



REVISIÓN

Papel de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en la etiopatogenia de la enfermedad de Crohn

Role of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in the etiopathogenesis of Crohn's disease

José Ignacio Fortea Ormaechea^a, Javier P. Gisbert^b e Ignacio Marín-Jiménez^{a,*}

^aServicio de Aparato Digestivo, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^bHospital Universitario de la Princesa, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, España

Recibido el 20 de noviembre de 2008; aceptado el 11 de diciembre de 2008

Introducción

La enfermedad de Crohn está englobada dentro de la denominada enfermedad inflamatoria intestinal crónica. Se sabe mucho acerca de sus características clínicas, radiológicas y anatomopatológicas; además, se dispone de un amplio arsenal terapéutico para su control. Sin embargo, se desconoce su etiopatogenia. Se han propuesto diversas teorías, la más aceptada actualmente es la que algunos autores denominan teoría autoinmune. Según ella, la inflamación intestinal es la consecuencia de una respuesta inmune inapropiada frente a antígenos propios de la flora intestinal, en pacientes genéticamente predispuestos¹⁻⁵. El término «autoinmune» puede parecer inexacto e incluso incorrecto, dado que esta reacción no está dirigida contra antígenos propios. Sin embargo, aquellos que apoyan esa denominación argumentan que, en condiciones de normalidad, hay un equilibrio homeostático entre esta flora (que es única en cada persona) y el sistema inmunitario, por lo que toda alteración de éste tiene que ser considerada como un proceso autoinmune⁶. Esta teoría está sustentada en

pruebas tanto clínicas como experimentales. Dentro de las primeras cabe destacar las siguientes: la afectación más intensa en aquellas zonas donde hay una mayor concentración de bacterias (íleon terminal y colon), la disminución de la inflamación con la administración de antibióticos de amplio espectro⁷ y, por último, la prevención de la recurrencia de la enfermedad en el intestino distal con la derivación quirúrgica del contenido intestinal⁸. Con respecto a las pruebas experimentales, se destaca que se han identificado defectos en la barrera epitelial, la inmunidad innata y adquirida, así como en los sistemas reguladores inmunitarios, todo lo que conduciría a una respuesta «exagerada» frente a las bacterias comensales⁹⁻¹⁴.

En contraposición a esta teoría hay otra hipótesis, según la cual la enfermedad de Crohn estaría producida por el microorganismo *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Esta micobacteria es la causante de la denominada enfermedad de Johne o enteritis paratuberculosa, descrita por Johne y Frothingham en 1895¹⁵. Esta enfermedad afecta con preferencia a los ruminantes y presenta un comportamiento clínico e histológico muy similar a la enfermedad de Crohn¹⁶⁻¹⁸. Tal circunstancia hizo que en 1913 Dalziel propusiese a este microorganismo como el causante de aquella¹⁹. En los últimos años, diversos estudios y metaanálisis han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre *M. avium paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn,

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: drnachomarin@hotmail.com (I. Marín-Jiménez).

que si bien todavía no puede ser considerada como etiopatógena, sí plantea ciertas preguntas a la hora de entender por qué se produce la enfermedad. La presente revisión se centrará en analizar críticamente esta teoría alternativa, denominada por algunos teoría de la micobacteria, para hacer énfasis en las diferentes pruebas que ponen de manifiesto esta relación.

***Mycobacterium avium paratuberculosis* y enfermedad de Johne**

El microorganismo *M. avium paratuberculosis* pertenece al complejo *Mycobacterium avium*. Este complejo incluye *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium chimera* y, por último, *M. avium*, dentro del que se encuentra *M. avium paratuberculosis* (ver tabla 1). Son bacilos rectos grampositivos, aerobios estrictos, resistentes al ácido y al alcohol e inmóviles. Como se comentó previamente, este microorganismo es el causante de la enteritis paratuberculosa. Esta enfermedad afecta a diferentes mamíferos, principalmente rumiantes, y da lugar a una infección sistémica con inflamación crónica del intestino. Esta inflamación viene precedida de un largo período de latencia, en el que *M. avium paratuberculosis* coloniza al animal sin producir síntomas. Clínicamente se suele manifestar en forma de diarrea periódica y de adelgazamiento progresivo, aunque la presentación clínica puede variar entre las diferentes especies afectadas. Los tramos intestinales más frecuentemente implicados son el íleon, el yeyuno y el duodeno, y es más rara la afectación del ciego, colon y recto. Los hallazgos histológicos y endoscópicos son muy similares a los de la enfermedad de Crohn. Al igual que ocurre con *Mycobacterium leprae*, su presencia en los tejidos puede ser pluribacilar o paucibacilar^{16,17}. La mayoría de los animales muere como consecuencia de la infección.

Se encuentra de forma amplia en el medioambiente, donde puede permanecer durante largos períodos de tiempo, y también en el ámbito de la ganadería²⁰. La fauna salvaje es también un reservorio importante²¹. Hay varios estudios que han puesto de manifiesto la existencia de

M. avium paratuberculosis en el ganado de Dinamarca, Australia y Estados Unidos²²⁻²⁶. La transmisión entre el ganado se produce a través de la ingesta de leche de animales infectados y de otras potenciales fuentes de contaminación (agua, pasto, etc.)^{27,28}. De manera análoga, se ha sugerido que la transmisión al hombre se produce a través de la cadena alimentaria²⁹. En este sentido, hay publicaciones que han observado la presencia de *M. avium paratuberculosis* en los depósitos de agua urbana y en la leche comercializada³⁰⁻³⁴. Su presencia en esta última puede explicarse por su capacidad de soportar las condiciones de pasteurización³⁵. Por último, es de destacar el estudio realizado por Naser et al en el año 2000³⁶, en el que se observó la presencia de *M. avium paratuberculosis* en la leche materna de 2 pacientes con enfermedad de Crohn frente a ninguno de los 5 controles, y se descubrió, así, una posible vía de transmisión maternoinfantil.

***Mycobacterium avium paratuberculosis* y enfermedad de Crohn**

El origen de la teoría de la micobacteria se remonta a 1913 cuando Dalziel puso de manifiesto las similitudes clínicas e histológicas entre la enfermedad de Johne y la que él denominó enteritis intestinal crónica, posteriormente conocida como enfermedad de Crohn, a partir de 1932¹⁹. Desde entonces se han alternado períodos en los que se está más a favor o en contra del papel etiopatógeno de *M. avium paratuberculosis* en esta enfermedad. Inicialmente predominaba la opinión de los escépticos, que negaban tal relación basándose en el hecho de que el microorganismo no se podía cultivar ni visualizar en los tejidos afectados, así como que tampoco se podía demostrar una reacción inmune específica frente a esta micobacteria²⁹. No obstante, tras el aislamiento de una micobacteria en el tejido de 3 pacientes con enfermedad de Crohn³⁷ en 1984 y su identificación como *M. avium paratuberculosis* mediante técnicas moleculares 3 años más tarde³⁸ se recobró el interés por esta teoría. A partir de estos hallazgos se han sucedido muchos otros estudios con resultados dispares que han generado un intenso debate en la comunidad científica.

