



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
División de Estudios Profesionales

“Detección de *Mycobacterium avium* subsp.  
*paratuberculosis* mediante hibridación *in situ* en Secciones  
Intestinales de Rumiantes con Paratuberculosis y Humanos  
con Enfermedad de Crohn”

T E S I S

Que para obtener el título de  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

present a:

Lucía del Carmen Favila Humara



Asesor principal: Dr. Gilberto Chávez Gris  
Co-asesor: M. en C. Francisco Javier García Vázquez

México D.F., 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria**

A mi abuelo, el Sr. José Rafael Favila Rodríguez, quien falleció poco antes de que lograra este objetivo en mi carrera, por ser un ejemplo de vida y calidad humana. Te quiero mucho.

A mis padres por su amor incondicional, su apoyo y sus consejos, esperando algún día retribuirles todo lo que han hecho por mí.

A mi hermano Rafa por ser el mejor regalo que alguien puede tener.

A mis tíos Alma y José Luis, porque siempre han estado conmigo y porque soy muy afortunada al tener en ellos a unos segundos padres.

A mi novio Carlos, por su cariño e impulso para seguir adelante en la tesis y en la vida: Te amo.

A mis amigos: Erika, Gaby, Gustavo, Lilia, Lulú y Sonia. La primera que ha sido mi amiga desde la secundaria y que tiene la culpa de que yo haya estudiado Medicina Veterinaria. El resto forma parte del tesoro personal que adquirí en la Facultad.

## Agradecimientos

A mi asesor el Dr. Gilberto Chávez Gris por su amistad y enseñanza constante.

A mi co-asesor el M. en C. Francisco Javier por toda su ayuda y disposición para el trabajo, pero sobre todo por depositar su confianza en mí sin conocerme.

A mi jurado, los doctores Enrique Aburto Fernández, Rigoberto Hernández Castro y Germán Valero Elizondo, por todos sus comentarios que me permitieron enriquecer este trabajo.

Al Ht. Eduardo Farfán Morales por su valiosa colaboración y sus consejos para el desarrollo de las técnicas.

Al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial a los Ht. Guadalupe Juárez Jiménez y Luis Antonio Morales Arreola por el esmero en su trabajo y por muchos favores recibidos. Al fotógrafo Jaime Eugenio Córdova por su amable ayuda, así como a mis compañeros y amigos: Mirna, Luary, Montse, Isabel, Gisela, Miriam, Larissa, Lucía 1, Dr. Luis, Gerardo, Francisco, Félix, Mario y César, a quienes tuve la fortuna de conocer en mi estancia en ese departamento.

Al Laboratorio de Patología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría por permitirme realizar el trabajo dentro de sus instalaciones y por facilitarme el equipo indispensable para la elaboración de esta tesis.

A los doctores Luis Federico Uzcanga Domínguez y José María Remes Troche del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", por facilitar los casos clínicos de los pacientes con enfermedad de Crohn, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A los proyectos del PAPIIT que permitieron la adquisición de los reactivos empleados en esta tesis: IN221999-1 "*Estudio inmunopatológico y polimórfico de Map en animales y pacientes con enfermedad de Crohn*" e IN208203-2 "*Paratuberculosis: estudio seroepidemiológico, evaluación del impacto económico e identificación del polimorfismo genético de cepas de Map aisladas de bovinos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo*".

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 Antecedentes históricos de la paratuberculosis.....	4
1.2 Epizootiología .....	5
1.2.1 Paratuberculosis en México .....	6
1.3 Taxonomía y características de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .....	6
1.3.1 Morfología de las Colonias.....	7
1.3.2 IS900 .....	7
1.3.3 Distribución y resistencia en el ambiente .....	8
1.4 Hospedador .....	9
1.5 Transmisión .....	9
1.5.1 Infección prenatal.....	9
1.5.2 Infección postnatal .....	10
1.6 Signología .....	10
1.7 Lesiones .....	10
1.7.1 Lesiones Macroscópicas.....	10
1.7.2 Lesiones Microscópicas .....	11
1.8 Diagnóstico.....	12
1.8.1 De acuerdo a las lesiones macroscópicas y microscópicas .....	12
1.8.2 Con base en el reconocimiento de la respuesta inmune celular .....	13
1.8.3 Con base en el reconocimiento de la respuesta inmune humoral.....	13
1.8.4 Basado en la detección del agente etiológico .....	14
1.9 Antecedentes históricos de la enfermedad de Crohn .....	16
1.10 Enfermedad Inflamatoria Intestinal Idiopática .....	17
1.11 Epidemiología.....	18
1.11.1 Enfermedad de Crohn en México .....	19
1.12 Etiologías propuestas .....	19
1.12.3 Evidencias que vinculan a Map con la EC .....	22
1.13 Posible vía de transmisión a los humanos .....	24
1.14 Sintomatología.....	26
1.15 Lesiones .....	27
1.15.1 Lesiones Macroscópicas.....	27
1.15.2 Lesiones Microscópicas .....	28
1.16 Complicaciones intestinales .....	28
1.17 Manifestaciones extraintestinales .....	29
1.18 Diagnóstico.....	30
1.19 Diagnóstico diferencial .....	31
1.19.1 Enfermedades por agentes infecciosos intestinales .....	31
1.19.2 Enfermedades idiopáticas y síndromes .....	32
1.20 Fundamentación de la técnica de hibridación <i>in situ</i> .....	34

2. JUSTIFICACIÓN.....	36
3. OBJETIVO GENERAL.....	36
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. HIPÓTESIS.....	36
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
5.1 Origen y características de las muestras:.....	37
5.2 Estudio histopatológico y selección del área de prueba.....	37
5.3 Criterios de formación de grupos.....	37
5.4 Hibridación <i>in situ</i> .....	38
5.5 Prueba estadística.....	42
6. RESULTADOS.....	43
7. DISCUSIÓN.....	52
8. LISTA DE ABREVIATURAS.....	56
9. ÍNDICE DE FIGURAS.....	57
10. ÍNDICE DE CUADROS.....	57
11. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	58

## RESUMEN

FAVILA HUMARA, LUCÍA DEL CARMEN. "Detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante hibridación *in situ* en Secciones Intestinales de Rumiantes con Paratuberculosis y Humanos con Enfermedad de Crohn." Bajo la dirección del Dr. Gilberto Chávez Gris y M. en C. Francisco Javier García Vázquez.

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) es la bacteria responsable de la enteritis crónica que afecta principalmente a los rumiantes domésticos y salvajes conocida como paratuberculosis o enfermedad de Johne. Dependiendo de la especie animal afectada, la presentación clínica puede incluir diarrea y pérdida progresiva de peso que precede a la muerte. Map no está considerada como una bacteria patógena para el humano; a pesar de que se ha demostrado que es capaz de causar linfadenitis granulomatosa en un niño e infección generalizada en un hombre con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Asimismo, múltiples investigadores han relacionado a esta bacteria en la patogenia de la enfermedad de Crohn (EC), un padecimiento inflamatorio crónico e idiopático que afecta principalmente el tracto gastrointestinal. La evidencia que apoya la asociación de esta micobacteria con la EC incluye similitud de las lesiones macro y microscópicas, cultivo bacteriológico y pruebas de biología molecular. En el presente estudio se estandarizó la técnica de hibridación *in situ* en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina para detectar una fracción de la secuencia IS900, específica de Map, en muestras intestinales de rumiantes con paratuberculosis y humanos con EC. Por medio de esta técnica se apreció que el 100% de los casos de animales con presentación pluribacilar y 100% de aquellos con presentación paucibacilar; así como 100% de los pacientes con presentación granulomatosa de la EC y 37.5% con presentación no granulomatosa fueron positivos a Map. La reacción positiva se observó de manera granular en el citoplasma de macrófagos, células epitelioides y células gigantes en la mucosa y, principalmente, en la submucosa intestinal. Los resultados indican que este protocolo de hibridación *in situ* permite identificar tanto formas bacilares como esferoplastos de Map. La identificación de ADN específico de Map en relación a los sitios de lesión inflamatoria en los casos humanos sugiere que esta micobacteria es la responsable de la respuesta inmunológica observada; por lo tanto, coincide con varios trabajos que implican a Map en la patogenia de la EC. Este es el primer trabajo que vincula a esta micobacteria con cualquier caso patológico humano en México y, aunque

se trata de un estudio con un limitado número de pacientes, demuestra la exposición de la población mexicana a este agente infeccioso. Se considera necesario continuar la investigación con el fin de esclarecer la posible relación zoonótica entre estas dos enfermedades, de manera que se dimensione además de la relevancia económica y zoonosanitaria, la posible repercusión de la paratuberculosis en la salud pública.



## ABSTRACT

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is the bacterium that causes chronic enteritis; best known as paratuberculosis or Johne's disease in domestic and wild ruminants. Depending on species, clinical signs may include diarrhea and emaciation, followed by eventual death. Map is not classified as a human pathogen although it has been proved that it can cause granulomatous lymphadenitis in one child as well as generalized infection in an adult patient with HIV. Several research groups have linked Map to the pathogenesis of Crohn's disease (CD), a chronic and idiopathic illness that affects human gastrointestinal tract. Paratuberculosis and Crohn's disease share similar anatomical and histological alterations. Moreover, Map has been isolated and identified by molecular techniques from CD patient's intestinal samples. In this study we hybridized *in situ* Map's DNA in intestine from ruminants with paratuberculosis and humans with Crohn's disease. We detected Map in 100% of the animals with pluribacilar lesions and 100% of those with paucibacilar lesions as well as in 100% of the CD patients with granulomatous lesions and 37.5% of the ones with non-granulomatous lesions. The staining pattern was intracytoplasmic and granular in macrophages, epithelioid cells and Langhan's giant cells in the intestinal mucosa and submucosa. These results show that bacillary forms and spheroplasts of Map can be detected through hybridization *in situ*. The identification of Map specific DNA within inflammation sites suggests that this mycobacteria is responsible for the immune response we found. Therefore, these results support other studies that link Map to the pathogenesis of CD. This is the first report of Map in any human pathological case in Mexico and, in spite of the limited number of patients we worked with; it demonstrates that there is human exposure to this agent in our country. Further studies are needed in order to have a closer view of the possible zoonotic relation between paratuberculosis and Crohn's disease.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes históricos de la paratuberculosis

Es difícil precisar cuándo se realizaron las primeras descripciones de la paratuberculosis. Se sugiere que esto ocurrió en 1826, cuando Hurtle d'Arboval mencionó una enteritis crónica del ganado, entonces de etiología desconocida, que se asociaba con diarrea crónica y se caracterizaba por el engrosamiento de la mucosa intestinal. Sin embargo, el primer caso clínico conocido data de 1894 cuando los doctores Johne y Frothingham examinaron el estómago, intestinos y omento de una vaca con pérdida de peso y diarrea, la cual había resultado negativa a la prueba de tuberculina. Estos órganos fueron remitidos por el veterinario Herr Frederick Harnes a la Unidad de Patología de Dresden, Alemania. Johne y Frothingham observaron engrosamiento de la mucosa intestinal y aumento de tamaño de los linfonodos mesentéricos; histológicamente apreciaron abundante cantidad de infiltrado inflamatorio compuesto por células epitelioides y gigantes, así como gran cantidad de bacterias ácido alcohol resistentes que eran semejantes al bacilo tuberculoso. Johne y Frothingham intentaron, sin éxito, reproducir la enfermedad inoculando tejido infectado a cueros y concluyeron que la enfermedad era causada por el agente de la tuberculosis en aves (*Mycobacterium avium*); Asimismo, propusieron el nombre de "enteritis pseudotuberculosa" para la enfermedad en la vaca.<sup>1</sup> Posteriormente se propusieron nombres alternativos para esta enfermedad como: paralepra bovina, diarrea crónica bacilar, disentería crónica bacteriana del ganado y enteritis hipertrófica.<sup>2</sup> En la primera década de 1900, la "enteritis pseudotuberculosa" era bien reconocida como una enfermedad nueva y altamente distribuida. En 1906, el profesor Bernhard Bang realizó una minuciosa descripción de esta enfermedad y aseveró que se trataba de una enfermedad infecciosa distinta a la tuberculosis, por lo que sugirió que se denominara "enteritis crónica pseudotuberculosa bovina" o, preferiblemente, "paratuberculosis". En el Informe Anual de 1906, McFadden, director del Colegio Veterinario, acuñó el término "enfermedad de Johne" (EJ); desde entonces la mayoría de las publicaciones utilizan este epónimo o el término de paratuberculosis (pTb) cuando se refieren a este proceso.<sup>1</sup> En 1910, Bang observó que los animales con paratuberculosis respondían débilmente a la inyección intradérmica de antígenos preparados con *Mycobacterium bovis*, pero que respondían bien a la inoculación intradérmica con antígenos de *M. avium*. Con base a esta observación, propuso que la tuberculina aviar

podía ser utilizada en pruebas diagnósticas en animales con pTb. Esto fue confirmado por Male; de manera que antes de que se aislara este agente causal, los investigadores ya lo relacionaban con el bacilo de la tuberculosis de las aves aunque éste, a diferencia del de la paratuberculosis, si se lograba cultivar en el laboratorio.<sup>1</sup> En 1912, Twort e Ingram lograron aislar el bacilo de la EJ, cuando observó pequeñas colonias que crecían satelitalmente a grandes colonias contaminantes en cultivos viejos que pensaba desechar. Identificó a estas colonias grandes como *Mycobacterium phlei*. Entonces pensaron que *M. phlei* proveía de algún nutriente esencial, así es que incorporaron una preparación de *M. phlei* inactivado con calor, en el medio de cultivo y lograron aislar una nueva bacteria ácido alcohol. resistente a la que nombraron *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*.<sup>1, 3</sup> Posteriormente se observó que esta bacteria es capaz de infectar a otras especies, por lo que se propuso el nombre de *Mycobacterium johnei*. En 1923, la primera edición del Manual Bergey de Bacteriología Determinativa, nombró *Mycobacterium paratuberculosis* al agente de la EJ. En esa década se describieron los primeros casos de paratuberculosis en Asia y África. En los 30, se informó de la presencia de la enfermedad en Sudamérica y Asia. En los 40 se observó que la EJ no sólo afectaba a animales domésticos, sino también a fauna silvestre.<sup>1</sup> Una década después se reconocieron varias cepas de *M. paratuberculosis*, incluyendo algunas variantes pigmentadas y cepas que no crecen en medios de cultivo artificiales.<sup>1</sup> En 1989 Des Collins y McFadden, de manera independiente, descubrieron un elemento genético exclusivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; se trataba de una secuencia de nucleótidos del ADN cromosomal de la bacteria, la secuencia resultó ser una secuencia de inserción, a la que se designó IS900. Esta fue la primera secuencia de inserción descrita en una micobacteria.<sup>4</sup> La importancia de este descubrimiento radica en que permitió desarrollar herramientas genéticas para la detección de la bacteria sin recurrir al cultivo que al menos requiere de 12 a 16 semanas para su desarrollo.<sup>1, 5</sup> En 1990, la micobacteria causante de la enfermedad de Johne fue denominada *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map).<sup>6</sup>

## 1.2 Epizootiología

La paratuberculosis es una pandemia, se menciona que únicamente Suecia y algunas regiones de Australia son libres de la enfermedad. De acuerdo con estudios realizados por el Sistema Nacional de Monitoreo de la Salud Animal (*National Animal Health*

*Monitoring System, NAHMS*) de Estados Unidos en 1996, al menos el 20% de las explotaciones con ganado bovino productor de leche conviven con la enfermedad de Johne.<sup>7</sup> Aparentemente la prevalencia de esta enfermedad es menor en los hatos de ganado productor de carne en ese país, ya que sólo 7.9% de estas explotaciones presentaron la enfermedad durante el estudio realizado por el NAHMS en 1997.<sup>8</sup> Existe muy poca la información disponible para conocer la situación sanitaria de la infección en los rebaños ovinos y caprinos del mundo.

### 1.2.1 Paratuberculosis en México

La enfermedad de Johne o paratuberculosis se diagnosticó por primera vez en nuestro país en 1936 por Unzueta.<sup>10</sup> Desde entonces, se han realizado algunas publicaciones que evidencian la presencia de esta enfermedad en México<sup>11, 12</sup> e incluso se menciona que es una de las principales enfermedades de los ovinos adultos.<sup>13</sup> Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado la prevalencia e incidencia de la paratuberculosis en ningún sector pecuario de nuestro país.

### 1.3 Taxonomía y características de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

*Mycobacterium avium* se divide en tres subespecies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) y *M. avium* subsp. *silvaticum*. La designación de las subespecies se basa en estudios de hibridación ADN-ADN y análisis taxonómicos. *M. intracellulare* frecuentemente es incluido en el complejo *M. avium*; sin embargo, es una especie diferente.<sup>6</sup>

Las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente curvos de 1 a 10 µm, aerobios obligados, que no forman endosporas, ni cápsulas. En ocasiones presentan un crecimiento filamentoso del que pueden desprenderse formas bacilares o cocáceas. Se consideran Gram positivos aunque se tiñen mal con esta técnica. La pared micobacteriana consta de cuatro capas con 30-60% de lípidos entre los que se encuentran ceras, lipoarabinomano y ácidos micólicos; esta pared dificulta la penetración y eliminación de colorantes y es la que les confiere la propiedad de ácido alcohol resistencia. Las formas deficientes de pared celular (esferoplastos), por ende, no

son ácido alcohol resistentes.<sup>13</sup> La mayoría de las micobacterias producen dos tipos de sideróforos: las exoquelinas que se secretan extracelularmente y la micobactina que es un lípido complejo que se localiza en la membrana celular del microorganismo.<sup>14</sup> La micobactina y la exoquelina son sustancias quelantes del hierro, necesarias para el crecimiento intracelular y son responsables de la transferencia del hierro de la transferrina animal a la bacteria.<sup>14</sup>

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) es un bacilo curvo de 2  $\mu\text{m}$  por 0.5  $\mu\text{m}$ , de crecimiento lento que requiere de 8 a 12 semanas de incubación a 37 °C para el desarrollo de colonias visibles.<sup>14</sup> Anteriormente, la dependencia de Map a la micobactina se utilizó para diferenciarle fenotípicamente de otras micobacterias; actualmente se sabe que esta dependencia es común en algunas cepas de *M. avium*. A nivel molecular, se distingue por la presencia de múltiples copias de la secuencia de inserción IS900.<sup>6</sup>

### 1.3.1 Morfología de las Colonias

El tamaño, color y textura de las colonias de Map depende en parte del tipo de medio que se utilice para su cultivo. En medio agar de yema de huevo de Herrold, las colonias se aprecian pequeñas, ligeramente rugosas y de color blanco amarillento. En medio agar Middlebrook las colonias se observan rugosas, con la adición de Tween 80 la morfología colonial se vuelve lisa. Ocasionalmente se han observado colonias amarillentas en cultivos provenientes de ovinos.<sup>15</sup>

### 1.3.2 IS900

Los transposones son elementos de ADN que requieren de una transposasa para promover su propio movimiento de un lugar a otro dentro del genoma o secuencia de ADN; al hacer esto, provocan mutaciones por inserción. Algunas veces sólo una parte del transposón se mueve produciendo una inserción corta. Estos pequeños transposones se conocen como "secuencias de inserción" o IS y generalmente miden de 750 a 2000 pares de bases.<sup>16</sup>

