology I. Basic Principles. Gastroenterologic Clinics of North Am.* 20: 531 – 547.
149. VAN DER OORD, J.J.; WOLF-PEETERS, C.; FACCHETTI, F.; DESMET, V.J. (1984). Cellular composition of hypersensitivity-type granulomas: Immunohistochemical analysis of tuberculous and sarcoidal lymphadenitis. *Human Pathology.* 15: 6 559 – 565.
150. VAN NORDEM, S. (1986). Tissue preparation and Immunostaining Techniques for Light Microscopy. En: Polak, J.M. and Van Nordem, S. *Immunocytochemistry. Modern methods and applications.* 2nd Ed., J. Wright & Sons, Bristol.
151. VARIYAM, E.P.; HOSKINS, L.C. (1981). Mucin degradation in human colon ecosystems. Degradation of hog gastric mucin by cecal extracts and fecal cultures. *Gastroenterology* 81: 751-758.
152. VECCHI, M.; TORGANO, S.; MONTI, M.; BERTI, E.; ÁGAPE, D.; PRIMIGNANI, M.; RONCHI, G.; DE FRANCIS, R. (1987). Evaluation of

structural and secretory glycoconjugates in normal human jejunum by means of lectin histochemistry. *Histochem.* 86: 359-364.

153. WAYNE, R.H.; MACKAY, C.R. (1991). Prominence of $\gamma\delta$ T cells in the ruminant immune system. A review. *Immunology Today* 12: 30 – 34.

154. WHIPPLE, D.; LE FEBVRE, R.; ANDREWS, R.; THIERMANN, A.B. (1987). Isolation and analysis of restriction endonuclease digestive patterns of chromosomal DNA from *Mycobacterium paratuberculosis* and other *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology.* 25: 1511- 1515.

155. YOKOMIZO, Y. (1986). Evaluation on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using *Mycobacterium phlei*-absorbed serum for the diagnosis of bovine paratuberculosis in a field study. *Jpn. Ag. Res. Quarterly* 20: 60 – 67.