Las diferentes pruebas que ponen de manifiesto la posible relación entre *M. avium paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn se pueden agrupar, como expusieron Chamberlin y Naser³⁹, en las siguientes categorías: aislamiento de *M. avium paratuberculosis* en cultivos de muestras intestinales, sangre y leche materna; identificación de *M. avium paratuberculosis* mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); visualización de *M. avium paratuberculosis* en los tejidos mediante técnicas de hibridación in situ, anticuerpos específicos frente a esta micobacteria y, por último, la respuesta a tratamiento antibiótico.

Cultivos

A continuación se revisan los distintos procedimientos diagnósticos utilizados para detectar la presencia de *M. avium paratuberculosis* en los tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn.

El *M. avium paratuberculosis* es un microorganismo de muy lento crecimiento, que precisa de cultivos especiales

Tabla 1 Caracterización microbiológica de las micobacterias

Complejo *Mycobacterium avium*

- *Mycobacterium intracellulare*
- *Mycobacterium chimera*
- Subespecies de *M. avium*
 1. *Mycobacterium avium avium*
 2. *Mycobacterium avium hominissuis*
 3. *Mycobacterium avium paratuberculosis*

Características

- Bacilos rectos o ligeramente curvados
- Grampositivos
- Resistentes al ácido y al alcohol
- Inmóviles
- Aerobios estrictos
- Necesidad de aporte externo de micobactina

para un aislamiento más efectivo. A esta dificultad se le suma el hecho de que en la enfermedad de Crohn, a diferencia de lo que ocurre con la enteritis paratuberculosa, el *M. avium paratuberculosis* tiene una presentación paucibacilar y en forma de esferoplasto. Esta denominación hace referencia a la ausencia de pared celular, lo que hace que no sea visible mediante la técnica de tinción resistente al ácido y al alcohol y sea más difícil de cultivar, ya que necesita aditivos para igualar la osmolaridad intracelular y extracelular. Una vez aislado en los cultivos, desarrolla su pared⁴⁰.

De esta manera, como se comentó anteriormente, las dificultades iniciales a la hora de aislar *M. avium paratuberculosis* mediante cultivos convencionales hicieron que hubiese más detractores que seguidores de la teoría de la micobacteria. Tras el estudio realizado por Chiodini et al en 1984³⁷, en el que se detectó la presencia de una micobacteria en muestras intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn, que 3 años más tarde se identificó como *M. avium paratuberculosis*³⁸, la teoría retomó impulso. En los años siguientes se sucedieron otros estudios que confirmaron estos resultados⁴¹⁻⁴⁵. Sin embargo, el porcentaje de muestras con cultivos positivos para *M. avium paratuberculosis* era bajo (5% en el trabajo de Chiodini et al) necesitándose además largos períodos de cultivo (hasta 2 años) para detectar el crecimiento de esta micobacteria. Todo esto demostraba la existencia de escasas pruebas de *M. avium paratuberculosis* como causante de la enfermedad de Crohn.

Sin embargo, en el año 2000, Schwartz et al, utilizando el medio MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube* 'tubo indicador de crecimiento micobacteriano'), consiguieron acortar el tiempo para el crecimiento de esta micobacteria, además de aumentar su eficacia⁴⁰. De esta forma, compararon 27 muestras de pacientes con enfermedad de Crohn (de las que 7 se obtuvieron mediante resección quirúrgica y el resto mediante biopsia endoscópica) con 33 muestras procedentes de personas sin esa enfermedad. Los resultados mostraron un aislamiento global de *M. avium paratuberculosis* del 37% en los primeros frente al 5,6% de los controles. Al mismo tiempo, dentro del grupo con enfermedad de Crohn se observó un mayor número de resultados positivos en las muestras quirúrgicas que en las endoscópicas, así como un menor tiempo de incubación para las primeras (el 86 frente al 20% y 12 frente a 40 semanas, respectivamente). Los autores concluyeron, por un lado, que el MGIT proporcionaba un medio de cultivo más eficaz y, por otro, que sus resultados apoyaban el papel etiopatógeno de *M. avium paratuberculosis* en la enfermedad de Crohn. Con respecto a las diferencias encontradas en función de la técnica utilizada para la toma de muestras, sugirieron que esta micobacteria puede residir con mayor frecuencia en la submucosa.

En los años sucesivos se ha realizado una serie de estudios que han corroborado tales hallazgos^{36,46-48}. De estos estudios, destacan 2 realizados por el grupo de Naser. El primero de ellos es el trabajo realizado en el año 2000³⁶, que demostró la existencia de *M. avium paratuberculosis* en la leche materna de 2 pacientes con enfermedad de Crohn, mientras que no se encontró en ninguno de los 5 controles. El segundo se realizó 4 años más tarde⁴⁶ detectándose la presencia de *M. avium paratuberculosis* en cultivos de

sangre periférica en el 50% de los pacientes con enfermedad de Crohn frente a ninguno de los controles. La importancia de estos estudios reside en que demuestran la existencia de micobacterias vivas en leche materna y en sangre periférica, convirtiéndose así en una infección sistémica, al igual que lo que ocurre en la enteritis paratuberculosa. Por consiguiente, estos hallazgos suponen una prueba sólida para la teoría de la micobacteria. Los detractores argumentan que los resultados del segundo trabajo se explicarían por un aumento de la permeabilidad intestinal asociada a este tipo de enfermedad inflamatoria intestinal.

Reacción en cadena de la polimerasa

A pesar de las mejoras de los resultados mediante la utilización de los medios MGIT, esta técnica sigue requiriendo de un largo período de tiempo para su valoración. En consecuencia, la mayoría de los investigadores utiliza técnicas de PCR y de hibridación in situ para la detección de *M. avium paratuberculosis*. Ambas técnicas utilizan el fragmento de inserción IS900, que es una secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) que se repite dentro del genoma del *M. avium paratuberculosis* y que es altamente específica para esta micobacteria^{38,49,50}. A pesar de que se han descrito elementos similares a IS900 en otras micobacterias⁵¹ presentes en el medioambiente, la secuencia entera de IS900 es única de *M. avium paratuberculosis*⁵². No obstante, los fragmentos cortos de la secuencia IS900 utilizados en algunos estudios pueden no ser únicos y, de esta forma, dar lugar a falsos positivos. Para superar esta dificultad se debe utilizar simultáneamente varios fragmentos de esta secuencia, a la vez que se debe optimizar el procesamiento de la muestra⁵³.