La IS900 es la primer secuencia de inserción que se encontró en una micobacteria y es exclusiva de Map, se repite de 14 a 18 veces en su genoma y tiene un tamaño de 1451 pares de bases.<sup>17, 18</sup> La distribución de este elemento genético es idéntico en las 15

cepas de Map.<sup>18</sup> Se ha demostrado que la IS900 codifica para una proteína de 399 aminoácidos denominada *p43*. En la cadena opuesta el gen denominado *hed* (host expression-dependent) codifica una proteína de aproximadamente 55 kDa, cuya función se desconoce hasta ahora. La conservación en los sitios de inserción, así como la exclusividad de IS900 a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, sugieren que las inserciones de IS900 determinan su fenotipo al provocar una expresión diferenciada de los genes inmediatamente adyacentes.<sup>17</sup> Por lo tanto, la presencia de IS900 en Map posiblemente altere la patogenicidad del microorganismo.<sup>18</sup> Se ha sugerido que el gen de la IS900 o los productos que codifica se encuentran involucrados en la dependencia a micobactina y posiblemente al lento crecimiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Actualmente se estudian los locus de inserción de IS900, así como de los genes adyacentes con la finalidad de investigar su relación con la virulencia y variabilidad de cepas.<sup>17</sup> Las secuencias de inserción se usan comúnmente como marcadores genéticos para el diagnóstico y la diferenciación de especies micobacterianas; la presencia de múltiples copias de las IS incrementan la sensibilidad del diagnóstico.<sup>5</sup>

### 1.3.3 Distribución y resistencia en el ambiente

Map es una bacteria incapaz de reproducirse en el ambiente, debido a su inhabilidad para producir micobactina. Por lo tanto, sólo puede crecer y reproducirse dentro de las células animales (principalmente en los macrófagos) donde adquiere el hierro que necesita. Sin embargo, puede persistir en la tierra y agua contaminada con heces de animales infectados.<sup>19</sup> Collins *et al*<sup>20</sup> demostraron que al inocular agua destilada (pH 7.2) con 10<sup>6</sup> micobacterias/ml, es posible aislar micobacterias viables hasta 485 días después. Se han llevado a cabo varios estudios para conocer la capacidad de la bacteria para sobrevivir en las heces de bovinos infectados, bajo condiciones de congelación, sequía, exposición a la luz solar, cambios en la temperatura ambiental y lluvia, en los que se ha observado que Map es capaz de sobrevivir en el medio ambiente por 152-246 días, dependiendo de las condiciones.<sup>21</sup> Se ha observado que factores como falta de humedad, exposición a la luz del sol, pH superior a 7.0 y bajo contenido de hierro en el suelo pueden disminuir la supervivencia de la bacteria en la tierra. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios de laboratorio que expliquen el mecanismo por el cual las características del suelo pueden afectar la supervivencia de Map.<sup>21</sup>

## **1.4 Hospedador**

Map es capaz de infectar a una amplia gama de rumiantes, entre los que se incluye: bovinos, caprinos, ovinos, ciervos, antílopes, bisontes, camellos, llamas y alpacas. Aunque con menor frecuencia, también afecta a equinos, suinos, pollos, conejos, primates no humanos y humanos.<sup>22</sup> Un estudio realizado en Escocia en el 2003, demostró que Map es capaz de infectar, de manera natural, a una amplia gama de especies silvestres. Esta micobacteria se ha aislado a partir de intestino y linfonodos mesentéricos de zorro, armiño, comadreja, cuervo, grajo, chova, rata, ratón de campo, liebre y tejón; de los cuales el zorro, armiño, comadreja, cuervo y ratón de campo presentaban lesiones histológicas consistentes con la infección por Map.<sup>23</sup>

## **1.5 Transmisión**

El ganado infectado con paratuberculosis elimina a través de sus heces un gran número de bacterias. Whittington<sup>24</sup> determinó un promedio de excreción en heces por oveja de  $8.36 \times 10^{10}$  bacilos viables de Map. El autor estima que esta cantidad de micobacterias sería suficiente para infectar 80 millones de ovejas. Las vacas con una carga bacteriana alta pueden eliminar a través de las heces  $10 \times 10^7$  micobacterias por gramo de heces. Las vacas con una importante excreción en heces, también eliminan esta micobacteria en su leche a una concentración de 1-2 ufc/10ml de leche.<sup>25</sup> Map también ha sido aislado a partir de endometrio, cotiledones y fetos, por lo tanto, es posible que los productos del parto contribuyan a la contaminación del ambiente.<sup>22</sup>

### **1.5.1 Infección prenatal**

La infección congénita con paratuberculosis fue observada por primera vez por Alexejeff-Goleff en 1929.<sup>22</sup> Posteriormente, varios investigadores han logrado aislar Map a partir de cotiledones, fetos y mucosa uterina de vacas con enfermedad de Johne e incluso en fetos de vacas con paratuberculosis subclínica.<sup>22</sup> De acuerdo con Seitz *et al*<sup>26</sup> el riesgo de infección fetal con esta micobacteria es de 26.4% y con base en un estudio de Sweeney *et al*<sup>27</sup> en 1992, los fetos infectados provienen de vacas con alta excreción en heces. De igual forma, Map se ha aislado a partir de los órganos reproductivos de toros y se ha observado que esta micobacteria en el semen resiste la adición de antibióticos y el

congelamiento, de manera que el semen de animales con excreción activa o semen contaminado durante la recolección puede ser la fuente de infección para las hembras.<sup>22</sup> El semen infectado puede contribuir a la asociación de Map al nuevo cigoto en la etapa temprana del desarrollo embrionario provocando la infección del feto.<sup>22</sup>

### **1.5.2 Infección postnatal**

Los animales se infectan siendo muy jóvenes por medio de la ingestión de calostro y/o leche de vacas con eliminación activa y/o contaminación fecal de la ubre. Las crías de madres libres de paratuberculosis pueden infectarse al ingerir pastura, alimento o agua contaminados con Map.<sup>22</sup>

## **1.6 Signología**

En el ganado bovino los signos clínicos se manifiestan principalmente en animales mayores de 2 años de edad, la enfermedad se caracteriza por diarrea crónica e intermitente que no responde al tratamiento médico, así como edema submaxilar, ascitis, pérdida de color del manto de pelo, emaciación y muerte.<sup>22</sup> En ovinos y caprinos, las manifestaciones clínicas se pueden observar en animales menores de 2 años,<sup>22</sup> en estos animales el principal signo de enfermedad es la pérdida progresiva de peso.<sup>28, 29</sup> De acuerdo con Stehman<sup>29</sup> sólo el 10-20% de estos animales presentan diarrea en la fase final de la enfermedad. En el caso de rumiantes salvajes, como los camélidos sudamericanos y venados, los signos clínicos se observan comúnmente en animales de 8 a 12 meses de edad, estos animales pueden llegar a presentar diarrea profusa que provoca su muerte en 2 semanas.<sup>29</sup>

## **1.7 Lesiones**

### **1.7.1 Lesiones Macroscópicas**

Las lesiones macroscópicas de la pTb consisten en engrosamiento de la pared intestinal hasta tres o cuatro veces de su grosor normal, mucosa corrugada de apariencia granular, sufusiones en la mucosa intestinal, engrosamiento de los vasos linfáticos de la serosa, linfonodos moderadamente aumentados de tamaño y edematosos con poca diferenciación corticomedular, necrosis focal y mineralización de los linfonodos



mesentéricos e ileocecales puede presentarse en todas las especies, pero con mayor frecuencia ocurre en el venado.<sup>22, 29</sup> No se observan úlceras ni discontinuidad de la superficie de la mucosa. En los ovinos, las lesiones macroscópicas suelen ser leves, el engrosamiento de la mucosa así como la apariencia corrugada frecuentemente no son observados; en algunos casos, puede apreciarse una coloración amarillenta o anaranjada en el intestino debido al pigmento de estas cepas de Map.<sup>30, 31</sup> También pueden distinguirse granulomas en la superficie hepática de color amarillo anaranjado, forma irregular y distribución multifocal.<sup>29, 30</sup> En las cabras y algunos ovinos, se pueden apreciar focos de calcificación en mucosa, submucosa, serosa, vasos linfáticos del intestino y linfonodos regionales.<sup>22</sup> Las placas de calcificación en aorta son hallazgos ocasionales considerados como lesión característica de la pTb en cabras y bovinos. La ausencia de lesiones intestinales macroscópicas es un hallazgo común de la paratuberculosis en cabras.<sup>33</sup>

### 1.7.2 Lesiones Microscópicas

Microscópicamente es posible observar inflamación transmural con agregados linfoides en todas las capas del intestino, granulomas con células multinucleares gigantes, neutrófilos, eosinófilos y área necrótica central.

En 1996 Pérez *et al*<sup>32</sup> estudiaron un grupo de ovinos con EJ y propusieron clasificar sus lesiones de acuerdo a la presencia de lesiones granulomatosas, localización de los granulomas en las diferentes capas del intestino, intensidad y distribución de las lesiones, tipos celulares presentes en el infiltrado, así como presencia y cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes.

La lesión tipo 1 se caracteriza por la presencia de pequeños granulomas localizados exclusivamente en los espacios interfoliculares de las placas de Peyer. En este tipo de lesión no se presentan lesiones macroscópicas, ni bacilos ácido alcohol resistentes.<sup>32</sup>

La lesión tipo 2 es más grave que la anterior. En ésta, se observan lesiones granulomatosas focales, localizadas en las placas de Peyer, así como en la mucosa relacionada con las mismas. No se detectan micobacterias en los granulomas, ni lesiones macroscópicas.<sup>32</sup>

Las lesiones tipo 3 afectan tanto a las placas de Peyer, a la mucosa asociada y no asociada con tejido linfoide. Se distinguen tres subtipos.

Subtipo 3a: Las lesiones se asemejan al tipo 2; aunque los granulomas se localizan en la mucosa no asociada a las placas de Peyer. En este caso se distinguen micobacterias dentro de los granulomas. En algunos animales se observa un discreto engrosamiento de los vasos linfáticos.<sup>32</sup>

Subtipo 3b: Este tipo se caracteriza por una enteritis granulomatosa difusa conformada por abundantes macrófagos en la mucosa que provocan su alteración. Se detecta una abundante cantidad de micobacterias. La linfangitis y linfangiectasia se observan tanto a nivel microscópico como a nivel macroscópico. En todos los casos la pared intestinal aparece engrosada y la mucosa se aprecia corrugada, particularmente el íleon.<sup>32</sup> Este subtipo también se conoce como forma lepromatosa.

Subtipo 3c: Se observa enteritis granulomatosa difusa con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por abundante cantidad de linfocitos y células gigantes. No se detectan micobacterias o bien en pequeñas cantidades. Las lesiones macroscópicas son similares al tipo 3b.<sup>32</sup> Este subtipo se considera la forma tuberculosa de la enfermedad.

Corpa *et al*,<sup>33</sup> estudiaron los tipos de lesiones de la paratuberculosis en cabras y concluyeron que la clasificación propuesta por Pérez *et al* es válida también para los caprinos. Mencionan que los tipos 1 y 2 fueron observados únicamente en una pequeña proporción de los animales estudiados y sugieren que las lesiones focales representan lesiones latentes y persistentes que se originaron cuando el animal era joven, pero que fueron exitosamente limitadas por la respuesta inmunológica. En ovinos, este tipo de lesión ha sido asociado con altas concentraciones de interferón gamma (IFN  $\gamma$ ), un indicador de la respuesta inmune celular que se considera esencial en la respuesta a infecciones micobacterianas.

## **1.8 Diagnóstico**

### **1.8.1 De acuerdo a las lesiones macroscópicas y microscópicas**

La observación de estas lesiones tiene una gran utilidad diagnóstica en los animales muertos. Sin embargo, existen casos con lesiones mínimas incluso en animales con presentación clínica grave.<sup>33</sup> De acuerdo con Buergelt y Ginn,<sup>34</sup> la enfermedad de Johne se puede detectar en los animales vivos, por medio del estudio histopatológico de biopsias de intestino y/o linfonodos mesentéricos, el diagnóstico se basa en la

observación de cambios inflamatorios y bacilos ácido alcohol resistentes compatibles con Map. Los cambios celulares esperados incluyen agregados de macrófagos epitelioides, así como células gigantes tipo Langhans que pueden estar fagocitando bacterias. Hasta la fecha no se ha evaluado la especificidad y sensibilidad de la biopsia como herramienta de diagnóstico, además implica la realización de laparotomía que es costosa; sin embargo, podría ser una herramienta a considerar en el diagnóstico de la paratuberculosis en rumiantes silvestres. Además, el tejido de la biopsia puede ser utilizado también para estudios de inmunohistoquímica, cultivo y pruebas de patología molecular.<sup>34</sup>

### 1.8.2 Con base en el reconocimiento de la respuesta inmune celular

Las pruebas diagnósticas basadas en la detección de una respuesta inmune mediada por linfocitos T, permiten la detección temprana de animales infectados.

**Intradermorreacción (IDR):** Se realiza inoculando intradérmicamente extractos proteicos, obtenidos a partir de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* o bien de *M. avium*. La lectura se realiza en las siguientes 48-72 horas y consiste en medir el grosor de la piel en el sitio de inoculación,<sup>35</sup> generalmente un incremento mayor a 4 mm en el sitio de inyección es considerado como positivo.<sup>22</sup> Pavlik *et al*<sup>28</sup> demostraron la baja sensibilidad y especificidad de esta prueba, al encontrar que la IDR solamente identificó al 20-30.4% del ganado infectado, además de que al ser aplicada en animales sanos detectó 26.7-34.4% de falsos positivos.<sup>28</sup>

**Interferón gama (IFN $\gamma$ ):** Se realiza estimulando a los linfocitos sanguíneos con derivados proteicos purificados (PPD); después de la estimulación antigénica, los linfocitos T de los animales que han sido infectados liberan cantidad significantes de IFN $\gamma$ . La cuantificación de este interferón se realiza mediante un ELISA.<sup>36, 37</sup> De acuerdo con Stewart *et al*,<sup>38</sup> la prueba de IFN $\gamma$  tiene alta sensibilidad (52-69%) y una especificidad mayor al 98%.

### 1.8.3 Con base en el reconocimiento de la respuesta inmune humoral

En las etapas tardías de la enfermedad la respuesta inmune humoral se incrementa, por lo que permite el uso de pruebas que tienen como fin la detección de anticuerpos. Las pruebas más usadas son:

**Inmunodifusión en gel agar (IDGA):** Es una técnica rápida y barata que se ha generalizado en los últimos años. De acuerdo con Hope *et al*,<sup>39</sup> esta es una prueba altamente específica (99-100%), cuya sensibilidad es de 36-56%. La sensibilidad es

mayor en animales con estadios avanzados de la enfermedad, cuando los signos clínicos son evidentes.<sup>22</sup>

**Inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA):** El antígeno más frecuentemente empleado en la prueba de ELISA es la johnina o PPD. La especificidad de esta prueba se incrementa notoriamente con la preadsorción de los sueros problemáticos con *M. phlei*, eliminando así gran parte de las reacciones cruzadas.<sup>22</sup> De acuerdo con Hope *et al*,<sup>39</sup> la especificidad de la ELISA es de 98.2-99.5%, mientras que la sensibilidad es de 35-54%, se menciona que la sensibilidad de la prueba disminuye a 15% cuando se analizan casos subclínicos.<sup>22</sup>

#### 1.8.4 Basado en la detección del agente etiológico

**Frotis:** La identificación microscópica en frotis teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) es considerada una técnica de diagnóstico sencilla y rápida. La micobacteria puede ser detectada a partir de muestras de heces, mucosa intestinal o linfonodos. Sin embargo, esta tinción solamente identifica la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes y, por lo tanto, no distingue entre especies micobacterianas y otros géneros bacterianos ácido alcohol resistentes.<sup>35</sup> La sensibilidad de esta prueba en frotis de heces es muy baja, alrededor del 18%.<sup>40</sup> De la misma manera, la sensibilidad en improntas de intestino es baja ya que se requieren  $1 \times 10^6$  bacterias/g de tejido para la detección de bacilos ácido alcohol resistentes en el microscopio óptico.<sup>41</sup>

**Aislamiento:** El aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a partir de heces y/o de tejido, es la prueba diagnóstica definitiva ya que se considera que posee una especificidad absoluta<sup>35, 42, 43</sup> para esto se requiere demostrar la dependencia del cultivo a la micobactina, así como verificar la morfología de las colonias y la afinidad tintorial de los microorganismos.<sup>42</sup> De acuerdo con Whitlock *et al*,<sup>42</sup> la sensibilidad del aislamiento bacteriológico a partir de muestras de heces es del 33%.

El cultivo estándar se ha utilizado por casi 100 años; al tratarse de una bacteria de crecimiento lento el desarrollo de colonias visibles puede requerir de 12 a 16 semanas.<sup>41</sup> Una desventaja de este método es que algunas cepas de Map, principalmente las de tipo ovino, pueden no crecer en medios de cultivo típicos.<sup>15</sup> Para evitar el desarrollo de microorganismos de crecimiento rápido, se requiere la descontaminación de las muestras antes del aislamiento. Los medios de cultivo utilizados más habitualmente son medios a

base de huevo como el Herrold o el Löwenstein-Jensen. Otros medios usados son el Dubos a base de suero, las diferentes variantes del medio Middlebrook o el Watson-Reid. La incubación debe realizarse en condiciones tales que se aporten los nutrientes y factores de crecimiento necesarios (micobactina) durante el largo periodo en que permanecen a 37°C.<sup>15</sup>

El cultivo radiométrico o Bactec es un sistema comercial de detección de micobacterias. La base de este sistema es el crecimiento de la micobacteria en un medio de cultivo líquido que contiene ácido palmítico marcado con un radioisótopo. Las micobacterias crecen y metabolizan el ácido palmítico liberando dióxido de carbono radiomarcado. Un instrumento llamado BACTEC 460 mide la cantidad de dióxido de carbono en cada medio de cultivo sellado e indica si ha ocurrido crecimiento bacteriano. La principal ventaja de este sistema es que puede detectar concentraciones bajas de micobacterias y lo hace más rápido que los métodos de cultivo tradicionales (7 semanas).<sup>22</sup> Además, permite el crecimiento de cepas de Map de varias especies, incluyendo las de ovinos. Las desventajas de este método de cultivo incluyen el incremento del costo, además de que requiere un instrumento de lectura, involucra el manejo de radioisótopos y no puede identificar qué especie de micobacteria es la que contiene la muestra.<sup>22</sup>

El aislamiento de Map es un procedimiento largo que requiere una gran inversión de tiempo. Actualmente, la identificación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* puede ser realizada de una forma muy rápida, sensible y específica a través de la identificación de marcadores genéticos. El descubrimiento de la secuencia de inserción IS900, ha proporcionado una excelente herramienta para la identificación de esta especie.<sup>5</sup>

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Es una técnica rápida, al emplear la secuencia de inserción IS900 es una prueba 100% específica. Sin embargo, la presencia de inhibidores de PCR provoca que la sensibilidad de la prueba varíe notablemente con el procesamiento y tipo de muestra. La concentración de la micobacteria y la posterior extracción del ADN son pasos que deben ser optimizados al máximo para incrementar la sensibilidad de la técnica. En un estudio realizado por Mason *et al*,<sup>40</sup> se observó que la PCR inmunomagnético (PCR-IMS) realizado en muestras fecales tiene una sensibilidad de 53%.