El primer estudio que utilizó esta técnica fue el realizado por Sanderson et al en 1992⁵⁴, en él se detectó la presencia de *M. avium paratuberculosis* en el intestino del 65% de los pacientes con enfermedad de Crohn, mientras que en los pacientes con colitis ulcerosa y en los controles sólo se detectó en el 4,3 y el 12,5%, respectivamente. En los siguientes años se sucedieron varios estudios, algunos con aislamientos positivos^{47,48,55-60} y otros con aislamientos negativos⁶¹⁻⁶⁵, que pusieron en evidencia el desconcierto general sobre el papel que desempeña *M. avium paratuberculosis* en la enfermedad de Crohn. Estas discrepancias se han achacado a diferencias en las técnicas de extracción y procesamiento de las muestras. En este sentido, un estudio realizado por Bull et al en 2003⁴⁷, en el que se optimizó el procesamiento de las muestras, consiguió un aislamiento del 92% en los pacientes con enfermedad de Crohn frente al 26% de los controles. De esta manera, los autores concluyeron que en la extracción del ADN de las muestras era de especial relevancia procesarlas al obtenerlas y no una vez congeladas, añadir a la lisis química y enzimática de la pared una lisis mecánica y utilizar *nested*-PCR (PCR anidada), que aumenta la capacidad de detección del ADN.

En los 2 últimos años se han realizado 2 metaanálisis que merecen especial mención. El primero, realizado por Feller et al⁶⁶, incluye estudios de casos y controles que comparan la prevalencia del *M. avium paratuberculosis* en la enfermedad de Crohn en los casos frente a la prevalencia en los controles. Para esto, se limitaron a aquellos trabajos que utilizaban PCR

o detección de anticuerpos contra *M. avium paratuberculosis* mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* 'técnica de radioinmunoanálisis'). Se incluyeron 28 estudios, de los que 18 utilizaban PCR y el resto ELISA. En ambos grupos se observó una mayor prevalencia de *M. avium paratuberculosis* en pacientes con enfermedad de Crohn con una *odds ratio* de 7,01 y de 1,72, respectivamente. Cuando se compararon con pacientes con colitis ulcerosa se obtuvieron resultados similares. Los autores concluyeron que, pese a estos resultados, no se puede afirmar que *M. avium paratuberculosis* tuviese un papel importante en la etiopatogenia de la enfermedad de Crohn. Para esto argumentan que, al tratarse de estudios de casos y controles, no se puede establecer una relación temporal entre el inicio de la infección y el desarrollo posterior de la enfermedad. En este sentido, es de destacar el trabajo realizado por Hermon-Taylor et al⁶⁷, en el que aislaron ADN de *M. avium paratuberculosis* en los ganglios cervicales de un niño de 7 años con escrófula, en el que 5 años más tarde se desarrolló una enfermedad de Crohn ileal. El segundo metaanálisis, recientemente publicado⁵³, englobó estudios que emplearon PCR y técnica de hibridación in situ. Se incluyeron un total de 49 estudios y nuevamente se observó mayor prevalencia de *M. avium paratuberculosis* en pacientes con enfermedad de Crohn que en los controles. Los autores concluyeron que los resultados demostraban, si bien no una relación etiológica, la existencia de una mayor presencia de *M. avium paratuberculosis* en pacientes con enfermedad de Crohn. Paralelamente, se han de resaltar 2 aspectos importantes de este estudio: el primero hace referencia a que se observó una mayor probabilidad de hallar aislamientos positivos con los estudios más recientes, lo que resalta la importancia del procesamiento de la muestra y de la sensibilidad de las técnicas; el segundo pone de manifiesto la ausencia de asociación entre la utilización de inmunosupresores y la probabilidad de aislamientos positivos.

Se han criticado todos estos datos obtenidos a partir de la técnica de PCR por el hecho de que los fragmentos de ADN aislados pueden proceder tanto de bacterias vivas como de restos de ellas. Por consiguiente, su detección puede no significar necesariamente infección. Para esclarecer esta cuestión, Ryan et al⁶⁸ diseñaron un estudio en el que aislaron granulomas procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn y de controles utilizando técnicas con láser que permiten realizar microdisecciones. De esta forma, la presencia de ADN en esta situación apoyaría su papel etiológico. Se halló ADN de *M. avium paratuberculosis* en el 40% de los pacientes con enfermedad de Crohn frente a ninguno de los controles. Sin embargo, se cuestionó la importancia de estos resultados cuando los mismos autores detectaron ADN de *Escherichia coli* en los mismos granulomas. Anteriormente, Mishina et al en 1996 habían detectado ácido ribonucleico de *M. avium paratuberculosis* en el 100% de los pacientes con enfermedad de Crohn y en el 50% de los controles, lo que implica la existencia de un metabolismo activo por parte de esta micobacteria en el momento en que se tomaron las muestras³².

Hibridación in situ

Las técnicas de hibridación in situ son muy útiles para detectar agentes infecciosos que no pueden ser visualizados

mediante procedimientos convencionales. En el caso particular de *M. avium paratuberculosis* y de la enfermedad de Crohn, esta micobacteria se presenta en forma paucibacilar y sin pared celular, lo que impide su visualización mediante las técnicas de auramina y de Ziehl-Nielsen en la mayoría de los casos⁴⁰. Con objeto de superar esta dificultad, Hulten et al desarrollaron una técnica que inicialmente ensayaron en animales⁶⁹ para posteriormente aplicarla en humanos. De esta forma, se consiguió detectar la presencia del ADN de *M. avium paratuberculosis* en el 40% de los pacientes con enfermedad de Crohn con granulomas y en ninguno de los controles⁷⁰. Posteriormente, Sechi et al visualizaron el ADN de *M. avium paratuberculosis* en más del 70% de las muestras de tejido intestinal procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn frente a ninguno de los controles⁷¹. Por último, hay que mencionar de nuevo el reciente metaanálisis realizado por Abubakar et al⁵³ en el que se observó una mayor presencia del ADN de *M. avium paratuberculosis* en pacientes con enfermedad de Crohn. En aquella publicación se hace referencia al hecho ya comentado de que algunos de los fragmentos de IS900 pueden confundirse con elementos similares a IS900 presentes en otras micobacterias del medioambiente, con el potencial riesgo de falsos positivos, y por consiguiente, de una menor fiabilidad de los resultados.

Serología

El hecho de no poder demostrar una respuesta inmune específica frente a *M. avium paratuberculosis* se consideraba una prueba más de la falta de pruebas de la teoría de la micobacteria. La dificultad para hallar anticuerpos específicos contra *M. avium paratuberculosis* estriba en que hay múltiples especies de micobacterias, las que comparten una gran cantidad de antígenos y, de esta manera, hay una respuesta cruzada²⁹. Esto puede explicar, al menos en parte, los resultados negativos de los estudios iniciales⁷²⁻⁷⁵.

Posteriormente se ha publicado otra serie de trabajos con una mayor especificidad frente a *M. avium paratuberculosis*, utilizando distintos antígenos. Los resultados de estos estudios han sido contradictorios, unos han demostrado la existencia de una mayor prevalencia de anticuerpos en pacientes con enfermedad de Crohn^{76,77}, mientras que otros no han encontrado diferencias^{78,79}. Entre los trabajos que encontraron una asociación positiva es de destacar el estudio realizado por Naser et al en 1999, en el que utilizaron anticuerpos contra las proteínas P35 y P36⁷⁶. Se definieron como positivos aquellos que presentaban inmunoglobulina G frente a ambos anticuerpos. Así, el 77% de los pacientes con enfermedad de Crohn dio positivo, comparado con el 12 y el 0% de los pacientes con colitis ulcerosa y de los controles, respectivamente. Por el contrario, un estudio realizado en 2004 por Bernstein et al utilizando anticuerpos dirigidos frente a otros antígenos, no encontró diferencias entre pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles⁷⁸. En este trabajo es de destacar el gran número de sujetos analizados (283 con enfermedad de Crohn, 144 con colitis ulcerosa y 402 voluntarios sanos). Finalmente, en 2007 se publicó el metaanálisis ya comentado de Feller et al, en el que se incluyen, entre otros, 10 estudios publicados entre 1995 y 2006 que utilizaban anticuerpos frente a

M. avium paratuberculosis con el fin de demostrar una asociación positiva entre enfermedad de Crohn y *M. avium paratuberculosis*. La *odds ratio* combinada fue de 1,72, con un intervalo de confianza del 95%, rango de 1,02 a 2,90⁶⁶.

A pesar de lo expuesto anteriormente, es importante tener en cuenta que la presencia de anticuerpos en la enfermedad de Johne se ha relacionado con brotes de ésta^{78,80}, mientras que en humanos se desconoce su significado. De esta manera, su presencia puede relacionarse con una exposición y no necesariamente con una infección. Esto ha llevado a algunos autores a sostener que la serología frente a *M. avium paratuberculosis* no es una prueba sólida para demostrar el papel de *M. avium paratuberculosis* en la etiopatogenia de la enfermedad de Crohn⁵³.

Respuesta al tratamiento antibiótico

La prueba más fiable para confirmar o rechazar la teoría de la micobacteria es posiblemente la respuesta al tratamiento antibiótico. El *M. avium paratuberculosis* es un microorganismo intracelular obligado, por lo que son necesarios antibióticos con capacidad de penetración en el interior de las células. Los estudios realizados in vitro han puesto de manifiesto que, al igual que otras micobacterias atípicas, presenta una gran resistencia a los fármacos antituberculosos clásicos^{29,39}. Estos mismos estudios demostraron la eficacia de los macrólidos y la rifabutina^{80,81}. Actualmente, aunque se desconoce cuál es el tratamiento de elección, se considera que se necesitan al menos 2 fármacos con actividad demostrada frente a *M. avium paratuberculosis* administrados durante un mínimo de 6 a 12 meses para que el tratamiento sea efectivo³⁹. En las próximas líneas se describirá cómo la mayoría de los estudios realizados no cumple tales premisas.

Se han publicado varios estudios^{82-90,92-95} y un metaanálisis⁹¹ con resultados nuevamente dispares (tabla 2). Elliot et al realizaron el primer trabajo en 1982 utilizando la combinación de sulfadoxina y pirimetamina en 51 pacientes con enfermedad de Crohn durante 12 meses⁸² y no apreciaron ningún beneficio. Posteriormente se sucedieron otra serie de estudios con resultados similares que hacían uso de pautas de tratamiento que diferían tanto en los fármacos utilizados (clofacimina; rifampicina y etambutol; rifampicina con isoniacida y etambutol; claritromicina y etambutol) como en el tiempo empleado (desde 3 meses a 2 años)⁸³⁻⁸⁷. Paralelamente, otros estudios sí demostraron un beneficio y, al igual que en los anteriores, las pautas de tratamiento fueron diferentes⁸⁸⁻⁹⁰. De esta manera, en 1994 Prantera et al realizaron un ensayo clínico doble ciego empleando una asociación de etambutol, clofacimina, dapsona y rifampicina durante 9 meses⁸⁸. Para esto, seleccionaron 40 pacientes con enfermedad de Crohn corticorretractaria, de los que 19 recibieron este régimen de antibióticos y el resto placebo. Los resultados demostraron que tanto la remisión como el mantenimiento de la enfermedad eran claramente superiores en el primer grupo. Resultados similares se obtuvieron al utilizar rifabutina junto con claritromicina o claritromicina sola^{89,90}. En el año 2000 se realizó un metaanálisis que evidenció que el tratamiento antibiótico puede ser beneficioso para mante-

ner la remisión alcanzada por los corticoides⁹¹. No obstante, dada la existencia de una enorme heterogeneidad entre los diferentes estudios, no se pudo obtener ninguna conclusión definitiva.

En 1994 Mor et al comprobaron la eficacia in vitro de la combinación de claritromicina y rifabutina frente a *M. avium*⁸¹. En los años siguientes se sucedieron 4 estudios en los que se utilizó como pauta antibiótica la combinación de estos 2 fármacos, y se añadió en 2 de ellos clofazamina y en el otro probióticos^{90,92-94}. Conjuntamente, los resultados de estos 4 estudios demostraron que más de la mitad de los pacientes con enfermedad activa podían responder a esta pauta antibiótica. Su principal problema residía en que un porcentaje no desdeñable de pacientes no tolera el tratamiento. Sin embargo, estos resultados prometedores se interpretaron con cautela, dado que ninguno de ellos se trataba de un ensayo clínico controlado y aleatorizado.

En este sentido, se pensaba que el trabajo realizado por Selby et al, denominado «ensayo australiano» por muchos autores, podía demostrar la eficacia de esta pauta terapéutica⁹⁵. Este estudio empleó la combinación de claritromicina (750 mg) junto con rifabutina (450 mg) y con clofazamina (50 mg). Se incluyó un total de 213 pacientes con enfermedad de Crohn activa, los que se dividieron en 2 grupos. Durante 16 semanas el grupo control recibió la pauta antibiótica junto con corticoides, mientras que el otro grupo recibió corticoides y placebo. Posteriormente, aquellos que entraron en remisión mantuvieron el mismo tratamiento durante 2 años, para luego seguirlo durante otro año más. Al revisar los resultados se observó un porcentaje de remisión a las 16 semanas significativamente superior en el grupo control (66 frente al 50%). Sin embargo, la diferencia en el porcentaje de recidiva de la enfermedad en el primer, segundo y tercer año fue similar en ambos grupos. Los autores de este ensayo concluyeron que estos resultados suponían un rechazo a la teoría de la micobacteria y achacaron el mayor porcentaje de remisión alcanzado en la primera parte del estudio al amplio espectro antimicrobiano de los fármacos utilizados.