Existen otras técnicas de biología molecular que han sido escasamente utilizadas a nivel experimental en el diagnóstico de la paratuberculosis, como son la inmunohistoquímica<sup>43</sup> y la hibridación *in situ*.<sup>44</sup>

### 1.9 Antecedentes históricos de la enfermedad de Crohn

A pesar de que las primeras descripciones de la enfermedad de Crohn datan de los años 1600 y 1700, es difícil distinguirlos de una serie de desórdenes intestinales indefinidos.<sup>45</sup> La enfermedad de Crohn se relacionó durante años con la tuberculosis aunque no se pudieron observar o cultivar bacilos ácido alcohol resistentes y no había los característicos nódulos caseosos de la tuberculosis. Para 1913 los casos de “tuberculosis intestinal” que no tenían el patrón clásico se clasificaron como “tuberculosis hiperplástica”.<sup>45</sup> En 1920, se les denominó granulomas inespecíficos o granulomas benignos.<sup>3</sup> La primera relación entre la EJ y la EC fue en 1913 cuando Dalziel<sup>46</sup> describió varios casos de enteritis crónica en humanos que se parecían a la “pseudotuberculosis” del ganado recientemente descrita y propuso que se trataba de la misma enfermedad, distinguió también que en los casos humanos no se observaban bacilos. En 1932, Crohn, Ginsberg y Oppenheimer describieron por primera vez la signología clínica y las lesiones de 14 pacientes con una entidad a la que denominaron “ileitis regional”, ésta consistía en inflamación subaguda o crónica del íleon terminal, úlceras, estenosis, fístulas y granulomas.<sup>48</sup> Desde la primera descripción los autores notaron la gran semejanza de la “ileitis regional” con la tuberculosis intestinal, de manera que intentaron demostrar, sin éxito, la presencia del bacilo tuberculoso por medio de cultivo bacteriano en medio de Löwenstein y la inoculación experimental de cuyos, conejos y pollos con macerado de mesenterio e intestino.<sup>48</sup> En 1934, Colp<sup>49</sup> anunció un caso en el que el proceso inflamatorio se extendía más allá de la válvula ileocecal involucrando el ciego y el colon ascendente, se trataba del primer caso publicado de ileocolitis. En años posteriores, se identificó la enfermedad en otras partes del tracto gastrointestinal. En 1950, Armitage y Wilson<sup>50</sup> publicaron un estudio con 34 casos y observaron que en la literatura se empleaban términos como granuloma inespecífico, ileitis regional, enteritis regional, enterocolitis regional y enteritis cicatrizante para designar a un mismo proceso, por lo que afirmaron que era preferible el empleo del término “enfermedad de Crohn”.

En la primera mitad del siglo XX, se publicaron algunos casos clínicos de enteritis regional en México, de manera que en 1952 se llevó a cabo el primer simposio sobre "enteritis regional" en nuestro país.<sup>51</sup> En ese mismo año van Patter intentó cultivar micobacterias a partir de tejido intestinal de 43 pacientes con enfermedad de Crohn, logró aislar formas bacilares en 3 (7%) de las muestras.<sup>3</sup> En 1978 Burnham *et al* aislaron *Mycobacterium kansasii* a partir de linfonodos de 22 de 27 pacientes con EC, 13 CU y 1/11 controles. Ellos propusieron que la forma celular deficiente de pared celular (esferoplastos) de *M. kansasii* era el agente etiológico de las enfermedades inflamatorias intestinales inespecíficas.<sup>3</sup> En 1984, Chiodini *et al*<sup>83</sup> anunciaron el primer aislamiento de Map a partir de 3 muestras intestinales de pacientes con EC y en ninguno de los controles que incluían pacientes con colitis ulcerosa y otras enfermedades intestinales; a partir de ese momento se abrió una línea de investigación para determinar si esta micobacteria es el agente etiológico de la EC o es sólo un agente oportunista.<sup>41, 52</sup>

En años recientes, varios investigadores han buscado evidencia de la relación entre las micobacterias y la enfermedad de Crohn, para ello se ha empleado cultivo bacteriológico, modelos de infección experimental, tratamiento antimicobacteriano, pruebas serológicas, así como técnicas de biología molecular.<sup>3, 53</sup>

### **1.10 Enfermedad Inflamatoria Intestinal Idiopática**

Se conoce también como IBD, por las siglas en inglés de "*inflammatory bowel disease*", es un término genérico que incluye a la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), que se describen como dos entidades distintas que tienen en común el hecho de ser procesos inflamatorios crónicos, recidivantes y de etiología desconocida. La hipótesis más aceptada es que la enfermedad inflamatoria intestinal comprende un grupo heterogéneo de enfermedades con manifestaciones clínicas y patológicas similares. Al considerarse la IBD como un síndrome se acepta que diversos factores genéticos y ambientales están implicados en su patogénesis.<sup>54, 55</sup> Es importante destacar que la colitis ulcerosa es considerada como el principal diagnóstico diferencial de los pacientes con EC con afectación colónica, además de que muchos estudios incluyen a los pacientes con CU como el grupo testigo negativo.

## 1.11 Epidemiología

La enfermedad de Crohn se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Sin embargo, algunos autores mencionan que es más común en los países del norte u oeste, que en los países del este y/o sur.<sup>56, 57</sup> De manera que se considera una enfermedad poco frecuente en países de Asia, África y Sudamérica.<sup>56</sup> Sin embargo, publicaciones recientes ponen de manifiesto que la enfermedad de Crohn es frecuente en Brasil, donde se publicaron los resultados de un estudio realizado entre 1980 y 1999 en el que se aprecia que la incidencia de la enfermedad ha incrementado en los últimos 20 años de 17 a 31 casos por cada 10,000 ingresos al Hospital Universitario de Brasil.<sup>58</sup>

Un estudio realizado en Olmsted, Minnesota entre 1940 y 1993 notificó una incidencia de 5.8 por 100,000 habitantes, es decir, alrededor de 146,000 personas, así como una prevalencia de 133 por 100,000 habitantes lo que da un total de 292,600 pacientes con EC en 1991, estas cifras indican un incremento mayor al 46% con respecto a 1980 en Estados Unidos.<sup>59</sup> Los estudios acerca de la incidencia de la EC revelan un incremento global en la presentación de casos entre 1960 y 1987.<sup>60</sup> En parte, este notable incremento en la incidencia se puede deber al mejor reconocimiento del padecimiento por parte de los médicos y al uso de la laparoscopia.<sup>56, 58</sup>

En algunos estudios se menciona que la población judía es altamente susceptible a desarrollar la enfermedad; sin embargo, la prevalencia en esta población es similar a la de la sociedad en la que viven.<sup>56, 57</sup> Estudios de la incidencia de la EC revelan que las poblaciones que emigran hacia áreas geográficas de alto riesgo presentan una tasa de incidencia similar a la de la población nativa, lo que sugiere que los factores ambientales influyen en la incidencia de la presentación de la EC en todas las razas.<sup>56</sup>

La manifestación de los primeros signos de enfermedad generalmente ocurre en personas entre los 15 y 30 años de edad, aunque se presenta un segundo pico entre personas de 60 a 80 años.<sup>56</sup> Los estudios epidemiológicos de la EC alrededor del mundo consistentemente indican que existe una mayor incidencia de esta enfermedad en mujeres que en hombres en una proporción de 1.1 a 1.8:1.<sup>56</sup>



### 1.11.1 Enfermedad de Crohn en México

En nuestro país se han descrito pocos casos clínicos de la enfermedad de Crohn y existe la impresión de que es una enfermedad extremadamente rara. Pérez *et al*<sup>61</sup> llevaron a cabo un estudio en el Hospital General de México entre 1980 y 1989, en éste se menciona que la frecuencia de pacientes con EC en el servicio de gastroenterología fue de 8 de cada 10,000 ingresos. Este estudio señala que el promedio de edad de la población general afectada fue de 50 años, mientras que el promedio de edad de la población infantil afectada fue de 7.7 años.<sup>61</sup>

### 1.12 Etiologías propuestas

La etiología de la enfermedad de Crohn permanece desconocida. Actualmente muchos investigadores creen que la enfermedad de Crohn es un síndrome ocasionado por varias causas.<sup>47, 57</sup>

#### 1.12.1 Hipótesis de origen genético

Existen estudios de epidemiología genética que sugieren que puede haber cierta predisposición hereditaria en los pacientes con EC. En el Reino Unido se llevó a cabo un estudio con gemelos afectados con enfermedad inflamatoria intestinal crónica idiopática (IBD), en el que se observó que el 17% (11/63) de los gemelos idénticos presentaban IBD; mientras que entre los gemelos no idénticos, el 5% (4/80) presentaba IBD.<sup>62</sup> En este estudio no se encontraron diferencias de concordancia entre los pacientes con EC y aquellos con colitis ulcerosa (CU). Tampoco se observaron diferencias de concordancia de acuerdo a la edad de los pacientes, duración de la enfermedad y la cantidad de años que vivieron juntos.<sup>62</sup> El periodo promedio entre el diagnóstico de uno de los hermanos y el diagnóstico del segundo fue de 5 años.<sup>62</sup> La variación en la presentación de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa crónica inespecífica entre gemelos sugiere que existen factores ambientales o variaciones estocásticas en el desarrollo del sistema inmune que pueden influenciar la expresión fenotípica del genotipo susceptible a estas enfermedades.<sup>54</sup>

Hugot *et al*<sup>63</sup> atribuyen la susceptibilidad a la EC a un locus en el cromosoma 16 al que nombraron *IBD1*, este locus se localiza entre el loci D16S409 y D16S419. Hampe *et al*,<sup>64</sup>

identificaron el gen NOD2, que se localiza en la región de unión del cromosoma 16q12, el cual activa el factor nuclear kappaB (NF) en respuesta a los lipopolisacáridos bacterianos. Estos investigadores secuenciaron y genotipificaron el polimorfismo de la región rica en leucina de la proteína producida por este gen en 512 individuos con IBD, de acuerdo con ellos, la mutación por inserción en el gen NOD2 confiere un incremento substancial en la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn, pero no predispone a colitis ulcerativa crónica inespecífica.<sup>64</sup>

En 1997, Akolkar *et al*<sup>65</sup> publicaron los resultados de un estudio en el que se pretendía determinar el patrón de transmisión de la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa; en este estudio se observó que únicamente el grupo de padres e hijos no judíos con EC mostraba que la susceptibilidad a la enfermedad había sido transmitida por la madre, ya que en 28 de 33 parejas era la madre quien presentaba la enfermedad. Ellos concluyen que la transmisión de la susceptibilidad a la EC puede darse a través de un gen impreso, como se ha descrito en otras enfermedades. La mayoría de los genes tienen una expresión bialélica, los genes sujetos a impresión genómica son monoalélicos y basados en el sexo del padre transmisor. La posesión de un solo alelo activo puede provocar graves consecuencias en la salud como malformaciones, problemas en el neurodesarrollo y cáncer.<sup>66</sup>

Por medio de tecnología transgénica se han desarrollado modelos animales con lesiones parecidas a las de los humanos con IBD. Ratones con *knockout* de IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-10, IL-10R, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\beta\delta$  y genes del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) desarrollaron inflamación crónica intestinal. De la misma manera, ratones con deficiencia en el factor de crecimiento TGF- $\beta$  desarrollaron un síndrome desgastante con respuesta inflamatoria por linfocitos y macrófagos en varios órganos, incluyendo el colon, lo que indica el papel inmunorregulador del TGF- $\beta$  en la mucosa intestinal.<sup>54</sup>

La cepa de ratones SAMP1/Yit espontáneamente desarrolla ileitis grave, a las 30 semanas de edad, que se caracteriza por infiltrado inflamatorio transmural, abscesos crípticos y la presencia de lesiones en zonas intercaladas con zonas normales.<sup>67</sup> Ratones con una delección de 69 pares de bases en el gen del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) presentan también inflamación transmural en íleon.<sup>68</sup> Aunque difieren los mecanismos de inflamación en cada modelo animal, la mayoría provoca la expansión

anormal de células T patogénicas. Estas células secretan interferón gamma y alfa (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ ) y provocan una respuesta inmune semejante a la de los pacientes con enfermedad de Crohn. Las alteraciones inflamatorias en los modelos animales sugieren que la manipulación del sistema inmunológico o la disrupción de la integridad del epitelio intestinal pueden inducir a la inflamación de la mucosa y deja ver que la causa de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica inespecífica puede ser igualmente heterogénea.<sup>54</sup>

El diagnóstico de mielodisplasia en hasta el 50% de los pacientes con enfermedad de Crohn sugiere la posible asociación causal de la enfermedad por una acumulación de neutrófilos disfuncionales. La inhabilidad de la respuesta inflamatoria aguda (mediada por neutrófilos) para enfrentar al agente, conduce a la activación de la respuesta por linfocitos T y B. Algunos estudios han demostrado que en los pacientes con EC, los neutrófilos presentan un impedimento de migración y que la generación de superóxidos es deficiente en pacientes durante la fase activa y la fase de remisión de la enfermedad.<sup>69</sup>

### **1.12.2 Hipótesis de origen infeccioso**

Los estudios en modelos murinos de IBD sugieren que las bacterias entéricas tienen un papel desencadenante del proceso inflamatorio, ya que los animales axénicos no desarrollan la enfermedad.<sup>70</sup>

Algunos autores sugieren que el virus del sarampión podría estar implicado en la patogenia de la EC, Lavy *et al*<sup>71</sup> publicaron los resultados de un estudio en el que señalan que los pacientes con EC presentan un título más alto de anticuerpos anti-sarampión; Asimismo, afirman que los pacientes con EC que padecieron sarampión durante su infancia tienen un mayor riesgo de presentar lesiones en intestino grueso. Recientemente se han publicado múltiples artículos en los que se menciona que la vacunación anti-sarampión, el hecho de presentar la enfermedad durante la infancia, que la madre se contagie con este virus durante el embarazo o lactancia, así como la infección persistente no se encuentra relacionada con un incremento en la presentación de la enfermedad de Crohn.<sup>72, 73, 74, 75, 76</sup> Asimismo, por medio de inmunohistoquímica se ha demostrado que es posible detectar el virus del sarampión en muestras de esófago, estómago, duodeno, yeyuno, colon y pulmón de pacientes con EC, CU, pacientes sin IBD y controles, sin que

haya diferencia estadística entre los tres primeros grupos, por lo que se descarta la hipótesis de que este virus esté implicado en la patogenia de la EC.<sup>77</sup>

Por medio de inmunocitoquímica se ha detectado la presencia de *Listeria monocytogenes* dentro de macrófagos y células gigantes localizados por debajo de úlceras, fisuras, alrededor de abscesos, en la lámina propia, y en granulomas intestinales; así como en los centros germinales de linfonodos, en hasta el 75% de las muestras de pacientes con EC, este estudio reveló además la presencia de *Escherichia coli* y *Streptococcus spp.* en 57 y 44% de los casos, respectivamente.<sup>78</sup> Sin embargo, varios investigadores han concluido que no existe evidencia que vincule a *E. coli*<sup>79, 80</sup> o *Listeria monocytogenes* en la patogénesis de la EC.<sup>80, 81, 82</sup>

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) ha sido implicado en la etiología de la enfermedad de Crohn. La evidencia que soporta esta asociación incluye el aislamiento bacteriológico de esta micobacteria a partir de secciones intestinales de pacientes con EC, detección de anticuerpos específicos contra Map, eficacia del tratamiento con drogas antimicobacteriales e identificación de la secuencia específica IS900 por PCR e hibridación *in situ*.<sup>47</sup> Incluso los resultados de Akolkar *et al*<sup>65</sup> podrían apoyar la teoría micobacteriana de la patogénesis de la EC; siempre y cuando estas madres hayan alimentado a sus hijos con leche materna, ya que Naser *et al*<sup>91</sup> han demostrado que es posible aislar Map a partir de muestras de leche de mujeres con EC. La transmisión de esta micobacteria a través de la ingestión de leche contaminada es un mecanismo común descrito en la paratuberculosis.<sup>22</sup>

De acuerdo con Chamberlin *et al*,<sup>47</sup> la teoría micobacteriana y la autoinmune son complementarias, la primera involucra la etiología del padecimiento y la segunda su patogénesis.

### 1.12.3 Evidencias que vinculan a Map con la EC

**Cultivo:** En 1984, Chiodini *et al*<sup>83</sup> anunciaron el primer aislamiento de una micobacteria atípica a partir de 3 muestras intestinales de pacientes con EC y en ninguno de los controles que incluían pacientes con CU y otras enfermedades intestinales. En 1986, Chiodini *et al*<sup>84</sup> anunciaron que su aislamiento primario consistió en esferoplastos (formas deficientes de pared celular) que después de varios meses de incubación adquirieron

forma bacilar. En 1987 estos investigadores pudieron identificar a la micobacteria como Map y tuvieron éxito en producir ileocolitis en cabritos inoculados experimentalmente.<sup>85</sup> Desde entonces, varios investigadores han descrito el aislamiento de formas deficientes de pared celular de Map en una mayor proporción de pacientes de EC que en aquellos con CU.<sup>86, 87, 88</sup> En 2003, Bull *et al*<sup>89</sup> lograron aislar Map a partir de muestras intestinales de 14 de 33 (42%) de los pacientes con EC y en 3 de 33 (9%) de los controles; en ese estudio, se destaca que algunas de las muestras requirieron más de 38 semanas de cultivo en tubo indicador de crecimiento micobacteriano (MGIT). Después de meses o años de incubación se ha podido cultivar la forma bacilar en el 5% de las muestras intestinales de estos pacientes como ocurre en los casos de infección paucibacilar en ovinos.<sup>89</sup> En el 2000, Schwartz *et al*<sup>90</sup> publicaron los resultados de un estudio en el que lograron aislar Map a partir de 6 de 7 (86.6%) piezas quirúrgicas de pacientes con EC y en 4 de 20 (20%) biopsias de pacientes con EC. Mientras que solamente fue posible aislar esta micobacteria a partir de 2/36 (5.6%) de los controles. El cultivo se realizó en medio MGIT y requirió de 10-12 semanas en las muestras de piezas quirúrgicas y 40 semanas en las muestras de biopsias.

En el año 2000, Naser *et al*<sup>91</sup> informaron la detección de Map a partir de muestras de leche de dos mujeres en lactancia diagnosticadas con enfermedad de Crohn y en ninguna de las muestras de trece mujeres sanas. La micobacteria creció después de 12 semanas de incubación en medio MGIT, además se identificó por medio de la PCR la secuencia IS900, específica de Map.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Cuando se utiliza la secuencia de inserción IS900 como marcador genético para PCR se puede identificar la presencia de la micobacteria en una mayor proporción de las muestras intestinales de pacientes con EC. En 1992, Sanderson *et al*<sup>92</sup> detectaron la secuencia IS900 en muestras quirúrgicas frescas de 26 de 40 (65%) de los de pacientes con EC, 1 de 23 de pacientes con CU y en 5 de 40 (12.5%) de los controles sin daño histológico aparente. En el 2000, Cheng *et al*<sup>93</sup> demostraron que la técnica de PCR también puede realizarse en muestras de intestino incluidas en parafina, siempre y cuando se lleve a cabo una remoción adecuada de la parafina en el tejido; en ese estudio se demostró la presencia de Map en 9 de 13 (69%) de los pacientes con EC, 1 de 3 (33.33%) de los pacientes con CU y en 2 de 14 (14%) sin IBD. La dificultad en la detección de la micobacteria por medio de la PCR es similar a la

observada en la detección del agente de la enfermedad de Lyme, brucelosis y lepra.<sup>53</sup> En 2003, Bull *et al*<sup>89</sup> publicaron los resultados de un estudio con biopsias frescas de la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn de Estados Unidos, Alemania, Emiratos Árabes Unidos e Irlanda, en el que detectaron, por medio de PCR, la secuencia IS900 en 34 de 37 (92%) de los pacientes con EC y en 9 de 34 (26%) de los testigos.

**Serología:** En el pasado era muy difícil identificar la respuesta inmune humoral específica a Map, ya que varios de sus antígenos reaccionan de manera cruzada con otras especies micobacterianas. Naser *et al*<sup>94</sup> aislaron las proteínas p35 (35KDa) y p36 (36KDa) de una biblioteca de expresión genómica de Map y demostraron su especificidad para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Crohn al encontrar que el suero del 40/53 (75%) presentaba anticuerpos contra p35 y 79 de 89 (89%) contra p36. Mientras que 5 de 35 (14%) y 7 de 50 (14%) de los sueros de los testigos negativos (sin IBD) reaccionaron contra p35 y p36, respectivamente. En este estudio también se analizó un grupo de colitis ulcerosa, en el que se observó que únicamente 1 de 10 (10%) y 4 de 27 (15%) presentaba anticuerpos contra p35 y p36, respectivamente. El 74% (39 de 53) de los sueros de pacientes con EC, el 10% (1 de 10) de los pacientes con CU y ninguno de los controles sanos presentaron anticuerpos contra ambas proteínas.<sup>94</sup>

**Hibridación *in situ*:** Por medio de esta técnica, Hulten *et al*<sup>95</sup> lograron identificar la presencia de esferoplastos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en 6 de 15 (40%) de los pacientes con EC con presentación granulomatosa, en 1 de 22 (4.5%) de pacientes con EC no granulomatosa, 2 de 21 (9.5%) de los pacientes con colitis ulcerosa y en ninguno de los 22 pacientes sin enfermedad inflamatoria intestinal crónica inespecífica. Sechi *et al*<sup>96</sup> demostraron la presencia Map en 35/48 (70%) de las muestras de pacientes con EC, mientras que todos los controles, que incluían pacientes con colitis ulcerosa y sin enfermedad inflamatoria intestinal, resultaron negativos.

### 1.13 Posible vía de transmisión a los humanos

Se ha propuesto que la leche, la carne y el agua pueden actuar como fuente de infección para los humanos.<sup>97</sup> El ganado infectado con paratuberculosis puede contaminar la leche

con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) ya que ésta es una bacteria intracelular que coloniza y se multiplica en macrófagos. La leche bovina, y de cualquier otro mamífero, contiene leucocitos; de manera que la leche de los animales con paratuberculosis contiene macrófagos que pueden estar infectados con micobacterias.<sup>98</sup> Chiodini y Hermon-Taylor<sup>99</sup> mencionan que 35% del ganado lechero con enfermedad de Johne (EJ) clínica y 11.6% de los portadores asintomáticos eliminan la micobacteria a través de la leche. Además, como se mencionó anteriormente, los animales con una carga bacteriana alta pueden eliminar a través de las heces 100 millones de micobacterias por gramo de heces. Las vacas con paratuberculosis presentan diarrea abundante que puede estar en contacto con la ubre y contaminar la leche.<sup>98</sup>

Los parámetros de la pasteurización se crearon para asegurar que la leche fuera libre de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Coxiella burnetti* y *Mycobacterium bovis*.<sup>100</sup> Sung y Collins<sup>101</sup> demostraron que Map es más resistente al calor que estas bacterias y, por lo tanto, es capaz de sobrevivir a las condiciones comerciales de pasteurización de la leche. Map es capaz de resistir el proceso de pasteurización a bajas y altas temperaturas, mostrando del 5 al 9% y del 24.8 al 31.4% de supervivencia respectivamente.<sup>101</sup> En 1996, Grant *et al*<sup>104</sup> realizaron un estudio con leche inoculada con  $10^6$  y  $10^7$  ufc/ml en el que se identificaron células de Map en 27 de 20 (96%) y 29 de 34 (85%) de las muestras de leche pasteurizada en el laboratorio de acuerdo con el método de altas temperaturas en tiempos cortos (HTST). La viabilidad de las bacterias después de la pasteurización se aseguró al cultivarlas en medio HEYM adicionado con mycobactina J y en medio BACTEC Middlebrook 12B con mycobactina J y emulsión estéril de yema de huevo. Cuando la leche contenía  $10^2$  y  $10^4$  ufc/ml se aislaron células de Map en 14 de 28 (50%) y 19 de 33 (58%) de las muestras pasteurizadas por el método HTST.<sup>104</sup> En 1998, Grant *et al*<sup>105</sup> realizaron un estudio para observar el efecto de la pasteurización HTST en leche inoculada con bajas concentraciones de Map, cultivaron las muestras en medios sólidos y líquidos y encontraron que las muestras con  $10^3$  ufc/ml eran positivas al aislamiento en 4 de 27 (14.8%) y que era posible aislar Map en 3 de 30 10% de las muestras de leche inoculada con  $10^2$  ufc/ml. Por lo tanto, concluyeron que la pasteurización HTST sólo es efectiva cuando la concentración micobacteriana no excede de 10 ufc/ml, por lo que para eliminar 100 bacterias por mililitro se requieren al menos 23 segundos de exposición a 72.2°C. En el Reino Unido, donde se emplea el mismo sistema de pasteurización que en México,<sup>106, 107</sup> se ha aislado Map a partir de muestras de leche

pasteurizada comercialmente y envasada para su venta. Grant et al <sup>108</sup> publicaron los resultados de un estudio en el que se analizaron 814 muestras de leche de vaca, en éste se demostró por medio de PCR inmunomagnética la presencia de Map al amplificar la IS900 en el 7.3% de las muestras de leche cruda y en el 11.8% de las muestras de leche pasteurizada comercialmente. El 1.6% de las muestras de leche cruda y el 1.8% de las pasteurizadas fue positivo al cultivo de Map. En todos los casos se aseguró que la pasteurización se había llevado a cabo sin problemas y de acuerdo a los lineamientos oficiales para la pasteurización HTST.

McDowell y McElvaine <sup>109</sup> mencionan que la tercera parte del queso que se vende en los Estados Unidos se elabora con leche no pasteurizada, mientras que en México la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural en la modificación a la NOM-031-ZOO-1995 admite que solamente el 50% de la producción láctea nacional se pasteuriza, el resto se consume o se transforma en derivados lácteos, este hecho implica un alto riesgo para la salud pública. <sup>110</sup>

Se sugiere que la infección también es capaz de diseminarse de los animales al hombre a través de la carne que puede contaminarse con heces al momento de la matanza. El Servicio de Inspección de la Seguridad Alimentaria de Estados Unidos recomienda cocinar a un mínimo de 71.1°C la carne molida y a 62.8°C la carne rebanada; sin embargo, Merkal *et al* <sup>111</sup> demostraron que Map es capaz de sobrevivir a esas temperaturas.

Por todo esto, resulta sumamente importante evitar que los animales con paratuberculosis, o bien, sus subproductos pecuarios ingresen a la cadena alimenticia humana.

### **1.14 Sintomatología**

Los síntomas, signos y curso clínico de la enfermedad de Crohn varían significativamente en cada caso, ya que éstos dependen de la sección intestinal afectada y la severidad del proceso,<sup>112</sup> así como de la presentación clínica que puede ser predominantemente obstruccionista o perforante.<sup>56</sup> De acuerdo con Greenstein,<sup>113</sup> la presentación obstruccionista de



la enfermedad de Crohn es comparable a la lepra lepromatosa, mientras que la presentación perforante es similar a la forma tuberculosa de la lepra. La presentación fistulosa o perforante suele ser la más agresiva y los pacientes que la padecen generalmente requieren tratamiento quirúrgico en más de una ocasión.<sup>97</sup> Las manifestaciones más frecuentes en la mayoría de los pacientes incluyen: diarrea, dolor continuo en el cuadrante abdominal inferior derecho (área ileocecal) y cólico periumbilical intermitente. Cuando la afectación es a nivel del íleon la diarrea suele ser moderada, mientras que cuando el colon es el mayormente afectado puede presentarse incontinencia fecal y hemorragia rectal.<sup>112</sup> El cuadro clínico puede incluir náuseas, vómito, fiebre y pérdida de peso.<sup>51</sup> Frecuentemente el primer signo de esta enfermedad consiste en la aparición de lesiones perianales.<sup>112</sup>

## **1.15 Lesiones**

### **1.15.1 Lesiones Macroscópicas**

Los hallazgos macroscópicos reflejan el estado avanzado del proceso. Estas lesiones son similares a lo largo del tubo digestivo y consisten en ulceraciones discontinuas, estenosis y fístulas. La afectación del íleon terminal es muy frecuente, puede ocurrir en la periferia de la válvula ileocecal o incluir la totalidad del íleon. El colon puede estar afectado de manera aislada o junto al íleon terminal. En cualquier segmento intestinal afectado, se observa engrosamiento de la pared intestinal, presencia de úlceras discontinuas en la mucosa intestinal rodeadas de mucosa normal. Estas ulceraciones pueden conferir a la mucosa aspecto de “empedrado” producido por la unión de la mucosa que rodea las úlceras con submucosa edematosa. Durante el proceso de la enfermedad, las úlceras tienden a juntarse y formar úlceras lineales, que tienden a orientarse de manera longitudinal.<sup>55</sup> Las úlceras pueden perforar la pared intestinal y generar fisuras; su extensión hacia estructuras contiguas, como pueden ser otros segmentos intestinales u órganos pelvianos, da lugar a la formación de trayectos fistulosos.<sup>55, 114</sup> También puede presentarse estenosis única o múltiple. La serosa intestinal muestra congestión de los vasos sanguíneos. Los linfonodos regionales suelen estar aumentados de tamaño. Es común la presencia de lesiones en la región anal que consisten en úlceras, fístulas anorrectales y edema cutáneo.<sup>114</sup>

### 1.15.2 Lesiones Microscópicas

La lesión inicial de la EC parece ser la infiltración por neutrófilos en el epitelio, particularmente en la mucosa suprayacente a agregados linfoides, con la posterior afectación del epitelio de las criptas que da lugar a abscesos cripticos caracterizados por inflamación aguda del epitelio y destrucción del mismo.<sup>55, 114</sup> La lesión más característica de la enfermedad consiste en la presencia de granulomas formados por un cúmulo de histiocitos epitelioides con o sin células tipo Langhans y/o reacción granulomatosa en cualquier capa de la pared intestinal, así como agregados linfoides esparcidos de manera transmural<sup>55, 114</sup> que suelen estar íntimamente relacionados con vasos linfáticos.<sup>114</sup> Matson *et al* afirman que los granulomas suelen no estar asociados a vasos sanguíneos, aunque existe una minoría de pacientes con vasculitis granulomatosa importante, probablemente como fenómeno secundario.<sup>115</sup> Por otro lado Wakefield *et al*<sup>116</sup> encontraron que el 85% de los granulomas de los pacientes con EC se localiza alrededor de vasos sanguíneos. Además, estos autores mencionan que la mayoría (77%) de los granulomas se localizan en capas más profundas que la mucosa, siendo la submucosa el sitio más común (44%). Estos granulomas se aprecian en alrededor del 50% de los casos, por lo tanto, la ausencia de esta lesión no excluye el diagnóstico de EC.<sup>55</sup> En las biopsias de los pacientes con EC, es frecuente distinguir la presencia de úlceras que comúnmente penetran sólo hasta la submucosa, pero pueden generar fisuras.<sup>55, 114</sup> También se puede observar infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas en la mucosa, atrofia de vellosidades, especialmente en el colon. Asimismo, se puede apreciar engrosamiento de la submucosa por edema, además de linfangiectasia.<sup>114</sup>

### 1.16 Complicaciones intestinales

Las complicaciones más frecuentes que se presentan como consecuencia del proceso inflamatorio intestinal local incluyen hemorragia masiva, fístulas (hasta en el 33 % de los pacientes),<sup>117</sup> perforaciones, megacolon tóxico y malnutrición. La hemorragia se asocia con mayor frecuencia con afectación colónica.<sup>102</sup> El íleon terminal es el segmento anatómico que con mayor frecuencia sufre de perforación; sin embargo, ésta puede ocurrir en cualquier segmento intestinal como complicación única o asociada a megacolon

tóxico u obstrucción intestinal. Las perforaciones libres son raras debido a que el proceso inflamatorio afecta toda la pared intestinal; la participación de la serosa crea adherencias que impiden que las fistulas se comuniquen con la cavidad peritoneal, por lo tanto, la perforación es localizada y provoca la formación de abscesos.<sup>102</sup> El megacolon tóxico es una complicación poco frecuente de la colitis o ileocolitis, se presenta aproximadamente en el 0.3-2% de los pacientes con EC y en el 1.6-21.4% de los pacientes con CU durante la evolución de la enfermedad, o bien puede presentarse como manifestación inicial de la misma.<sup>102, 118, 119</sup> Las principales características del megacolon tóxico son toxemia, sepsis y distensión del colon debido a una disminución del tono muscular, pérdida de actividad motora e incremento en la cantidad de gas en el colon. El diagnóstico de megacolon tóxico se confirma cuando una toma radiográfica abdominal muestra que el colon presenta un diámetro mayor a los 6 cm.<sup>118</sup> La malnutrición puede ser consecuencia de la privación de alimentación oral, la malabsorción y la pérdida proteica a través del intestino.<sup>102</sup> La malabsorción se relaciona con la inflamación del intestino delgado, con la resección intestinal o ambas. Algunas sustancias como el hierro y el ácido nicotínico se absorben mal aún cuando la zona inflamada no es muy amplia. La extirpación de aproximadamente 30 cm de íleon distal provoca malabsorción de ácidos biliares, la resección de 60 cm provoca además una deficiencia en la absorción de vitamina B12, mientras que resecciones mayores a 90 cm provocan una reducción importante en la absorción de lípidos.<sup>102</sup> Además, los pacientes con EC tienen mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma en intestino delgado o carcinoma colorectal, cuando se les compara con la población en general, probablemente por el efecto inflamatorio persistente.<sup>56</sup>

### **1.17 Manifestaciones extraintestinales**

La complicación más grave es la colangitis esclerosante,<sup>120</sup> asimismo pueden presentarse consecuencias autoinmunes como el eritema nudoso o provocadas por la terapia inmunosupresiva.<sup>57</sup> De acuerdo con Meyers y Janowitz,<sup>103</sup> las complicaciones extraintestinales pueden dividirse en dos grupos, de acuerdo con el segmento intestinal mayoritariamente afectado. Así, los pacientes con afección del intestino delgado suelen presentar malabsorción y están predispuestos a la presentación de colelitiasis y urolitiasis.<sup>56, 103</sup> Los cálculos biliares podrían ser secundarios a la malabsorción de sales biliares en íleon terminal.<sup>117</sup> Los pacientes con afectación a nivel del intestino grueso

pueden desarrollar artritis periférica, espondilitis anquilosante, artrosis; uveitis, eritema nudoso en piel y úlceras aftosas en boca.<sup>103, 117</sup> Frecuentemente estas lesiones a nivel mucocutáneo son el primer signo de la enfermedad.<sup>57</sup> Si el colon se encuentra afectado, el incremento de la permeabilidad de la mucosa y la reducción de la concentración luminal de calcio puede provocar un incremento en la absorción de oxalatos y favorecer la precipitación de cristales de oxalato a nivel renal.<sup>56</sup>

Existen otras manifestaciones hepatobiliares que han sido descritas en la EC sin que se haya establecido la relación entre éstas lesiones y la EC, entre éstas se incluyen: pericolangitis, cirrosis, hepatitis crónica, colangiocarcinoma, hígado graso, hepatitis granulomatosa y hepatitis abscedativa.<sup>120</sup>

Además, los pacientes con enfermedad de Crohn tienen el riesgo de presentar osteomalacia a consecuencia de la terapia con corticosteroides; este riesgo incrementa cuando el paciente presenta lesiones en intestino delgado ya que puede ocurrir malabsorción de vitamina D y calcio.<sup>56</sup>

Algunos autores han descrito lesiones broncopulmonares asociadas a la enfermedad de Crohn, entre las que se incluyen granulomas epitelioides no caseificantes<sup>121, 122, 123, 124</sup> y bronquiolitis obliterativa.<sup>121</sup> En ausencia de granulomas pulmonares, se ha observado engrosamiento de la membrana basal de los bronquios, angiectasia e inflamación crónica activa en niños con enfermedad pulmonar asociada a EC.<sup>124</sup> El engrosamiento de la membrana basal se debe al incremento de deposición subepitelial de colágeno por debajo de la membrana basal y se ha descrito en otros trastornos respiratorios crónicos con un componente inflamatorio persistente como casos de asma, bronquitis crónica y tuberculosis.<sup>126</sup>

### **1.18 Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad de Crohn tiene como base la historia clínica, hallazgos endoscópicos, quirúrgicos e histopatológicos.<sup>58, 127</sup> Se han investigado varios parámetros inmunológicos como moléculas de adhesión, inmunoglobulinas, citocinas y sus receptores, en el suero y lámina propia de los pacientes con IBD; sin embargo, no se ha encontrado una prueba lo suficientemente sensible y específica para diferenciar entre la EC y la CU, por lo que el diagnóstico patológico continúa siendo la principal herramienta diagnóstica. La eficacia del diagnóstico en muestras rectales individuales varía del 37 al

77% en los pacientes con Crohn y del 67 al 70% de los pacientes con CU.<sup>128</sup> El diagnóstico definitivo no se puede establecer en 14-23% de los casos pediátricos y 20-37% de los casos en adultos.<sup>129</sup> La sensibilidad y especificidad del criterio microscópico para diferenciar entre los tipos de IBD varía del 66 al 96%.<sup>130</sup> La aplicación de criterios guías, la colaboración cercana del clínico con el patólogo y la examinación de múltiples biopsias ayuda a mejorar el diagnóstico.<sup>127</sup>

El diagnóstico definitivo entre EC y CU se dificulta cuando la enfermedad se encuentra localizada en el colon, donde ambas entidades coinciden en distribución anatómica. Se menciona que el 10% de los pacientes que han sido diagnosticados con algún tipo de IBD, obtendrán un diagnóstico final contrario al asignado originalmente.<sup>131</sup> El diagnóstico preciso de la colitis es importante para establecer el tratamiento médico y quirúrgico apropiado, ya que estas enfermedades difieren en historia natural, complicaciones, gravedad y respuesta al tratamiento. De la misma manera, la calidad del diagnóstico tiene implicaciones en estudios de supervivencia y relación genética.<sup>127</sup>

Recientemente Sasaki *et al*<sup>132</sup> publicaron un estudio en el que se utiliza la inmunohistoquímica como herramienta para cuantificar la densidad de linfocitos, neutrófilos, histiocitos y células cebadas, con el fin de diferenciar entre la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn. Los criterios utilizados en este estudio permitieron una sensibilidad y especificidad mayor al 95%. La inmunohistoquímica puede ser una herramienta valiosa para distinguir entre la EC y la CU en los pacientes cuyos hallazgos endoscópicos e histológicos sean ambiguos. Actualmente se utiliza el término de "colitis indeterminada" para sustituir el de colitis inespecífica al designar todos los casos de enfermedad inflamatoria intestinal crónica idiopática del colon en los que no se puede establecer el diagnóstico de EC o CU.<sup>127</sup>

## **1.19 Diagnóstico diferencial**

### **1.19.1 Enfermedades por agentes infecciosos intestinales**

#### *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis intestinal a diferencia de la EC, raramente afecta el colon y el recto. Las lesiones macroscópicas de la tuberculosis (Tb) incluyen estenosis múltiples y úlceras, que suelen estar orientadas transversalmente. En los cortes histológicos se aprecian granulomas distribuidos de manera continua; la caseificación de los granulomas es un

hallazgo característico de la Tb, mientras que en la EC ocasionalmente se observa necrosis central en los granulomas. En la tuberculosis se presenta obliteración importante de la submucosa con fibrosis de la muscular del órgano. Además es posible identificar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes.

#### *Chlamydia trachomatis*

Este agente puede provocar proctitis granulomatosa con células gigantes multinucleadas, así como abscesos crípticos. Además, puede inducir la formación de estenosis fibrosas y úlceras en la región anorrectal, así como granulomas. La metaplasia escamosa de la mucosa colónica apoya el diagnóstico de linfogranuloma venéreo.