Las interpretaciones de los resultados de este ensayo no tardaron en aparecer. De esta forma, algunos coincidían con las conclusiones de los autores⁷⁹, mientras que otros las refutaban⁹⁶⁻⁹⁸. Estos últimos se basaban en una serie de argumentos entre los que destacan los siguientes:

- 1) La utilización de dosis subóptimas de cada uno de los antibióticos invalida los resultados, ya que esto disminuye la eficacia y favorece la aparición de resistencias. Además, la clofacimina se administró en forma de pastilla con doble cápsula, lo que puede disminuir su absorción.
- 2) La ausencia de demostración de erradicación de *M. avium paratuberculosis* en los tejidos, disminuye la solidez de los resultados. Para evitar esta situación, se tendría que haber identificado a aquellos infectados con *M. avium paratuberculosis*, de tal manera que su erradicación y la persistencia de la actividad de la enfermedad hubiese dado más validez a las conclusiones.
- 3) El porcentaje de remisión alcanzado a las 16 y a las 52 semanas en el grupo tratado con antimicobacterianos (66 y 42%, respectivamente) se encuentra entre los porcentajes más altos conseguidos en comparación con

Tabla 2 Estudios que evalúan la eficacia de la terapia antimicobacteriana en la enfermedad de Crohn

Año de publicación	Autor y referencia	n	Tipo de estudio	Tratamiento antibiótico	Asociación de esteroides	Duración del estudio (meses)	Parámetros evaluados	Beneficio
1982	Elliott et al ⁸²	51	ECC	Sulfadoxina, pirimetamina, etambutol, rifampicina	No	12	CDAI	No
1984	Shaffer et al ⁸⁴	27	ECC	Etambutol, rifampicina	No	12	CDAI	No
1989	Basilisco et al ⁸⁷	24	ECC	Rifabutina	No	6	Índice de Harvey-Bradshaw	No
1991	Afdhal et al ⁸³	49	ECC	Clofacimina	Sí	12	CDAI	No
1994	Prantera et al ⁸⁸	40	ECC	Clofacimina, rifampicina	Sí	9	Remisión clínica y endoscópica	Sí
1994	Swift et al ⁸⁵	126	ECC	Etambutol, rifampicina, isoniacida	No	24	Índice de Harvey-Bradshaw, CDAI y necesidad de cirugía y cambios radiológicos	No
1995	Graham et al ⁸⁹	15	ECC	Claritromicina	No	12 (3 meses de tratamiento antibiótico)		Sí
1997	Gui et al ⁹⁰	46	Estudio abierto	Rifabutina, claritromicina (o azitromicina)	Sí	19	Índice de Harvey-Bradshaw, concentraciones séricas de PCR, necesidad de cirugía	Sí
1999	Goodgame et al ⁸⁶	31	ECC	Claritromicina, etambutol	No	12 (3 meses de etambutol)	Cambios en el test de manitol y lactulosa e índice de Harvey-Bradshaw	No
2000	Douglass et al ⁹²	20	Estudio piloto abierto	Rifabutina, claritromicina, clofazamina	Sí	6	ND	Sí
2000	Borgaonkar et al ⁹¹		Metaanálisis					Sí
2002	Shafran et al ⁹³	36	Estudio abierto	Claritromicina, rifabutina	No	4 a 17	CDAI	Sí
2002	Borody et al ⁹⁴	12	Estudio abierto	Claritromicina, rifabutina, clofazamina	Sí	24	Índice de Harvey-Bradshaw	Sí
2007	Selby et al ⁹⁵	213	ECC	Claritromicina, rifabutina, clofazamina	Sí	36 (2 años de tratamiento antibiótico)	Remisión clínica	No

ECC: ensayo clínico controlado; CDAI: *Crohn's Disease Activity Index* 'índice de actividad de la enfermedad de Crohn'; ND: no disponible; PCR: proteína C reactiva.

otros fármacos, lo que apoya su utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. A modo de ejemplo, el infliximab consigue una tasa de remisión inicial del 60%, mientras que sólo un 20% se mantiene inactivo al año.

Otras consideraciones

Para finalizar, es importante resaltar 3 aspectos de especial interés. El primero hace referencia a la relación existente entre el gen *NOD2/CARD15* y la enfermedad de Crohn. En los últimos años varios estudios han puesto de manifiesto la asociación entre determinadas mutaciones del gen *NOD2/CARD15* en personas de raza caucásica y la existencia de enfermedad de Crohn ileal con comportamiento estenosante⁹⁹⁻¹⁰¹. Este gen pertenece a la familia de las proteínas NOD (dominios de oligomerización de nucleótidos), las que, junto con los receptores de tipo Toll, constituyen las 2 familias de receptores de reconocimientos de patrones, es decir, aquellas que participan en la inmunidad innata mediante el reconocimiento de un número limitado de estructuras altamente conservadas en los microorganismos (peptidoglucano, lipopolisacárido, flagelina, etc.). Por consiguiente, son un pilar fundamental en la defensa del organismo frente a los patógenos. El ligando del *NOD2/CARD15* es el muramil dipéptido, un derivado de la pared bacteriana. Su unión da lugar a la activación del factor de transcripción NF- κ B y, en consecuencia, a la liberación de citocinas proinflamatorias que cumplen una función antibacteriana. En este sentido, se ha postulado que la existencia de mutaciones de este gen daría lugar a un aclaramiento defectuoso de *M. avium paratuberculosis*, favoreciendo su proliferación y, en última instancia, el desarrollo de la infección. Con objeto de confirmar esta teoría se han realizado diversos estudios que han intentado poner en evidencia un mayor aislamiento de *M. avium paratuberculosis* en pacientes con enfermedad de Crohn que sean portadores de estas mutaciones. No obstante, ninguno de ellos ha conseguido demostrar esta afirmación¹⁰²⁻¹⁰⁴.