#### *Yersinia spp.*

Puede ocasionar la formación de granulomas, en intestino delgado y grueso se puede apreciar macroscópicamente la hiperplasia linfoide, ulceraciones, congestión y edema de la mucosa. En el corte histológico de linfonodos regionales, pueden observarse granulomas con células epitelioides y células gigantes multinucleadas, en los que destaca necrosis central con presencia de neutrófilos.<sup>117</sup>

#### *Schistosoma mansoni*

La lesión más característica de la esquistosomiasis es la hepatitis granulomatosa y la fibrosis portal extensa.<sup>133</sup> Sin embargo, la infección masiva puede dar lugar a inflamación intestinal con pseudopólipos inflamatorios<sup>133</sup> y estenosis fibrosa en el colon.<sup>114</sup> Histológicamente es común observar granulomas y fibrosis asociados a la presencia de ooquistes.<sup>114</sup>

### **1.19.2 Enfermedades idiopáticas y síndromes**

#### *Colitis ulcerosa*

Es un proceso de etiología y patogenia desconocida que consiste en inflamación subaguda o crónica del colon y recto. En las fases tempranas de la enfermedad se observa congestión de la mucosa intestinal, posteriormente suelen aparecer úlceras lineales con orientación longitudinal. También pueden apreciarse pólipos inflamatorios que se deben a la combinación de úlceras con regeneración de la mucosa. Estas lesiones son más frecuentes en el colon que en el recto, lo que hace pensar en la participación de factores mecánicos en su patogenia. Puede ocurrir una disminución del diámetro del órgano como consecuencia de la contracción de la muscular de la mucosa y de la muscular del órgano por disfunción del músculo. La superficie serosa únicamente muestra

congestión en las zonas de inflamación activa. En la mayoría de los casos el íleon terminal se aprecia normal; sin embargo en algunos pacientes se aprecia afectación de algunos centímetros contiguos a la válvula ileocecal que se conoce como “ileitis de reflujo”, ésta se asocia a incompetencia de la válvula ileocecal que se encuentra rígida y dilatada. En la CU el ano generalmente no se encuentra afectado, cuando existen anomalías éstas consisten principalmente en fisuras y abscesos. Una de las características principales de esta entidad es que la distribución de las lesiones es continua. Las lesiones observadas en el estudio histopatológico incluyen abscesos crípticos con necrosis del epitelio de las criptas, atrofia de las células caliciformes, inflamación crónica difusa y uniforme con infiltrado de células plasmáticas, linfocitos y eosinófilos; en ocasiones pueden observarse células gigantes multinucleares a cuerpo extraño en las áreas ulceradas. Puede distinguirse inflamación crónica e hipertrofia de la muscular de la mucosa. La submucosa suele ser normal, aunque puede presentar inflamación crónica en sus estratos superficiales que es mucho menor a la observada en la mucosa. En la ileitis de reflujo se observa atrofia de la mucosa intestinal, congestión e inflamación crónica, también puede apreciarse metaplasia colónica.<sup>134</sup>

#### *Enfermedad isquémica intestinal*

Las alteraciones dependen de la anatomía de la vascularización, la localización de las estenosis arterioscleróticas, la circulación colateral y la duración de la hipoperfusión. Los hallazgos característicos de la enfermedad isquémica aguda del intestino consisten en infartos transmurales y necrosis coagulativa de la mucosa, congestión, hemorragia y formación de pseudomembranas con engrosamiento de la submucosa por edema. Histológicamente es posible observar úlceras, abscesos crípticos y abundante cantidad de macrófagos con hemosiderina. Tras un episodio agudo de isquemia o durante la evolución de la isquemia crónica puede ocurrir estenosis por la notable fibrosis de la submucosa y muscular propia.<sup>114, 117</sup>

#### *Enfermedad diverticular*

En adultos mayores es frecuente la presencia de divertículos en el colon, la bolsa diverticular es consecuencia de la herniación de la mucosa y submucosa colónica por incremento de la presión endoluminal provocado por la demora del vaciamiento intestinal. Se menciona que hasta el 60% de las personas mayores de 65 años presenta

enfermedad diverticular que puede complicarse y provocar diverticulitis, hemorragia y/o peritonitis fecal.<sup>135</sup> Esta enfermedad puede presentarse sola o acompañada de la enfermedad de Crohn.<sup>114</sup>

### **1.20 Fundamentación de la técnica de hibridación *in situ***

Cuando dos cadenas de ADN se encuentran, se orientan en dirección antiparalela para permitir la unión de los pares de bases. Si no existe concordancia entre las bases, estas cadenas no se unen, mientras que si existe correlación las cadenas se unen o hibridan. Entre mayor sea el número de pares de bases unidas, mayor es la homología entre las cadenas. Pares de bases adyacentes unidas en una secuencia mantienen juntas las dos cadenas de ADN con mayor fuerza que el mismo número de pares de bases unidas dispersas en la secuencia. Las cadenas complementarias de ADN se mantienen juntas principalmente por los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases A y T (2 puentes) y entre C y G (3 puentes). Los puentes de hidrógeno mantienen adheridas a las cadenas, sin embargo, muchas sustancias químicas y cambios en las condiciones ambientales pueden afectarlos. El término para designar si las condiciones favorecen o no la unión de los puentes de hidrógeno es la astringencia. Bajo condiciones de baja astringencia las cadenas con 10% de homología se separan, mientras que aquellas con mayor homología permanecen unidas. Entre mayor sea el cambio en las condiciones (Por ejemplo: variación de temperatura o adición de formamida) se requerirá mayor homología de las cadenas para permanecer unidas a su cadena complementaria, esto se conoce como condiciones de alta astringencia.<sup>136</sup>

El punto de fusión (melting temperatura=  $T_m$ ) se define como la temperatura, bajo condiciones de reacción específicas, en la que la mitad de las cadenas permanecen hibridadas, mientras que la otra mitad se desnaturaliza. El  $T_m$  se logra a menor temperatura cuando existen condiciones que perjudican la unión de los puentes de hidrógeno. Con fines prácticos, cuando se manejan cadenas de ADN relativamente largas (>500 pares de bases), 100% homólogas y bajo "condiciones estándar" (25% de formamida, 100 mM de sodio y un 50% de GC) la  $T_m$  es de 69.9 °C. Por esta razón la temperatura debe incrementarse significativamente por encima de los 70°C, con el fin de desnaturalizar la mayoría del ADN. La desnaturalización generalmente se lleva a cabo a una temperatura cercana a los 100 °C y la hibridación alrededor de los 40°C. A esta temperatura la prueba se disociará de segmentos indeseados de ADN ya que la



temperatura será superior a la  $T_m$  de estas secuencias. Cuando 10-500 pares de bases de la prueba se unen con ADN no complementario bajo condiciones estándar, la  $T_m$  es de 19.9 °C. Esta es la base de la especificidad de la técnica de hibridación *in situ*. Los lavados de astringencia tienen como finalidad remover la sonda que está unida a secuencias con un bajo porcentaje de homología, por lo tanto, es necesario someter las laminillas a condiciones de alta astringencia para favorecer la disolución de los puentes de hidrógeno entre pares de bases discontinuas.<sup>136</sup>

La hibridación *in situ* es una de las técnicas moleculares básicas; se distingue de otras metodologías porque el ADN no se extrae de la muestra sino que se detecta en la célula intacta. Anteriormente se requería el uso de marcadores radioactivos como  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$  para maximizar la sensibilidad de la prueba, actualmente se utilizan marcadores como la fluoresceína, biotina y digoxigenina. La inmunohistoquímica detecta proteínas derivadas del ADN-mARN de interés.

La técnica de hibridación *in situ*, así como la inmunohistoquímica, la PCR y la PCR *in situ* se pueden aplicar en muestras incluidas en parafina, aún cuando éstas hayan sido almacenadas durante años, por lo tanto, permiten realizar estudios retrospectivos.<sup>136</sup>

## 2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Crohn es reconocida mundialmente como una de las patologías gastrointestinales de peor pronóstico, ya que es una condición que deteriora significativamente la calidad de vida de los pacientes y que provoca mortalidad en aproximadamente el 6% de los casos. Se menciona que alrededor del 80% de los pacientes requieren tratamiento quirúrgico durante la evolución de la enfermedad y que de éstos un 80% reincide, lo que añade importancia económica a este padecimiento. En diferentes partes del mundo, los investigadores vinculan a *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en la patogenia de la enfermedad de Crohn y sugieren la posible transmisión zoonótica. Se requiere la implementación de un método de diagnóstico eficiente que pueda confirmar o descartar la presencia de Map en las lesiones intestinales de los pacientes con enfermedad de Crohn.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en muestras de secciones intestinales de animales con paratuberculosis y de pacientes con enfermedad de Crohn, mediante hibridación *in situ* empleando la secuencia específica IS900.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de hibridación *in situ* para la detección de Map en muestras intestinales fijadas en formalina e incluidas en parafina.
- Determinar la localización y distribución de la reacción positiva por hibridación *in situ* en las secciones de animales con paratuberculosis y humanos con enfermedad de Crohn.

## 4. HIPÓTESIS

La técnica Hibridación *in situ* permitirá la identificación de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en la mucosa y submucosa de las secciones intestinales de rumiantes con paratuberculosis y pacientes con enfermedad de Crohn.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Origen y características de las muestras:**

Se emplearon 15 muestras intestinales incluidas en parafina pertenecientes a: 1 bovino, 2 caprinos y 13 ovinos, diagnosticados previamente con paratuberculosis por medio de estudio histopatológico, IDGA y ELISA. Dichas muestras forman parte del acervo de tesis realizadas en el Departamento de Patología de la FMVZ, UNAM.

Asimismo, se realizó un estudio doble ciego en el que se utilizaron 23 muestras de intestino de humanos en bloques de parafina con diagnóstico clínico e histopatológico de enfermedad de Crohn. Estas muestras provienen del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Como testigo negativo, se utilizó una muestra de intestino de humano incluida en parafina, positivo a tuberculosis por pruebas confirmatorias de laboratorio y PCR. Este último caso procede del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría.

### **5.2 Estudio histopatológico y selección del área de prueba**

Antes de realizar la técnica de hibridación *in situ*, se realizó un examen histopatológico en todos los cortes de intestino teñidos con hematoxilina eosina (HE) y con la técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) para clasificar las lesiones como granulomatosas y no granulomatosas (ZN+ y ZN-); así como para elegir el área para la aplicación de la sonda de hibridación. Considerando que la realización de la prueba de hibridación *in situ* tiene un costo elevado y por facilidad en el desarrollo de la técnica, se decidió seleccionar de cada caso el área más representativa de la lesión y aislar esa zona del resto del tejido del bloque.

### **5.3 Criterios de formación de grupos**

5.3.1 Casos de paratuberculosis: De los 15 casos de estudio y tomando como criterio la presencia o ausencia de bacilos ácido alcohol resistentes, se integraron dos grupos: grupo A: reacción granulomatosa ZN(+) y grupo B: reacción granulomatosa ZN(-). Después de realizar la tinción de Ziehl Neelsen se determinó que 8 de las muestras correspondían al grupo A y 7 al grupo B.

5.3.2 Todos los casos de enfermedad de Crohn resultaron negativos a la tinción de ZN. Las 23 muestras corresponden a 14 pacientes con enfermedad de Crohn, debido a que

en 8 casos se contaba con más de una sección intestinal. De esta manera, en 7 pacientes se analizaron 2 muestras y en 1 paciente se analizaron 3 muestras. El grupo C quedó constituido por 7 pacientes y 10 muestras, mientras que al grupo D correspondían 8 pacientes con 13 muestras. El grupo C se conformó por aquellos casos en los que a nivel histológico se observó infiltrado inflamatorio transmural con presencia de macrófagos, células epitelioides y células gigantes tipo Langhans y se consideraron como **granulomatosos**. Mientras que el grupo D se constituyó por aquellos casos en los que el infiltrado inflamatorio era predominantemente linfoplasmocitario o mixto (con presencia de polimorfonucleares), tanto a nivel de la mucosa como transmural, estos casos se consideraron como **no granulomatosos**. En un solo caso con múltiples muestras, una de éstas se clasificó dentro del grupo C y otra en el grupo D. Como testigo negativo se empleó un caso de tuberculosis intestinal en humano, ya que en esta micobacteriosis no se encuentra la IS900.

#### 5.4 Hibridación *in situ*

Se realizaron cortes a 1  $\mu\text{m}$  de espesor y se colocaron en el extremo de laminillas electrocargadas para capilaridad\*. La sonda biotinilada\*\* que se utilizó consta de 25 bases nitrogenadas: TAGGACTGGTCGGCTGCAAGGTAG. Esta secuencia corresponde a la cadena 3' de la región 639-664 de la secuencia de inserción IS900, exclusiva de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.<sup>18</sup> (Figura 1)

```

1  TCCTTACCTT TCTTGAAGGG TGTTCGGGGC CGTCGGCCTT AGGCTTCGAA
   AGGAATGGAA AGAACTTCCC ACAAGCCCCG GCAGCCGGAA TCCGAAGCTT
   ~~~~~
51  TTGCCCAGGG ACGTCGGGTA TGGCTTTCAT GTGGTTGCTG TGTGATGAGG
   AACGGGTCCC TGCAGCCCAT ACCGAAAGTA CACCAACGAC ACAACCTACC
101  CCGAAGGAGA TTGGCCGCC CCGCTCCCGC GACGACTCGA CCGCTAATTG
   GGCTTCCTCT AACCGGCGGG CCGCAGGGCG CTGCTGAGCT GCGGATTAAC
151  AGAGATGCGA TTGGATCGCT GTGTAAGGAC ACGTCGGCGT GGTGCTCTGC
   TCTCTACGCT AACCTAGCGA CACATTCCTG TGCAGCCGCA CCAGCAGACG
   ~~~~~
201  TGGGTTGATC TGGACAATGA CGGTTACGGA GGTGGTTGTG GCACAACCTG
   ACCCAACTAG ACCTGTTACT GCCAATGCCT CCACCAACAC CGTGTTGGAC
   ~~~~~
251  TCTGGGCGGG CGTGGACGCC GGTAAGGCC ACCATTACTG CATGGTTATT
   AGACCCGCCC GCACCTGCGG CCATTCCGGC TGGTAATGAC GTACCAATAA
   ~~~~~
301  AACGACGACG CGCAGCGATT GCTCTCGCAG CGGGTGGCCA ACGACGAGGC

```

\* Fisher, Estados Unidos

\*\* Epoch, Estados Unidos

TTGCTGCTGC GCGTCGCTAA CGAGAGCGTC GCCCACCGGT TGCTGCTCCG  
 ~~~~~  
 351 CGCGCTGCTG GAGTTGATTG CGGCGGTGAC GACGTTGGCC GATGGAGGCG  
 GCGCGACGAC CTCAACTAAC GCCGCCACTG CTGCAACCGG CTACCTCCGC  
 ~~~~~  
 401 AGGTCACGTG GCGATCGAC CTCAACGCCG GCGGCGCCGC GTTGCTGATC  
 TCCAGTGCAC CCGCTAGCTG GAGTTGCGGC CGCCGCGGCG CAACGACTAG  
 ~~~~~  
 451 GCCTTGCTCA TCGCTGCCGG GCAGCGGCTG CTTTATATTC CCGGGCGCAC  
 CGGAACGAGT AGCGACGGCC CGTCGCCGAC GAAATATAAG GGCCCGCTG  
 ~~~~~  
 501 GGTCCATCAC GCCGCGGTA GTTACCGCGG CGAAGGCAAG ACCGACGCCA  
 CCAGGTAGTG CGGCGCCCAT CAATGGCGCC GCTTCCGTTT TGGCTGCGGT  
 ~~~~~  
 551 AAGACGCTGC GATCATCGCC GATCAGGCC GGATGCGCCA CACTTGCAG  
 TTCTGCGACG CTAGTAGCGG CTAGTCCGGG CCTACGCGGT GCTGAACGTC  
 ~~~~~  
 601 CCTCTGCGCG CCGGCGATGA CATCGCAGTC GAGCTGCGCA TCCTGACCAG  
 GGAGACGCGC GGCCGCTACT GTAGCGTCAG CTCGACGCGT **AGGACTGGTC**  
 ~~~~~  
 651 CCGACGTTCC GATCTGGTGG CTGATCGGAC CCGGGCGATC GAACCGAATG  
**GGCTGCAAGG CTAGACCACC** GACTAGCCTG GGCCCGCTAG CTTGGCTTAC  
 ~~~~~  
 701 CGCGCCAGC TGCTGGAATA CTTTCGGCGC TGGAACGCGC CTTGACTAC  
 GCGCGGGTTC ACGACCTTAT GAAAGCCGCG ACCTTGC GCGG GAAGCTGATG  
 ~~~~~  
 751 AACAGAGCC GTGCCGCGCT GATCCTGCTT ACTGGCTACC AAACCCCGA  
 TTGTTCTCGG CACGGCGCGA CTAGGACGAA TGACCGATGG TTTGAGGGCT  
 ~~~~~  
 801 CGCGCTGCGC AGCGCCGGTG GCGCTCGAGT AGCCGCGTTC TTGCGTAAAC  
 GCGCGACGCG TCGCGGCCAC CGCGAGCTCA TCGGCGCAAG AACGCATTTG  
 ~~~~~  
 851 GCAAGGCCCG CAACGCCGAT ACCGTCGCAG CCACCGCGCT GCAGGCCGCT  
 CGTTCGGGGC GTTGC GGCTA TGGCAGCGTC GGTGGCGCGA CGTCCGGCGA  
 ~~~~~  
 901 AACGCCAAC ACAGCATCGT GCCCGGCCAA CAACTGGCGG CCACTGTGGT  
 TTGCGGGTTG TGTCGTAGCA CGGGCCGGTT GTTGACCGCC GGTGACACCA  
 ~~~~~  
 951 GGCCCGCCTG GCCAAGGAGG TGATGGCCCT CGACACCGAA ATCGGCGACA  
 CCGGGCGGAC CGGTTCCTCC ACTACCGGGA GCTGTGGCTT TAGCCGCTGT  
 ~~~~~  
 1001 CCGACGCGAT GATCGAGGAG CGATTTGCGC GCCACCGCCA CGCCGAAATC  
 GGCTGCGCTA CTAGCTCCTC GCTAAAGCGG CGGTGGCGGT GCGGCTTTAG  
 ~~~~~  
 1051 ATCCTGAGCA TGCCCGGATT CGGCGTCATC CTGGGCGCTG AGTTCCTCGC  
 TAGGACTCGT ACGGGCCTAA GCCGCAGTAG GACCCGCGAC TCAAGGAGCG  
 ~~~~~  
 1101 CGCCACCGGC GGGGACATGG CCGCATTCGC CTCCGCGGAC CGCCTCGCCG  
 GCGGTGGCCG CCCCTGTACC GCGGTAAGCG GAGGCGGCTG GCGGAGCGGC  
 ~~~~~  
 1151 GCGTCGCCGG CCTGGCGCCG GTACCACGAG ATTCCGGCCG CATCAGCGGA  
 CGCAGCGGCC GGACCGCGGC CATGGTGCTC TAAGGCCGGC GTAGTCGCCT

```

~~~~~
1201 AACCTCAAAC GCCCCCGACG CTACGACCGG CGCCTGCTGC GCGCCTGCTA
TTGGAGTTTG CGGGGGCTGC GATGCTGGCC GCGGACGACG CGCGGACGAT
~~~~~
1251 CCTGTCCGCC TTGGTCAGCA TCCGCACCGA CCCCTCCTCG CGCACCTACT
GGACAGCCGG AACCAATCGT AGGCGTGGCT GGGGAGGAGC GCCTGGATGA
~~~~~
1301 ACGACCGAAA ACGCACCGAA GGAAAACGCC ACACCCAAGC CGTCCTCGCC
TGCTGGCTTT TGCGTGGCTT CCTTTTGCGG TGTGGGTTCG GCAGGAGCGG
~~~~~
1351 CTGGCCCGCC GCCGCCTCAA CGTCCTGTGG GCCATGCTGC GCGACCACGC
GACCGGGCGG CGGCGGAGTT GCAGGACACC CGGTACGACG CGCTGGTGCG
~~~~~
1401 TGTCTACCAC CCCGCAACCA CTACCGCGGC GGCTTGACAA CGTCATTGAG
ACAGATGGTG GGGCGTTGGT GATGGCGCCG CCGAACTGTT GCAGTAACTC
1451 AAT
TTA

```

**Figura 1. Secuencia nucleotídica de la IS900. En letras negritas y subrayada se señala la sección empleada como sonda de hibridación.**

De manera inicial se removió la parafina de las secciones, para esto se fundió la parafina en una estufa a 60 °C, durante 30 minutos y posteriormente se eliminó esta parafina sumergiendo las laminillas en xilol, durante 5 minutos. Inmediatamente se retiró el exceso de xilol al sumergir las laminillas 20 pases en 2 baños de alcohol etílico absoluto. Posteriormente, se hidrató el tejido en 2 baños de alcohol etílico de 96°, durante 20 pases. A continuación se realizó la digestión enzimática con 1 gota de solución de proteinasa K (0.2 mg/ml) al tejido y colocar las laminillas a 42 °C durante 10 minutos en el termoblock. El siguiente paso consistió en lavar los residuos de proteinasa K con agua destilada y bloquear la actividad de la peroxidasa endógena con 2 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3%, durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). A continuación se eliminó el exceso de peróxido y se procedió a deshidratar el tejido, esto se logró sumergiendo las laminillas 20 pases en: agua destilada, alcohol etílico 50°, alcohol 70° y alcohol 96°. Posteriormente, se secaron las laminillas a temperatura ambiente, enseguida se colocaron sobre el tejido de 7 a 10 µl de la sonda por cada caso, a una concentración de 17.04 µg/ml, y se empalmaron dos laminillas con capilaridad, o bien, se agregaron 5-10 µl (dependiendo del tamaño de la muestra) directamente sobre el tejido y se colocaron cubreobjetos de aproximadamente 0.5x0.5 cm, los cuales previamente se sumergieron en alcohol ácido al 1% y se enjuagaron con agua destilada, para su limpieza. Posteriormente, las laminillas se

\* DakoCytomation, Estados Unidos

colocaron en el termoblock a 94.5 °C, durante 10 minutos para que se realizara la desnaturalización del ADN y a continuación a 37°C para hibridar la sonda con la secuencia complementaria durante la noche. Las laminillas se sometieron a 4 lavados con solución amortiguada de tris (TBS\*, pH 7.5) y se mantuvieron en esa solución durante un tiempo mínimo de 15 minutos. Cuando se utilizaron cubreobjetos, las laminillas se sumergieron varias veces en TBS hasta que el cubreobjetos se desprendió. Al término de este paso, se preparó la solución de astringencia\* (0.015 M NaN<sub>3</sub>), realizando una dilución 1:50 del producto comercial con agua destilada estéril. Se realizó un lavado con 50 µl de la solución de astringencia a 40 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se llevaron a cabo 4 lavados con TBS.