El segundo tema de interés trata de uno de los argumentos principales en contra de la teoría de la micobacteria: la mejoría de la enfermedad con el tratamiento inmunosupresor. Hay suficientes pruebas de la reactivación de la enfermedad tuberculosa en pacientes con tratamiento anti-TNF (*tumor necrosis factor* 'factor de necrosis tumoral'), en algunos de los casos con consecuencias fatales. Al respecto, es importante tener en cuenta la ausencia de pruebas clínicas o experimentales que establezcan la existencia de una exacerbación de la infección por *M. avium paratuberculosis* en relación con el tratamiento anti-TNF. En este sentido, el número de casos clínicos que muestran el desarrollo de la infección por *M. avium paratuberculosis* en pacientes tratados con infliximab o etanercept es escaso, mientras que en otros pacientes de riesgo (por ejemplo, en infectados por virus de la inmunodeficiencia humana) es mucho mayor, lo que evidencia un papel menos relevante de la molécula TNF- α en la infección por *M. avium paratuberculosis*¹⁰⁵. Otro dato que apoya el diferente papel que lleva a cabo esta molécula en las infecciones humanas por micobacterias es el reciente caso en el que se utilizó infliximab para el tratamiento del

eritema nudoso recurrente secundario a *M. leprae*¹⁰⁶. Finalmente, 2 estudios han demostrado la eficacia de la azatioprina y la 6-mercaptopurina a la hora de inhibir el crecimiento de *M. avium paratuberculosis*^{107,108}.

El tercer y último tema hace referencia al hecho de si la teoría de la micobacteria se ajusta a los 4 postulados formulados por Robert Koch en el siglo XIX para establecer si la etiología de una determinada enfermedad es infecciosa. Son los siguientes:

1. El agente debe estar presente en cada caso de la enfermedad en las condiciones apropiadas y ausente en las personas sanas.
2. El agente debe ser aislado del cuerpo en un cultivo puro a partir de las lesiones de la enfermedad.
3. El agente debe provocar la enfermedad en un animal susceptible al ser inoculado.
4. El agente debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en los animales de experimentación.

Al analizar punto por punto estos postulados, se observa que la teoría de la micobacteria no cumple plenamente los 2 primeros enunciados, mientras que el cumplimiento de los 2 últimos se desconoce, dada la ausencia de estudios por evidentes razones éticas. Sobre la base de estas observaciones se puede afirmar que *M. avium paratuberculosis* no es el causante de la enfermedad de Crohn. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que los postulados de Koch presentan una elevada especificidad a expensas de una menor sensibilidad. De esta manera, los 2 primeros postulados exigen una alta sensibilidad de los procedimientos diagnósticos, algo que no siempre es posible, muy especialmente con microorganismos de difícil aislamiento, como en el caso del *M. avium paratuberculosis*. En este sentido, desde su enunciación se han descrito muchos patógenos causantes de enfermedades infecciosas que no cumplen todos los postulados. Por tanto, no se puede negar esta teoría alegando la ausencia del cumplimiento de estos enunciados.

Conclusiones

De todo lo anteriormente expuesto, se deduce que todavía no hay suficientes pruebas para atribuir un papel etiopatológico a *M. avium paratuberculosis* en la enfermedad de Crohn. Los diversos estudios realizados hasta la fecha ponen de manifiesto una mayor prevalencia de *M. avium paratuberculosis* en el intestino de pacientes con enfermedad de Crohn, aunque no son capaces de determinar qué tipo de relación se establece, pudiendo tratarse del factor causal o, por el contrario, de una mera colonización secundaria. En la [tabla 3](#), se muestra un resumen de todas las pruebas a favor y en contra de la teoría de la micobacteria. En el futuro, para conocer la verdadera naturaleza de esta relación se necesitarían nuevos estudios que profundicen en la patogenia de la infección por *M. avium paratuberculosis* y de la enfermedad de Crohn, así como nuevos ensayos clínicos que utilicen pautas de tratamiento con antibióticos, dosis y períodos de tiempo adecuados.

Tabla 3 Pruebas a favor y en contra de la teoría de la micobacteria como agente etiológico en la enfermedad de Crohn

A favor	En contra
<p>Similitud clínica e histológica entre la enfermedad de Crohn y la enfermedad de Johne</p> <p>Presencia de <i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i> en la cadena alimentaria y en los depósitos de agua</p> <p>Mayor presencia de <i>M. avium paratuberculosis</i> en los tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn detectada por técnicas de PCR, hibridación in situ y cultivos</p> <p>Hemocultivos positivos para <i>M. avium paratuberculosis</i> en pacientes con enfermedad de Crohn</p> <p>Detección de <i>M. avium paratuberculosis</i> en muestras de leche materna de mujeres con enfermedad de Crohn</p> <p>Mayor presencia de anticuerpos específicos contra <i>M. avium paratuberculosis</i> en pacientes con enfermedad de Crohn</p> <p>Desarrollo posterior de enfermedad de Crohn en un niño con escrófula en el que se detectó <i>M. avium paratuberculosis</i> en una adenopatía</p> <p>Respuesta a ciclos de tratamientos con claritromicina y rifabutina</p>	<p>Ausencia de prueba epidemiológica de transmisión de la infección en animales</p> <p>No hay pruebas de transmisión en el hombre en contacto con animales infectados</p> <p>Los genotipos aislados de <i>M. avium paratuberculosis</i> no son idénticos</p> <p>La enfermedad de Crohn no empeora con inmunosupresores o ante la infección por VIH</p> <p>No hay respuesta terapéutica evidente en el mayor ensayo clínico realizado con tratamientos antibióticos apropiados</p> <p>Detección de <i>M. avium paratuberculosis</i> en pacientes con colitis ulcerosa, voluntarios sanos o con otro tipo de enfermedad intestinal (p. ej. diverticulitis)</p>
<p>PCR: reacción en cadena de la polimerasa; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.</p>	

Agradecimiento

Los autores agradecen al profesor Emilio Bouza, jefe del Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas del Hospital Gregorio Marañón de Madrid por sus comentarios críticos sobre el manuscrito.

Bibliografía

- Balfour Sartor R. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134:577–94.
- Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007;117:514–21.
- Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis*. 2007;44:256–62.
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427–34.
- Sartor RB. Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3:390–407.
- Chamberlin WM, Naser SA. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease: Questioning the hypotheses. *Med Sci Monit*. 2006;12:RA27–33.
- Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S, D'Haens, Baert F, Noman M, et al. Ornidazole for prophylaxis of postoperative Crohn's disease recurrence: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2005;128:856–61.
- Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*. 1991;338:771–4.
- Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn's disease. *Nat Genet*. 2004;36:471–5.
- Stoll M, Corneliusen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2004;36:476–80.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599–603.
- De Maria R, Boirivant M, Cifone MG, Roncaioli P, Hahne M, Tschopp J, et al. Functional expression of Fas and Fas ligand on human gut lamina propria T lymphocytes. A potential role for the acidic sphingomyelinase pathway in normal immunoregulation. *J Clin Invest*. 1996;97:316–22.
- Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, et al. Peripheal and intestinal regulatory CD4+CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2005;128:1868–78.
- Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2001;108:601–9.
- Johne HA, Frothingham L. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Deutsche Zeitschr Tierm Pathol*. 1895;21:438–54.
- Chacon O, Bermudez LE, Barletta RG. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu Rev Microbiol*. 2004;58:329–63.
- Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol*. 1997;116:217–61.
- Buergelt CD, Hall C, McEntee K, Duncan JR. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol*. 1978;15:196–207.
- Dalziel TK. Chronic intestinal enteritis. *BMJ*. 1913;2:1068–9.
- Manning EJ, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot*. 2001;20:133–50.
- Beard PM, Henderson D, Daniels MJ. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). *Vet Rec*. 1999;145:612–3.
- Wells SJ, Ott SL, Garber LP. Johne's disease on US dairy operations: Results from the NAHMS dairy 96 study. *En*