Para la detección de la reacción, se emplearon dos sistemas:

a) Sistema de amplificación de la señal catalizada (CSA)

Se incubaron las muestras con 50 µl de estreptavidina/biotina\* y se colocaron las laminillas en el termoblock a 37 °C, durante 20 minutos. Posteriormente se removieron los residuos de estreptavidina realizando 4 lavados con TBS. A continuación, se incubaron con el complejo tiramida/biotina\* durante 20 min a TA. Se realizaron 4 lavados con TBS y se añadió al tejido una gota de estreptavidina fosfatasa alcalina\* y se dejó incubar 20 min a TA. El revelado se realizó con 20 µl de una solución 1:50 de deaminobencidina\* con agua estéril, para obtener la coloración café tabaco, la cual se vigiló en el microscopio. Se detuvo la reacción enjuagando las laminillas con agua destilada.

b) Sistema fosfatasa alcalina (AP)

Se incubaron las muestras con 50 µl del conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina\*, durante 30 minutos a 37 °C. Se realizaron 4 lavados con TBS y se reveló la reacción agregando 2 gotas del cromógeno NBT/BCIP\* (N<sub>2</sub>N-dimetilformamida al 1.7%), el cual se dejó actuar por 30 minutos, vigilando cada 10 minutos la reacción en el microscopio. La reacción se detuvo enjuagando las laminillas con agua destilada.

Finalmente, independientemente del sistema utilizado, se contrastó la reacción sumergiendo las laminillas 30 segundos en light green al 3%. Las laminillas se enjuagaron

---

\* DakoCytomation, Estados Unidos

con alcohol del 96 y se dejaron secar a TA para después montarlas con resina sintética (Entellan) y el cubreobjetos correspondiente.

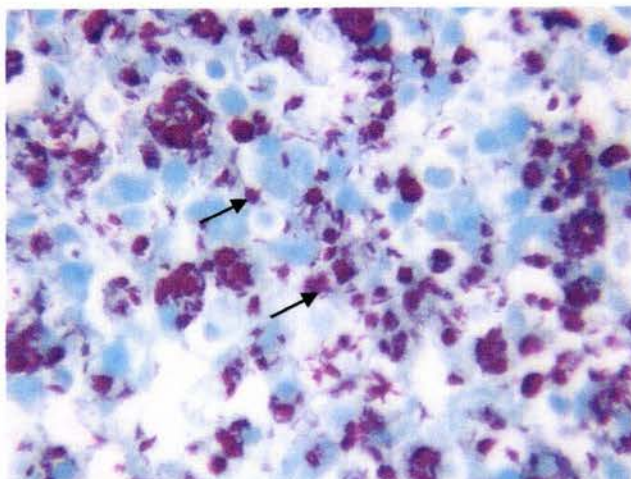
### **5.5 Prueba estadística**

Los resultados se sometieron a una prueba de diferencia entre proporciones en el programa Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa Ok. EU) en el que se compararon entre sí los grupos C y D, con un nivel de confianza del 95%.



## 6. RESULTADOS

El caso de tuberculosis intestinal resultó positivo a la tinción de ZN (Figura 2) y negativo a Hibridación *in situ* (HIS) empleando la IS900 como sonda. Por lo tanto, se comprobó la especificidad de la sonda y del protocolo empleado.



**Figura 2. Caso A0318. Tuberculosis intestinal en el que se destaca la presencia de abundante cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes. ZN, 40x.**

Por medio de hibridación *in situ* la reacción positiva a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* se observó de manera intracelular en macrófagos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas localizadas en la mucosa y submucosa intestinal. En los casos de los grupos A, B y C la reacción positiva se observó dentro de los granulomas, mientras que en el grupo D se apreció dentro de escasos macrófagos que constituyen el infiltrado inflamatorio. Esta reacción positiva se aprecia de manera granular e intracitoplasmática. En aquellas células con abundante cantidad de micobacterias la reacción coalesce y se aprecia de manera difusa en el citoplasma, esto se observó principalmente en los casos del grupo A. (Figura 2 y 3)

En el grupo A, 8 de 8 (100%) de los casos resultaron positivos por medio de HIS (Cuadro 1), mientras que 4 de 4 (100%) de las muestras del grupo B resultaron positivas por este método. En 3 casos del grupo B, no se observó reacción positiva, lo que probablemente se puede atribuir a errores en la selección y/o corte del área de muestra, así como al desgaste de los bloques que ocasiona pérdida de la mucosa y que la lesión observada en el HE no corresponda a la presente en la laminilla de la HIS. Desafortunadamente este

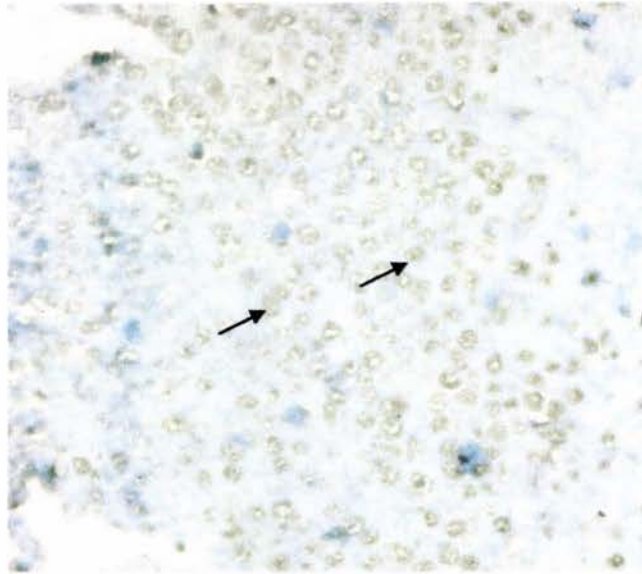
desgaste de los bloques no permitió que se volviera a analizar los mismos casos para verificar si se trata de casos negativos. (Cuadro 2)

**Cuadro 1. Grupo A: Paratuberculosis ZN(+)**

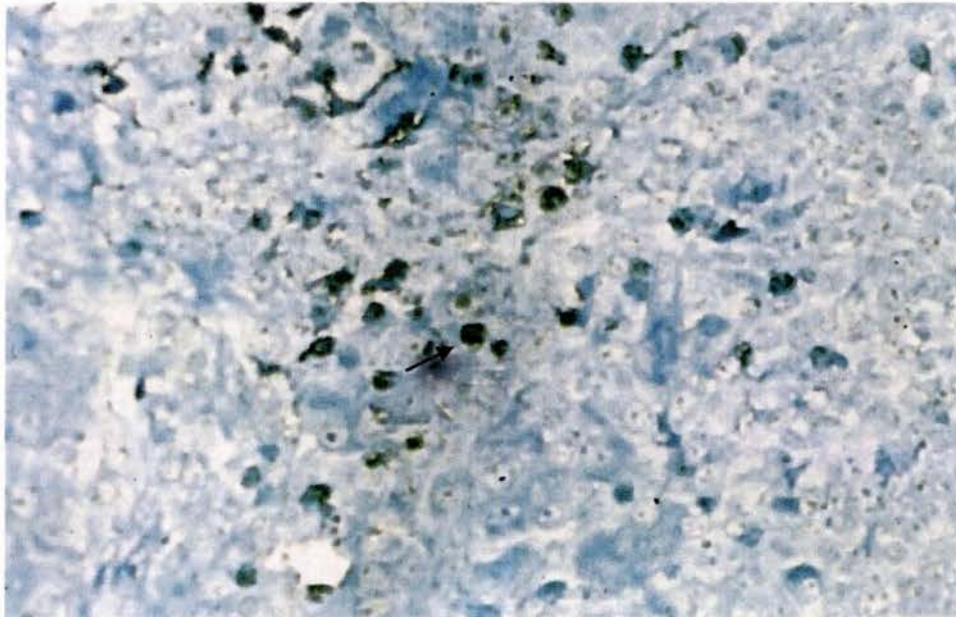
| Número de Caso | Ziehl Neelsen | Hibridación <i>in situ</i> |
|----------------|---------------|----------------------------|
| T94 4 04       | +             | +                          |
| T94 4 26       | +             | +                          |
| T94 4 27       | +             | +                          |
| T94 4 48       | +             | +                          |
| T94 4 126      | +             | +                          |
| T94 4 374a     | +             | +                          |
| T98 36a        | +             | +                          |
| Tb 03 10       | +             | +                          |

**Cuadro 2. Grupo B: Paratuberculosis ZN(-)**

| Número de Caso | Ziehl Neelsen | Hibridación <i>in situ</i> |
|----------------|---------------|----------------------------|
| T94 4 09       | -             | -                          |
| T94 4 31       | -             | +                          |
| T94 4 52       | -             | +                          |
| T94 4 69       | -             | +                          |
| T94 4 97       | -             | +                          |
| T94 4 511      | -             | -                          |
| T94 4 725      | -             | -                          |



**Figura 3. Caso T94 4 374a. EJ multibacilar en el que se distingue abundante reacción positiva en la submucosa intestinal. HIS CSA, 40x.**



**Figura 4. Caso Tb 03 10, del grupo A. La reacción positiva se observa de manera difusa en macrófagos. HIS CSA, 40x.**

En el grupo C (enfermedad de Crohn granulomatosa) el 100% de los pacientes y el 80% de las muestras fueron positivas a Map por medio de HIS. (Cuadro 3) Asimismo, en el grupo D (presentación no granulomatosa) 3 de 8 (37.5%) de los pacientes y 30.77% de las muestras fueron positivas, por la misma técnica. (Cuadro 4)

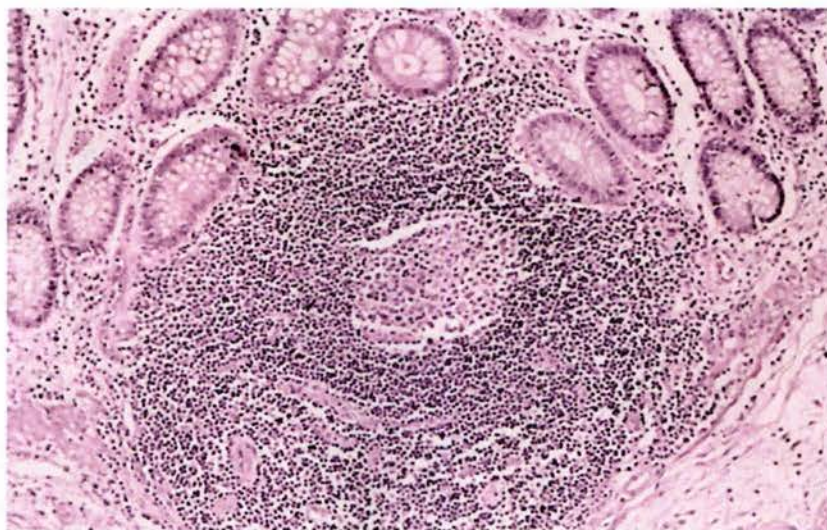
**Cuadro 3. Grupo C: Enfermedad de Crohn granulomatosa.**

| Número de Caso | Ziehl Neelsen | Hibridación <i>in situ</i> |
|----------------|---------------|----------------------------|
| Q93 4602 I     | -             | +                          |
| Q94 1688 C     | -             | +                          |
| Q96 4383 D     | -             | -                          |
| Q96 4383 F     | -             | +                          |
| Q97 956 J      | -             | +                          |
| Q97 2158 B     | -             | +                          |
| Q97 2158 E     | -             | +                          |
| Q97 2474 E     | -             | +                          |
| Q98 689 A      | -             | +                          |
| Q98 689 C      | -             | -                          |

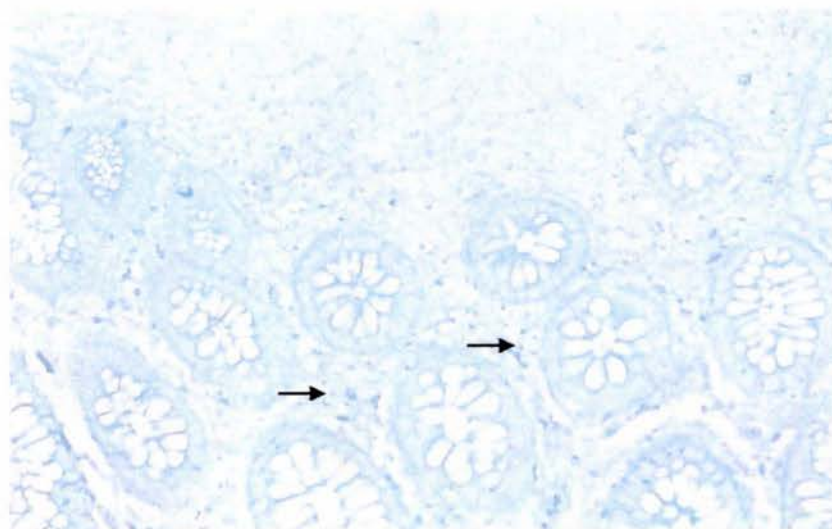
**Cuadro 4. Grupo D: Enfermedad de Crohn no granulomatosa.**

| Número de Caso | Ziehl Neelsen | Hibridación <i>in situ</i> |
|----------------|---------------|----------------------------|
| Q94 1688 H     | -             | +                          |
| Q94 4043 A     | -             | -                          |
| Q94 4043 B     | -             | -                          |
| Q96 4678 A     | -             | +                          |
| Q96 4678 B     | -             | +                          |
| Q97 456 K      | -             | +                          |
| Q97 1688 D     | -             | -                          |
| Q98 1460 E     | -             | -                          |
| Q98 1460 F     | -             | -                          |
| Q98 4154       | -             | -                          |
| Q00 3829 H     | -             | -                          |
| Q00 3829 J     | -             | -                          |
| Q00 3829 N     | -             | -                          |

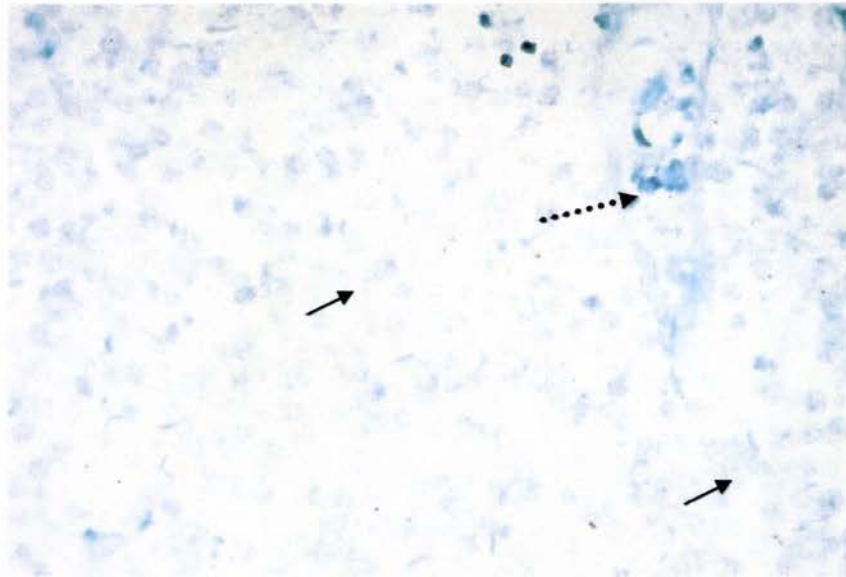
De los 8 pacientes en que se analizó más de una muestra, en 3 casos ambas muestras fueron positivas, en 3 casos (37.5%) todas las muestras fueron negativas y en 2 casos (25%) una de las muestras fue positiva y la otra negativa. Del total de pacientes, 9 (64.28%) resultaron positivos a Map por medio de HIS. (Figuras 5, 6, 7, 8 y 9)



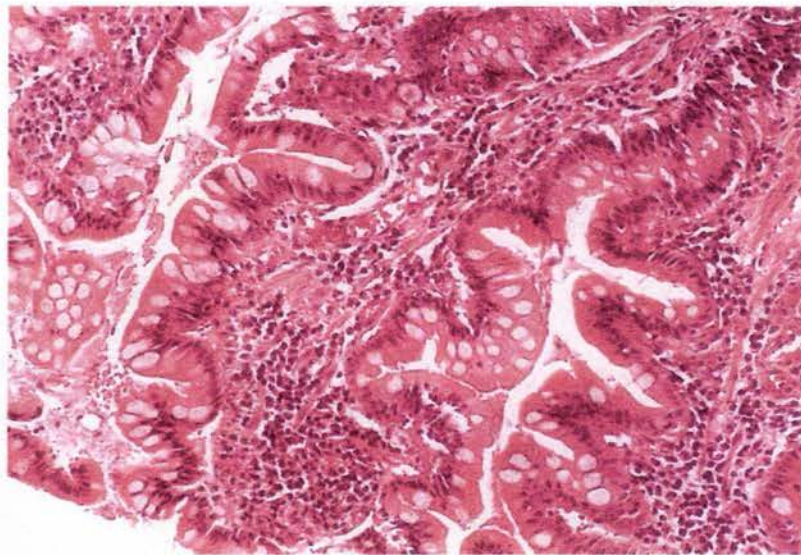
**Figura 5. Caso Q97-2158, del grupo C. Se aprecia enteritis granulomatosa moderada multifocal. HE, 10x.**



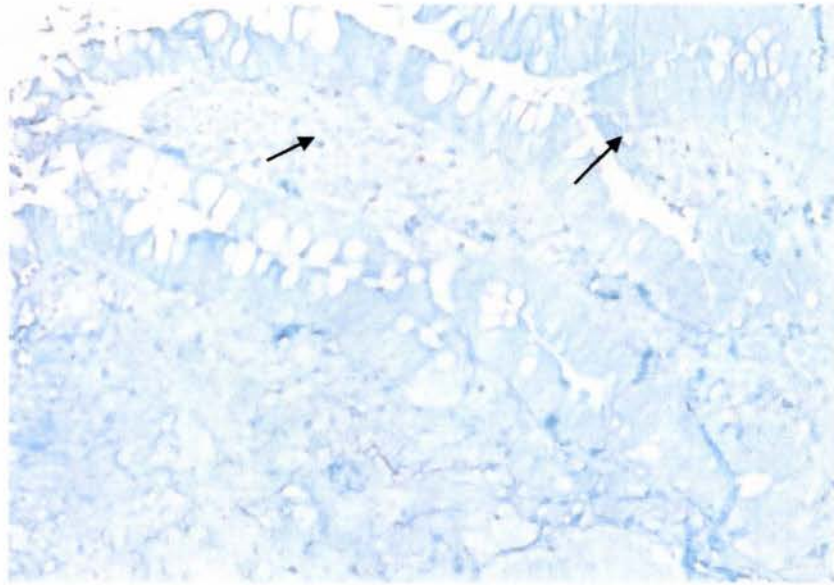
**Figura 6. Caso Q97-2158. Se observa discreta reacción positiva en macrófagos en la periferia de las glándulas. HIS AP, 10x.**



**Figura 7. Caso Q97-2158. Granuloma en submucosa en un caso de EC, la flecha punteada señala eritrocitos negativos y se destaca la reacción positiva en macrófagos. HIS AP, 40x.**

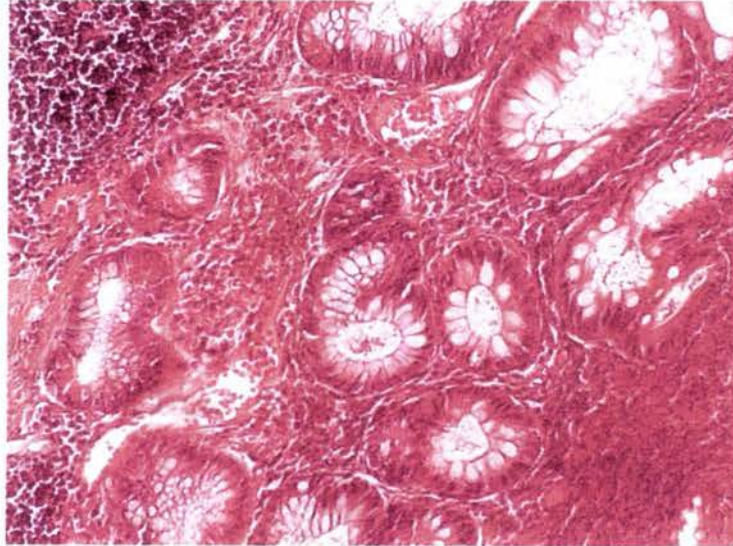


**Figura 8. Caso Q97-2474, del grupo C. Se aprecia abundante cantidad de infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos y linfocitos. HE. 10x.**

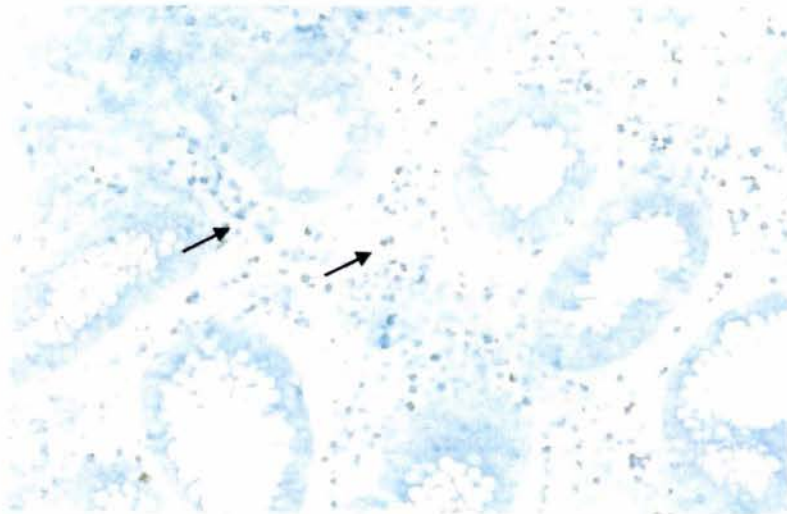


**Figura 9. Caso Q97-2474. Se distingue reacción positiva en algunos macrófagos en la punta de las vellosidades intestinales. HIS AP, 10x.**

Es importante realizar una revisión del corte histológico teñido con HE después de realizar la Hibridación *in situ* para comprobar que la reacción observada no corresponda a un falso positivo como se puede apreciar en aquellos casos con abundante cantidad de eritrocitos en la sección. (Figuras 10 y 11)



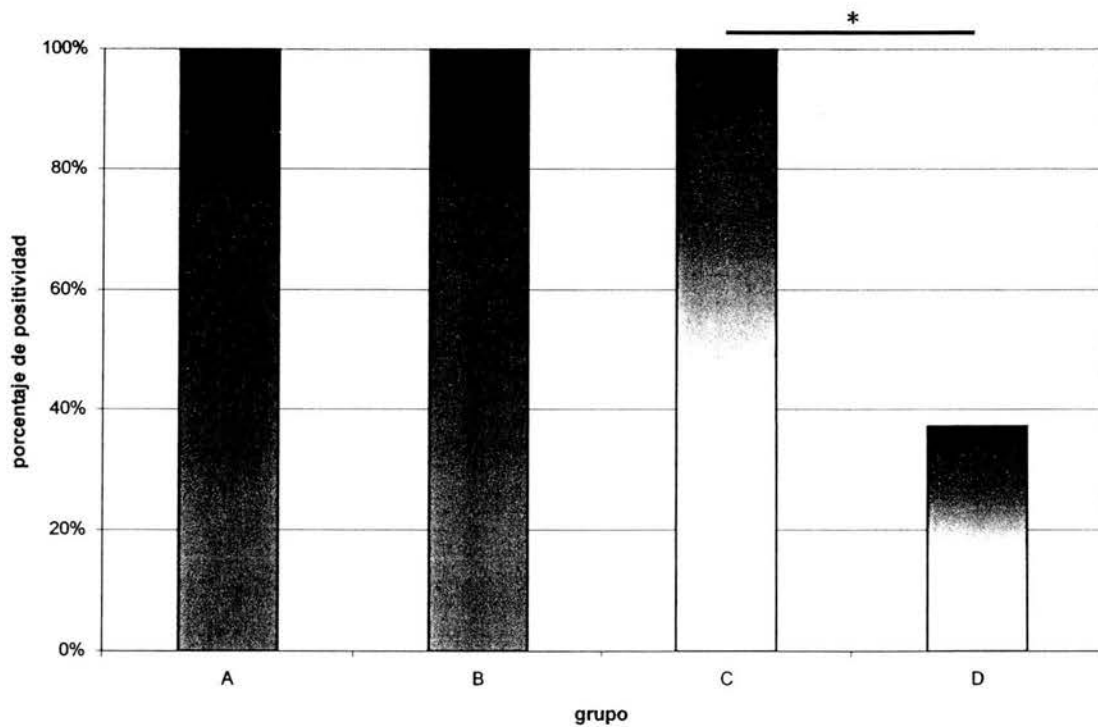
**Figura 10. Caso Q98-1460 E, del grupo D. Se distingue hemorragia grave zonal. HE, 10x.**



**Figura 11. Caso Q98-1460 E. Se aprecia reacción falsa positiva en eritrocitos. HIS AP, 10x.**



El análisis estadístico de los resultados observados en los pacientes con enfermedad de Crohn, permite afirmar que en el grupo de los pacientes con presentación granulomatosa (grupo C) existe una mayor proporción de casos positivos a HIS con respecto al grupo con presentación no granulomatosa (grupo D) ( $p=0.0239$ ).



**Figura 12. Resultados de la Hibridación *in situ*. \* Diferencia estadística, con un nivel de confianza del 95%**

## 7. DISCUSIÓN

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el sistema de detección de señal simple (fosfatasa alcalina AP). De acuerdo con el laboratorio fabricante, el sistema de amplificación de la señal catalizada (CSA) posee una mayor sensibilidad; sin embargo, en este estudio se observó que la deaminobencidina reacciona casi inmediatamente, por lo que es difícil detener la reacción antes de que se precipite este cromógeno. Para obtener mejores resultados se requiere ensayar con múltiples diluciones de la sonda, para encontrar la concentración ideal que permita emplear este sistema de detección de señal.

En todos los casos, la reacción positiva se apreció de manera granular e intracitoplasmática, como corresponde al patrón de tinción esperado para bacterias intracelulares como micobacterias y *Chlamydomphila* sp.,<sup>139</sup> el cual coincide con lo descrito por Thoresen *et al*,<sup>43</sup> Hulten *et al*<sup>44, 95</sup> y Meijer *et al*.<sup>139</sup>

En el grupo A, los casos correspondían a la presentación multibacilar de la enfermedad de Johne, por lo que se puede asumir que gran parte de la reacción observada en la hibridación corresponde a formas bacilares de Map. Los casos de paratuberculosis del grupo B, así como los casos de enfermedad de Crohn (grupos C y D), todos negativos a ZN, en los que se observó reacción positiva por medio de hibridación *in situ*, indican que el ADN identificado pudiera corresponder a formas deficientes de pared celular (esferoplastos). Por lo tanto, se sugiere que el protocolo de hibridación *in situ* utilizado en esta tesis permite identificar ambas formas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* debido a que el tratamiento de digestión enzimática empleado es capaz de penetrar la pared celular micobacteriana sin alterar la arquitectura tisular del intestino de rumiantes y humanos.

Hulten *et al*<sup>44</sup> previamente demostraron la presencia de esferoplastos en el interior de macrófagos y células gigantes en granulomas intestinales de bovinos con enfermedad de Johne. En el presente estudio se logró detectar señal positiva en un gran porcentaje de casos de paratuberculosis sin evidencia de bacilos ácido alcohol resistentes (grupo B), los cuales habían sido diagnosticados como paratuberculosis por medio de pruebas serológicas e histopatológicas.

La identificación, por medio de HIS, de casos positivos a Map en una gran proporción de casos de los grupos C y D son consistentes con los hallazgos del estudio de Hulten *et al*<sup>95</sup> en el que demostraron la presencia de esferoplastos en 7 de 37 (18.91%) de los pacientes de Crohn analizados. De la misma manera, Sechi *et al*<sup>96</sup> afirman haber demostrado, por medio de HIS, la presencia de esferoplastos de Map en 35 de 48 (72.91%) de los pacientes con EC; aunque este último artículo ha sido criticado severamente por no haber encontrado positividad a Map por medio de PCR IS900 en las mismas muestras.

Aunque la literatura suele clasificar clínicamente a los pacientes con EC de acuerdo a la presentación fistulosa u obstructiva, en esta pequeña revisión de casos clínicos observamos que el mismo paciente puede manifestar ambas presentaciones en distintos segmentos intestinales, por lo que probablemente no sea un buen criterio de clasificación, pero si de pronóstico del segmento intestinal afectado. La mayoría de los estudios de patología molecular en enfermedad de Crohn, no hacen diferenciación entre pacientes con presentación granulomatosa y no granulomatosa. Los resultados obtenidos en esta tesis señalan que una mayor proporción de pacientes con presentación granulomatosa son positivos a Map, esta observación coincide con lo descrito en el artículo de Hulten *et al*<sup>95</sup> en el que 6/15 (40%) de las pacientes con presentación granulomatosa y 1/22 (4.54%) de aquellos con presentación no granulomatosa de la enfermedad de Crohn fueron positivos a Map por medio de HIS.<sup>95</sup> A diferencia del estudio de Hulten *et al*, en este estudio la positividad de la HIS si se observó en relación a las lesiones granulomatosas de los pacientes con enfermedad de Crohn.

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) es considerado como un patógeno para varias especies animales, entre las que se incluyen primates.<sup>22</sup> Map no es considerado como un agente patógeno para los humanos, a pesar de que se ha identificado su capacidad para generar linfadenitis granulomatosa en un niño que posteriormente desarrolló ileitis compatible con enfermedad de Crohn,<sup>137</sup> así como infección generalizada en un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida.<sup>138</sup> Por medio de aislamiento bacteriológico, serología y técnicas de biología molecular se ha podido detectar la presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en una mayor proporción de pacientes con enfermedad de Crohn (EC) que en los controles; sin embargo, la inconsistencia de los resultados no ha permitido establecer el papel de esta

micobacteria en la patogenia la enfermedad. Esta disparidad en los resultados puede deberse a varios factores; entre ellos la aplicación de distintas metodologías.<sup>41</sup> Vale la pena resaltar que los aislamientos exitosos han sido realizados por micobacteriólogos con formación veterinaria<sup>86, 87, 88</sup> ya que los laboratorios de medicina humana no realizan rutinariamente el cultivo de micobacterias dependientes de micobactina<sup>138</sup> y, por lo tanto, no disponen de los medios necesarios para el aislamiento bacteriológico; además, en los casos en los que se ha logrado el cultivo, el aislamiento primario consiste en formas deficientes de pared celular, que para revertir a formas bacilares requieren de tiempos de incubación que pueden prolongarse por años.<sup>84</sup> La diversidad de resultados obtenidos por medio de la técnica de PCR utilizando como marcador genético la IS900, se puede atribuir en parte a diferencias en el protocolo, así como a la utilización de distintos iniciadores. En los estudios de PCR en los que se ha implementado un paso de disrupción mecánica se ha observado que se incrementa la sensibilidad de esta prueba, al facilitar el rompimiento de la pared celular micobacteriana.

Si bien, Greenstein<sup>113</sup> afirma que la identificación de ADN de Map no puede probar la asociación causal de esta micobacteria en la enfermedad de Crohn, al considerar que podría ser una coincidencia que el ADN micobacteriano se encontrara en el lumen intestinal de las personas que ingirieron leche de vacas con paratuberculosis.<sup>113</sup> En el presente estudio, al utilizarse una técnica de diagnóstico *in situ*, es posible identificar si el ADN detectado estuvo asociado con la lesión observada. De esta manera, este y otros trabajos<sup>47</sup> han detectado la presencia de Map en relación con los sitios de reacción inflamatoria, por lo que se puede deducir que no sea un contaminante, sino que esta micobacteria es la responsable de la respuesta inmunológica observada, sobre todo en los casos del grupo C en los que las lesiones histológicas son similares a las observadas en los rumiantes con paratuberculosis.

A pesar de que se requiere evaluar un mayor número de muestras de pacientes mexicanos, estos resultados iniciales son consistentes con la exposición de la población mexicana a Map. Considerando a la paratuberculosis como un probable riesgo para la salud pública, el gobierno del Reino Unido ha decidido tomar medidas preventivas para evitar el ingreso de animales con esta enfermedad, así como sus productos, en la cadena alimenticia de los humanos. Por su parte, en los Estados Unidos diversos grupos de investigadores pretenden que estas medidas sean aplicadas también en su país. Con

base a lo anterior, se recomienda que en México se realice una mayor investigación al respecto y se enfatice la importancia de la prevención y control de la paratuberculosis, por su repercusión zoonosaria y económica; pero también porque existe evidencia que señala a esta enfermedad como una zoonosis potencial.

## 8. LISTA DE ABREVIATURAS

|                |                                                                                             |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| AP:            | Fosfatasa alcalina [ <i>Alkaline Phosphatase</i> ]                                          |
| CSA:           | Amplificación catalizada de la señal [ <i>Catalyzed Signal Amplification</i> ]              |
| CU:            | Colitis ulcerosa                                                                            |
| EC:            | Enfermedad de Crohn                                                                         |
| EJ:            | Enfermedad de Johne                                                                         |
| ELISA:         | Inmunoadsorción ligada a enzimas [ <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ]               |
| HIS:           | Hibridación <i>in situ</i>                                                                  |
| HE:            | Hematoxilina eosina                                                                         |
| HTST:          | Altas temperaturas, tiempos cortos [ <i>High Temperature Short Time</i> ]                   |
| IBD:           | Enfermedad inflamatoria intestinal [ <i>Inflammatory Bowel Disease</i> ]                    |
| IDGA:          | Inmunodifusión en gel agar                                                                  |
| IDR:           | Intradermorreacción                                                                         |
| IFN $\gamma$ : | Interferón gamma                                                                            |
| IS900:         | Secuencia de inserción 900                                                                  |
| Map:           | <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>                                   |
| MGIT:          | Tubo indicador de crecimiento micobacteriano [ <i>Mycobacterian Growth Indicator Tube</i> ] |
| ufc:           | Unidades formadoras de colonia                                                              |
| PCR:           | Reacción en cadena de la polimerasa [ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ]                    |
| pTb:           | Paratuberculosis                                                                            |
| Tb:            | Tuberculosis                                                                                |
| ZN:            | Ziehl Neelsen                                                                               |

## 9. ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Secuencia nucleotídica de la IS900 .....           | 40 |
| Figura 2. Caso A0318. ZN .....                               | 43 |
| Figura 3. Caso T94 4 374a. HIS CSA .....                     | 45 |
| Figura 4. Caso Tb 03 10, del grupo A. HIS CSA.....           | 45 |
| Figura 5. Caso Q97-2158, del grupo C. HE .....               | 47 |
| Figura 6. Caso Q97-2158. HIS AP.....                         | 47 |
| Figura 7. Caso Q97-2158. HIS AP .....                        | 48 |
| Figura 8. Caso Q97-2474, del grupo C. HE .....               | 48 |
| Figura 9. Caso Q97-2474. HIS AP .....                        | 49 |
| Figura 10. Caso Q98-1460 E, del grupo D. HE .....            | 50 |
| Figura 11. Caso Q98-1460 E. HIS AP.....                      | 50 |
| Figura 12. Resultados de la Hibridación <i>in situ</i> ..... | 51 |

## 10. ÍNDICE DE CUADROS

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Grupo A: Paratuberculosis ZN(+) .....               | 44 |
| Cuadro 2. Grupo B: Paratuberculosis ZN(-) .....               | 44 |
| Cuadro 3. Grupo C: Enfermedad de Crohn granulomatosa.....     | 46 |
| Cuadro 4. Grupo D: Enfermedad de Crohn no granulomatosa ..... | 46 |

## 11. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. History in: Johnes Information Center. University of Wisconsin, School of Veterinary Medicine. Collins MT, Manning E. Disponible en: <http://www.johnes.org/history/index.html>. Consultado en septiembre de 2003.
2. History of paratuberculosis. Disponible en: <http://www.husdyr.kvl.dk/hdm/ssn/history.htm>. Consultado en septiembre de 2003.
3. Chiodini RJ. Historical overview and current approaches in determining a mycobacterial etiology of Crohn's disease. Is Crohn's disease a mycobacterial disease. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1992, pp 1-15.
4. Collins DM, Gabric DM and de Lisle GW. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett 1989;60:175-178.
5. Stevenson K, Sharp JM. The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* research. Vet J. 1997;153(3):269-286.
6. Thorel MF, Krichevsky M, Lévy-Frébault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol 1990;40(3):254-260.
7. Wells SJ, Ott SL, Garber LP, Bulaga LL, Johnes disease on US dairy operations: Results of the NAHMS Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis 1996 septiembre 29-octubre 04, Madison, Wisconsin, International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 1997:
8. Dargatz DA, Wells SJ. Johnes disease on U.S. Beef Operations: results from the NAHMS Beef 97 Study. Proceedings of the 6th international Colloquium on paratuberculosis; 1999 febrero14-18; Melbourne, Australia: International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 1999: 59-61.
9. Unzueta RJ. Contribucion al estudio de la enteritis paratuberculosa bovina en Mexico. 1936. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
10. Vélez M, Domínguez M, Del Río J, Trigo F, Suárez F, Chávez G. Control of paratuberculosis in two goat flocks. Proceedings of the 6th international Colloquium on paratuberculosis; 1999 febrero14-18; Melbourne, Australia: International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 1999: 121-125.
11. Vélez M, Yela I, Suárez F, Collins MT, Chávez G. Paratuberculosis in goats: comparison between serological diagnosis by AGI and ELISA tests. Proceedings of the 6th international Colloquium on paratuberculosis; 1999 febrero14-18; Melbourne, Australia: International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 1999: 444-448.
12. Juárez F, Almeida L, Avilés J, Mendoza B. Incidencia de la paratuberculosis ovina en 2 rebaños del estado de Sinaloa. XVIII Congreso Nacional de Buiatría.