- Chiodini RJ, Hines ME, Collins MT, editores. Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis 1996. Rehoboth, MA, EE. UU.: International Association for Paratuberculosis; 1996. p. 140–2.
23. Nielsen SS, Thamsborg SM, Houe H, Bitsch V. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev Vet Med.* 2000;44:1–7.
 24. Jubb TF, Galvin JW. Effect of a test and control program for bovine Johne's disease in Victorian dairy herds 1992–2002. *Aust Vet J.* 2004;82:228–32.
 25. Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Bey RF, Oakes MJ, Bentley DC, et al. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci.* 2004;87:2959–66.
 26. Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, Conrad TA, Thomas CB, Carr DJ. Herd prevalence, geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;204:636–41.
 27. Hermon-Taylor J. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis is a cause of Crohn's disease. *Gut.* 2001;49:755–60.
 28. Grant IR. *Mycobacterium paratuberculosis* and milk. *Acta Vet Scand.* 2003;44:261–6.
 29. Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz MR, Naser S, et al. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Alim Pharmocol Ther.* 2001;337–46.
 30. Ellingson JL, Anderson JL, Koziczowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, et al. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot.* 2005;68:966–72.
 31. Pickup RW, Rhodes G, Bull TJ, Arnott S, Sidi-Boumedine K, Hurley M, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: Diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:4067–77.
 32. Mishina D, Katsel P, Brown ST, Gilberts EC, Greenstein RJ. On the etiology of Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9816–20.
 33. Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T, et al. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:3446–52.
 34. Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3156–8.
 35. Lund BM, Gould GW, Rampling AM. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: A critical review of the data. *Int J Food Microbiol.* 2002;77:135–45.
 36. Naser SA, Schwartz D, Shafran I. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:1094–5.
 37. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer Jr WR, Couto JA. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* 1984;20:966–71.
 38. McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 1987;25:796–801.
 39. Chamberlin W, Naser SA. Integrating theories of the etiology of Crohn's Disease. On the etiology of Crohn's Disease: Questioning the hypotheses. *Med Sci Monit.* 2006;12:RA27–33.
 40. Schwartz D, Shafran I, Romero C, Piroalli C, Biggerstaff J, Naser N, et al. Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in tissue from Crohn's disease patients. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6:1–6.
 41. Haagsma J, Mulder CJJ, Eger A. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from patients with Crohn's disease in The Netherlands. *Scand J Gastroenterol.* 1989;24:S158–68.
 42. Gitnick G, Collins J, Beaman B, Brooks D, Arthur M, Imaeda T, et al. Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1989;34:925–32.
 43. Graham DY, Markesich DC, Yoshimura HH. Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. *Gastroenterology.* 1987;92:436–42.
 44. Markesich DC, Graham DY, Yoshimura HH. Progress in culture and subculture of spheroplasts and fastidious acid bacilli isolated from intestinal tissues. *J Clin Microbiol.* 1988;26:1600–3.
 45. Coloe P, Wilks CR, Lightfoot D, Tosolini FA. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *Australian Journal of Microbiology.* 1986;7:188A.
 46. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet.* 2004;364:1039–44.
 47. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, et al. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2915–23.
 48. Sechi LA, Scanu AM, Mollicotti P, Cannas S, Mura M, Dettori G, et al. Detection and isolation of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in sardinia. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:1529–36.
 49. Green EP, Tizard ML, Moss MT, Thompson J, Winterbourne DJ, McFadden JJ, et al. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:9063–73.
 50. Hermon-Taylor J, Moss M, Tizard M, Malik Z, Sanderson J. Molecular biology of Crohn's disease mycobacteria. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1990;4:23–42.
 51. Englund S, Bolske G, Johansson KE. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;209:267–71.
 52. Bartos M, Hlozek P, Svastova P, Dvorska L, Bull T, Matlova L, et al. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *J Microbiol Methods.* 2006;64:333–45.
 53. Abubakar I, Myhill D, Aliyu SH, Hunter PR. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:401–10.
 54. Sanderson JD, Moss MT, Tizard ML, Hermon-Taylor J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut.* 1992;33:890–6.
 55. Dell'Isola B, Poyart C, Goulet O, Mougnot JF, Sadoun-Journo E, Brousse N, et al. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. *J Infect Dis.* 1994;169:449–51.
 56. Fidler HM, Thurrell W, Johnson NM, Rook GA, McFadden JJ. Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA associated with granulomatous tissue in Crohn's disease. *Gut.* 1994;35:506–10.
 57. Lisby G, Andersen J, Engbaek K, Binder V. *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's

- disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scand J Gastroenterol.* 1994;29:923–9.
58. McFadden J, Collins J, Beaman B, Arthur M, Gitnick G. Mycobacteria in Crohn's disease: DNA probes identify the wood pigeon strain of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* from human tissue. *J Clin Microbiol.* 1992;30:3070–3.
 59. Moss MT, Sanderson JD, Tizard ML, Hermon-Taylor J, El-Zaatari FA, Markesich DC, et al. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut.* 1992;33:1209–13.
 60. Murray A, Oliaro J, Schlup MM, Chadwick VS. Mycobacterium paratuberculosis and inflammatory bowel disease: Frequency distribution in serial colonoscopic biopsies using the polymerase chain reaction. *Microbios.* 1995;83:217–28.
 61. Ellingson J, Brees D, Cheville N. Absence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. *Clinical Medicine & Research.* 2003;1(3):217–26.
 62. Rosenberg WM, Bell JI, Jewell DP. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA cannot be detected in Crohn's disease tissues. *Gastroenterology.* 1991;100:A611.
 63. Rowbotham DS, Mapstone NP, Trejdosiewicz LK, Howdle PD, Quirke P. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut.* 1995;37:660–7.
 64. Wu SW, Pao CC, Chan J, Yen TS. Lack of mycobacterial DNA in Crohn's disease tissue. *Lancet.* 1991;337:174–5.
 65. Kanazawa K, Haga Y, Funakoshi O, Nakajima H, Munakata A, Yoshida Y. Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. *J Gastroenterol.* 1999;34:200–6.
 66. Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:607–13.
 67. Hermon-Taylor J, Barnes N, Clarke C, Finlayson C. Mycobacterium paratuberculosis cervical lymphadenitis, followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *Br Med J.* 1998;516:449–53.
 68. Ryan P, Bennett MW, Aarons S, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, et al. PCR detection of Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut.* 2002;51:665–70.
 69. Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HM, Naser SA, Collins MT, Graham DY, et al. Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by *in situ* hybridization. *J Microbiol Methods.* 2000;42:185–95.
 70. Hulten K, El-Zimaity HM, Karttunen TJ, Almashrawi A, Schwartz MR, Graham DY, et al. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by *in situ* hybridization. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:1529–35.
 71. Sechi LA, Mura M, Tanda F, Lissia A, Solinas A, Fadda G, et al. Identification of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by *in situ* hybridization. *J Clin Microbiology.* 2001;39:4514–7.
 72. Suenaga K, Yokoyama Y, Nishimori I, Sano S, Morita M, Okazaki K, et al. Serum antibodies to Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1999;44:1202–7.
 73. Cho SN, Brennan PJ, Yoshimura HH, Korelitz BI, Graham DY. Mycobacterial etiology of Crohn's disease: Serologic study using common mycobacterial antigens and a species-specific glycolipid antigen from Mycobacterium paratuberculosis. *Gut.* 1986;27:1353–6.
 74. Stainsby KJ, Lowes JR, Allan RN, Ibbotson JP. Antibodies to Mycobacterium paratuberculosis and nine species of environmental Mycobacteria in Crohn's disease and control subjects. *Gut.* 1993;34:371–4.
 75. Wayne LG, Hollander D, Anderson B, Sramek HA, Vadheim CM, Rotter JI. Immunoglobulin A (IgA) and IgG serum antibodies to mycobacterial antigens in Crohn's disease patients and their relatives. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2013–8.
 76. Naser S, Shafran I, El-Zaatari FAK. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Crohn's disease is serologically positive. *Clin Diag Lab Immunol.* 1999;6:282.
 77. Barta Z, Majaros L. Seroprevalence of Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004;42:5432–3.
 78. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Collins MT. Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar;42:1129–35.
 79. Collins MT, Lisby G, Moser C, Chicks D, Christensen S, Reichelderfer M, et al. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J Clin Microbiol.* 2000 Dec;38:4373–81.
 80. Rastogi N, Goh KS, Labrousse V. Activity of clarithromycin compared with those of other drugs against *Mycobacterium paratuberculosis* and further enhancement of its extracellular and intracellular activities by ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:2843–6.
 81. Mor N, Vanderkolk J, Mezo N, Heifets L. Effects of clarithromycin and rifabutin alone and in combination on intracellular and extracellular replication of *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:2738–42.
 82. Elliott PR, Burnham WR, Berghouse LM, Lennard-Jones JE, Langman MJ. Sulphadoxine-pyrimethamine therapy in Crohn's disease. *Digestion.* 1982;23:132–4.
 83. Afdhal NH, Long A, Lennon J, Crowe J, O'Donoghue DP. Controlled trial of antimycobacterial therapy in Crohn's disease. Clofazimine versus placebo. *Dig Dis Sci.* 1991;36:449–53.
 84. Shaffer JL, Hughes S, Linaker BD, Baker RD, Turnberg LA. Controlled trial of rifampicin and ethambutol in Crohn's disease. *Gut.* 1984;25:203–5.
 85. Swift GL, Srivastava ED, Stone R, Pullan RD, Newcombe RG, Rhodes J, et al. Controlled trial of anti-tuberculous chemotherapy for 2 years in Crohn's disease. *Gut.* 1994;35:363–8.
 86. Goodgame RW, Kimball K, Akram S, et al. Randomized controlled trial of clarithromycin and ethambutol in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1999;116:A725 [Abstract].
 87. Basilisco G, Ranzi T, Campanini MC, et al. A controlled trial of rifabutin in Crohn's disease. *Curr Ther Res.* 1989;46:245–50.
 88. Prantera C, Kohn A, Mangiarotti R, Andreoli A, Luzi C. Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: Results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen. *Am J Gastroenterol.* 1994;89:513–8.
 89. Graham DY, Al-Assi MT, Robinson M. Prolonged remission in Crohn's disease following therapy for *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Gastroenterology.* 1995;108:A826 [Abstract].
 90. Gui GP, Thomas PR, Tizard ML, Lake J, Sanderson JD, Hermon-Taylor J. Two-year outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39:393–400.
 91. Borgaonkar MR, Macintosh DG, Fardy JM. A meta-analysis of antimycobacterial therapy for Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:725–9.

92. Douglass A, Cann PA, Bramble MG. An open pilot study of antimicrobial therapy in patients with unresponsive Crohn's disease. *Gut*. 2000;46 Suppl. II: A11 [Abstract].
93. Shafran I, Kugler L, El-Zaatari FA, Naser SA, Sandoval J. Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease. *Dig Liver Dis*. 2002;34:22–8.
94. Borody TJ, Leis S, Warren EF, Surace R. Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy—approaching a cure? *Liver Dis*. 2002;34:29–38.
95. Selby W, Pavli P, Crotty B, Florin T, Radford-Smith G, Gibson P, et al. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2007;132:2313–9.
96. Lipton J, Barash D. Flawed Australian CD Study does not End MAP Controversy. *Gastroenterology*. 2007;133:1742.
97. Kuenstner J. The Australian Antibiotic Trial in Crohn's disease: Alternative conclusions from the same Study. *Gastroenterology*. 2007;133:1742–3.
98. Gitlin L, Biesecker J. Australian Crohn's Antibiotic Study opens new horizons. *Gastroenterology*. 2007;133:1743–4.
99. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of *NOD2* gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122:867–74.
100. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:854–66.
101. Sachar DB. Genomics and phenomics in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:1161–2.
102. Sechi LA, Gazouli M, Ikonomopoulos J, Lukas JC, Scanu AM, Ahmed N, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, genetic susceptibility to Crohn's disease, and sardinians: The way ahead. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;5275–7.
103. Bernstein CN, Wang MH, Sargent M, Brant SR, Collins MT. Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;968–71.
104. Mendoza Hernández JL, San Pedro Garrido A, Culebras López E, et al. Determinación de *Mycobacterium avium paratuberculosis* viable mediante cultivo de muestras sanguíneas en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y su relación con genes de susceptibilidad. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2008;100:4.
105. Behr MA, Kapur V. The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24:17–21.
106. Faber WR, Jensema AJ, Goldschmidt WF. Treatment of recurrent erythema nodosum leprosum with infliximab. *N Engl J Med*. 2006;355:739.
107. Greenstein RJ, Su L, Haroutunian V, Shahidi A, Brown ST. On the action of methotrexate and 6-mercaptopurine on *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. *PLoS ONE*. 2007 Ene 24;2:e161.
108. Shin SJ, Collins MT. Thiopurine drugs azathioprine and 6-mercaptopurine inhibit *Mycobacterium paratuberculosis* growth in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52:418–26.