Noviembre 1993. Mexico D.F. Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos A.C. 1993 : 66. Disponible en : [www.uasnet.mx/centro/profesional/emvz/61-70.htm#PP66](http://www.uasnet.mx/centro/profesional/emvz/61-70.htm#PP66). Consultado el 08/04/2004

13. Juste RA, Garrido JM, Aduriz G. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. *Bovis* 2000;93:13-28.
14. Hirsh DC. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*Mycobacterium paratuberculosis*) in: Hirsh DC, Zee YC. *Veterinary Microbiology*. Blackwell science Inc, U.S.A. 1999.
15. Juste RA, Marco JC, Saez de Ocariz C, Aduriz JJ. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*. 1991;28(4):385-390.
16. Snyder L and Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria*. ASM Press. 2<sup>nd</sup> edition. U.S.A. 1997.
17. Bull T, Hermon-Taylor J, Pavlik I, El-Zaatari F, Tizard M. Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology-Reading* 2000;146(9):2185-2197.
18. Green E, Tizard M, Moss M, Thompson J, Winterbourne D, McFadden J, Hermon-Taylor J. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res* 1989;17(22):9063-9073
19. Collins M and Manning E. *Biology of M. paratuberculosis*. *Johne's Information Center*. University of Wisconsin. School of Veterinary Medicine. Available in: <http://www.johnes.org/biology.html>
20. Collins CH, Grange JM and Yates MD. *Mycobacteria in water*. *J Appl Bacteriol* 1984; 57:193-211.
21. Collins M and Manning E. *Survival of M. paratuberculosis*. *J. Johne's Information Center*. University of Wisconsin. School of Veterinary Medicine. Available in: <http://www.johnes.org/biology/survival.html>
22. Yayo W, Macháčková and Pavlík I. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet Med* 2001;46(7-8):205-224.
23. Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D *et al.* Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(4):1517-1521.
24. Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol* 2001;79(4):311-322.
25. Stabel JR. Johne's disease and milk: do consumers need to worry? *J Dairy Sci* 2000;83(7):1659-1663.

26. Seitz SE, Heider LE, Heuston WD, Bech-Nielsen S, Rings DM, Spangler L. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194(10):1423-1426.
27. Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am J Vet Res* 1992; 53(4):477-480.
28. Pavlik I, Vesely T, Bartl J, Horvathova A, Matlova L, Vrbas V, *et al.* Reliability of Diagnostic Method (Clinical examination, faecal culture, skin and serological tests) for paratuberculosis of cattle and sheep during 1988-1998 eradication and control programme. Proceedings of the 7th Int Colloquium on paratuberculosis; 2002 junio; Bilbao, España: International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 2003:371-382.
29. Stehman SM. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996;12(2):441-455.
30. Mahmoud OM, Haroun EM, Elfaki M and Abbas B. Pigmented paratuberculosis granulomata in the liver of sheep. *Small Ruminant Res* 2002;43(3):211-217.
31. Burrells C, Clarke CJ, Colston A, Kay JM, Porter J, Little D, Sharp JM. A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998; 66(3-4):343-358.
32. Perez V, Garcia Marin JF, Badiola JJ. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol.* 1996;114(2):107-122.
33. Corpa JM, Garrido J, García Marín JF and Pérez V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol* 2000; 122:255-265.
34. Buergelt CD and Ginn PE. The histopathological diagnosis of early Johne's disease. Proceedings of the 6th international Colloquium on paratuberculosis ; 1999 febrero14-18 ; Melbourne, Australia : International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 1999 : 400-406.
35. Sigurdardóttir ÓG, Press McL, Saxegaard F and Evensen O. Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 1999;36:542-550.
36. Huda A, Lind P, Christoffersen AB and Jungersen G. Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet Immunol and Immunopathology* 2003; 94(3-4):95-103.
37. Stabel JR and Whitlock. IFN $\gamma$  assay. *Vet Immunol and Immunopathol* 2001;79:69-81.
38. Stewart DJ, Stiles PL, Whittington RJ, Lambeth C, Windsor PA, Reddacliff LA, *et al.* Validation of the interferon- $\gamma$  test for diagnosis of ovine Johne's disease: sensitivity and specificity field trials. Proceedings of the 7th Colloquium on paratuberculosis. 2002 junio; Bilbao, España. International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 2003:148-153.

39. Hope AF, Kluver PF, Jones SL, Condrón RJ. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 2000 Dec;78(12):850-6.
40. Mason O, Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Use of immunomagnetic PCR (IMS-PCR) to aid the diagnosis of Johne's disease. *Proceedings of the 6th Int Colloquium on Paratuberculosis; 1999 febrero 14-18; Melbourne, Australia: International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 1999:413-419*
41. Chiodini RJ. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2:90-117.
42. Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW and van Tiem J. ELISA and fecal culture: sensitivity and specificity of each method. *Proc of the Sixth Int Colloquium on Paratuberculosis; 1999 febrero 14-18; Melbourne, Australia: International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 1999:353-362.*
43. Thoresen OF, Falk K, Evensen Ø. Comparison of immunohistochemistry, acid fast staining and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J Vet Diagn Invest* 1994;6:195-199.
44. Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HMT, 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 of Microbiol Meth* 2000;42:185-195.
45. Aufses AH. The history of Crohn's disease. *Surg Clin North Am* 2001; 81(1):1-11.
46. Dalziel TK. Chronic interstitial enteritis. *BMJ* 1913; 2:1068-1070.
47. Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HMT, Schwartz MR, Naser S and El-Zaatari FAK. Review Article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2001, 15, 000-000.
48. Crohn BB, Ginzburg L and Oppenheimer GD. Regional Ileitis: A pathological and clinical entity. *JAMA* 1932:1323-1329.
49. Colp R. A case of non-specific granuloma of the terminal ileum and cecum. *Surg Clin North Am* 1934;14:443-449.
50. Armitage G, Wilson M. Crohn's disease: A survey of the literature and a report on 34 cases. *BR J Surg* 1950;38:182-193.
51. Jinch H, Rojas E y de Castro R. Enteritis regional en México. *Gaceta Médica de México* 1967, 97(6):681-689)
52. Chiodini RJ. Crohn's disease: A potential zoonosis? *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 1996; 2(2):457-467.
53. Hermon-Taylor J. The Causation of Crohn's Disease and Treatment with Antimicrobial Drugs. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30(6):607-610.
54. Papadakis KA and Targan SR. Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28(2):283-294.
55. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patología estructural y funcional.* Mc Graw Hill Interamericana. 5a ed. Madrid, España. 1995: 888-894.

56. Andres PG and Lawrence SF. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28(2):255-278.
57. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. : *Eur J Radiol*. 2000; 35(3): 154-167.
58. Souza MH, Troncon LE, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospice in southeastern Brazil. *Arq Gastroenterol* 2002 ;39(2) :98-105. Disponible en : [www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=5004-2832002000200006&lng=en&nrm1ISSN004-2803](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=5004-2832002000200006&lng=en&nrm1ISSN004-2803). Consultado el 08/04/2004.
59. Loftis EV, Silvestein MC, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS and Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted Country, Minnesota 1940-1993: Incidence Prevalence and Survival. *Gastroenterology* 1998; 114:1161-1168.
60. Andrews J, Goulston K. Inflammatory bowel disease: Its history, current status, and outlook. *Med J Aust* 1994;160:219.
61. Pérez E., Sobrino S., García V.A.m Abdo M., Murguía D., Bernal F. Enfermedad de Crohn. Experiencia médico-quirúrgica. Estudio retrospectivo de 10 años. *Revista Gastroenterología México* 1992; 57(1): 21-26.
62. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetic versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study 1996.
63. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Plson JM, Lee JC, Beaugerie L *et al*. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's diseases on chromosome 16. *Nature*. 1996;379:821-822.
64. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, *et al*. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357(9272):1925-1928.
65. Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Heresbach D, Lin XY, Fisher S, Katz S, *et al*. Differences in Risk of Crohn's disease in offspring of mothers and fathers with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(12):2241-2244.
66. Murphy SK, Jirtle RL. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* 2003; 25(6):577-88.
67. Kosiewicz MM, Krishnan A, Shah M, *et al*. Characterization of a new spontaneous murine model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;114:G4143.
68. Cominelli F, Kontoyiannis D, Pizarro TT, *et al*. Mice carrying and endogenous deletion of the 3'-AU-rich region of the TNF $\alpha$  gene develop a Crohn's disease-like phenotype: A key role of TNF $\alpha$  in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 1998;114:G3911.
69. Korzenik JR and Dieckgraefe BK. Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45(6):1121-1127.
70. Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetical engineered animal models II. IL-10 deficient (IL-10 $^{-/-}$ ) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 28(6):G829-G833.

71. Lavy A, Broide E, Reif S, Keter D, Niv Y, Odes S, *et al.* Measles is more prevalent in Crohn's disease patients. A multicentre Israeli study. *Dig Liver Dis.* 2001; 33(6): 472-476.
72. Mikula C. Measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Gastroenterol Nurs.* 2000; 23(4): 168-171.
73. Van Kruiningen HJ, Mayo DR, Vanopdenbosch E, Gower-Rousseau C, Cortot A and Colombel JF. Virus serology in familial Crohn disease. *Scand J Gastroenterol.* 2000; 35(4): 403-407.
74. Pardi DS, Tremaine WJ, Sandborn WJ, Loftus EV Jr, Poland GA and Melton LJ 3rd. Perinatal exposure to measles virus is not associated with the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 1999; 5(2): 104-106.
75. Afzal MA, Armitage E, Ghosh S, Williams LC and Minor PD. Further evidence of the absence of measles virus genome sequence in full thickness intestinal specimens from patients with Crohn's disease. *J Med Virol.* 2000; 62(3): 377-382.
76. Robertson DJ, and Sandler RS. Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature. *Inflamm Bowel Dis.* 2001; 7(1): 51-57
77. Iizuka M, Chiba M, Yukawa M, Nakagomi T, Fukushima T, Wakatanabo S, *et al.* Immunohistochemical analysis of the distribution of measles related antigen in the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48(1):136-137.
78. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A and Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;108(5):1589-1590.
79. Walmsley RS, Anthony A, Sim R, Pounder Re and Wakefield AJ. Absence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Klebsiella pneumoniae* antigens within inflammatory bowel disease tissues. *J Clin Pathol* 1998;51(9):657-661.
80. Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, *et al.* Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria spp*, *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2002;37(7):509-516.
81. Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I and Chadwick VS. Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(19):1145-1150.
82. Chiba M, Fukushima T, Inoue S, Oiré Y, Iizuka M, Masamune T, *et al.* *Listeria monocytogenes* in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33(4):430-434.
83. Chiodini RJ, Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology* 1984;20:966-971.
84. Chiodini RJ, Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 1986;24:357-363.
85. McFaccen JJ, Butcher PD, Chiodini RJ, Hermon-Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology* 1987;25:796-801.

86. Haagsma J, Mulder DJJ, Eger A, Van Bruin J, Ketel RJ, Tytgat GNJ. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from patients with Crohn's disease in the Netherlands. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1989;24:S159-S168.
87. Gitnick G, Collins J, Beaman B, *et al.* Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. *Digestive Disease Science* 1989; 34:925-932.
88. Graham DY, Markesich DC, Progress in culture and subculture of spheroplasts and fastidious acid bacilli isolated from intestinal tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 1988; 26:1600-1603.
89. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Dirkin 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 of Clin Microbiol* 2003;41(7):2915-2923.
90. Schwartz D, Shafran I, Romero C, Piromalli C, Biggerstaff J, Naser M, *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(6):303.
91. Naser SA, Schwartz D, Shafran I. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastro* 2002;6:1-6.
92. Sanderson JD, Moss MT, Hermon-Taylor J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992; 33:330-396.
93. Cheng J, Bull T, Sumar N, Sheridan J, Dalton P, Finlayson C, Hermon-Taylor J. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in surgical pathology blocks from patients with Crohn's disease in China. *World J Gastroenterol* 2000; 6(3):10.
94. Naser SA, Hulten K, Shafran I, Graham DY and El-Zaatari FAK. Specific Seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proc. of the Sixth International colloquium on paratuberculosis.* 525-528.
95. Hulten.K, El-Zimaity HM, Karttunen TJ, Almashhrawi MR, Schwartz D, Graham DY, *et al.* Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by *in situ* hybridization. *Am J Gastroenterol* 2001,96: 1529-1535.
96. 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 of Clin Microbiol* 2001, 39(12):4514-4517.
97. Mishina D, Katsel P, Brown ST, Gilberts ECAM and Greenstein RJ. On the etiology of Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci. USA*, Septiembre 1996, 93:9816-9820
98. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant Paratuberculosis (Johne's disease):- The current status and future prospects. *Cornell Veterinarian* 1984, 74(3):218-262.
99. Chiodini RJ, Hermon-Taylor J, The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *Journal Veterinarian Diagnostic Investigation* 1993, 5; 629-631.

100. Harris NB, Barletta RG. Map in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(3): 389-512.
101. Sung N, Collins M.T. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 64 (3): 999-1005.
102. Meyers S y Janowitz HD. Complicaciones, enfermedad de Crohn. En: Bockus HL. *Gastroenterología*. Barcelona: Ed. Salvat. 1987:2437-2517.
103. Meyers S y Janowitz HD. Manifestaciones extraintestinales, enfermedad de Crohn. En: Bockus HL. *Gastroenterología*. Barcelona: Ed. Salvat. 1987:2437-2480
104. Grant IR, Ball HJ, Neil SD and Rowe MT. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl Environ Microbiol*. 1996, 62 (2): 631–636.
105. Grant, I.R., Ball, H.J. and Rowe MT. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Letters in Appl Microbiol* 1998: 26 (2), 166-170.
106. Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA1-1993, Bienes Y Servicios. Quesos de Suero. Especificaciones Sanitarias.
107. Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA1-1993, Bienes y servicios. Helados de crema, de leche o grasa vegetal, sorbetes y bases o mezclas para helados. Especificaciones sanitarias.
108. Grant IR, Ball HJ and Rowe MT. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(5):2428-2435.
109. McDowell RM, McElvaine MD. Long term sequelae to foodborne disease. *Rev Sci Tech* 1997;16(2):337-341.
110. MODIFICACION A LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-031-ZOO-1995, CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA (*Mycobacterium bovis*).
111. Merkal RS, Crawford JA, Whipple DL. Heat inactivation of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex organisms in meat products. *Appl Environ Microbiol* 1979;38(5):831-835.
112. Donaldson RM. Enfermedad de Crohn. En: Slesinger F. *Enfermedades gastrointestinales y del hígado*. Madrid: Panamericana. 1998:1332-1345.
113. Greenstein RJ. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis and Johne's disease. *The Lancet Infectious Diseases* 2003;3:507-514.
114. Janowitz HD, Meyers S, Hamilton SR, Morson BC, Marshak RH, Lidner AE, et al. Enfermedad de Crohn. En: Bockus HL, *Gastroenterología*. Barcelona: Ed. Salvat. 1987:2437-2450.
115. Matson AP, Van Kruiningen HJ, West Ab, Cartón RW, Colombel JF and Cortot A. The relationship of granulomas to blood vessel in intestinal Crohn's disease. *Mod Pathol* 1995;8(6):680-685.

116. Wakefield AJ, Sankey EA, Dhillon AP, Sawyerr AM, More L, Pittilo TM *et al.* Granulomatous vasculitis in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991;100(5):1279-1287.
117. Hahn YH. Crohn's disease. Medical College of Wisconsin. Disponible en: <http://chorus.rad.mcw.edu/doc/00844.html>
118. Bortlik M and Lukas M. Toxic megacolon. *Cas Lek Cesk.* 2001;140(20):619-623.
119. Heise W, Kersten O, Kassner KM, Birkenmeyer G, Grosse G and Niedobitek F. Fulminant primary manifestation of Crohn's colitis "Hot Crohn's disease". *J Gastroenterol.* 1997;35(6):481-490.
120. Vivek Raj and Lichtenstein Dr. Hepatobiliary manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroent Clinics of North Am* 1999, 28(2):491-513.
121. Bentur, L, Lachter, J, Koren, I, Ben-Izhak, O, Lavy, A, Bentur, Y, & Rosenthal, E: Severe pulmonary disease in association with Crohn's disease in a 13-year-old girl. *Pediatr Pulmonol* 2000, 29:151-154.
122. Calder, CJ, Lacy, D, Raafat, F, Weller, PH, & Booth, IW. Crohn's disease with pulmonary involvement in a 3 year old boy. *Gut* 1993, 34:1636-1638.
123. Minic, P, Perisic, VN, & Minic, A. Metastatic Crohn's disease of the lung. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998, 27:338-341.
124. Puntis, JW, Tarlow, MJ, Raafat, F, & Booth, IW: Crohn's disease of the lung. *Arch Dis Child* 1990, 65:1270-1271.
125. Valletta E, Bertini M, Sette L, Braggion C, Pradal U and Zannoni M. Early proncopulmonary involvement in Crohn disease: a case report. *BMC Gastroenterol.* 2001; 1(1):13.
126. Bonniere P, Wallaert B, Cortot A, Marchandise X, Riou Y, Tonnel AB, *et al.* Latent pulmonary involvement in Crohn's disease: biological, functional, bronchoalveolar lavage and scintigraphic studies. *Gut* 1986, 27:919-925.
127. Geboes K, Joossens S, Prantera C, Rutgeerts P. Indeterminative colitis in clinical practice. *Curr Diagn Path* 2003; 9:179-187.
128. Frei JV, Morson BC. Medical audit of rectal biopsy diagnosis of inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 1982;35:341-344.
129. Hildebrand H, Fredrikzon B, Holmquist L, Kristiansson B, Lindquist B. Chronic inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;13:293-297.
130. Tanaka M, Satio H, Fukuda S, Sasaki Y, Munakata A and Kudo H. Simple mucosal biopsy differentiating Crohn's disease, ulcerative colitis, and other forms of colitis: measurement of validity. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:281-286.
131. Ekbohm A. Indeterminative IBD: the magnitude of the problem. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:S14-S15.
132. Sasaki Y, Tanaka M, Kudo H. Differentiation between ulcerative colitis and Crohn's disease by a quantitative immunohistochemical evaluation of T lymphocytes, neutrophils, histiocytes and mast cells. *Pathol Int* 2002;52(4):277-285.
133. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patología estructural y funcional.* Mc Graw Hill Interamericana. 5a ed. Madrid, España. 1995: 414-415.



134. Farmer RG, Hamilton SR, Morson BC, Stein GN, Sabri PJ, Fazio VW. Colitis ulcerosa. En: Bockus HL, Gastroenterología. Barcelona: Ed. Salvat:
135. Larsen M. Enfermedad diverticular del colon y sus complicaciones. Disponible en: <http://www.hpc.org.ar/pdf/v4p40.pdf> Citado el día: 03/marzo/2003.
136. (Nuovo) Nuovo GJ. *In situ* Hybridization in: PCR *in situ* Hybridization Protocols and Applications. 2<sup>nd</sup> ed. Lippincott-Raven Publishers. U.S.A. 1996: 100-168.
137. 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. Proceedings of a Grand Round at St. George's Hospital and Medical School. Londres, Inglaterra. Marzo 27, 1997
138. Richter E, Wessling J, Lugerling N, *et al.* *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a patient with HIV, Germany. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:729-731.
139. Meijer A, Roholl PJM, Gielis-Proper SK, Ossewaarde YF. *Chlamydia pneumoniae* in vitro and in vivo: A critical evaluation of in situ detection methods. *J Clin Pathol* 2000; 53:904-910.