ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 54: 97-102 (1994)

RESPUESTA HUMORAL A MICOBACTERIAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN

P. MORGANTE[1], BEATRIZ LOPEZ[2], LUCIA BARRERA[2], VIVIANA RITACCO[3*], ISABEL N. DE KANTOR[3]

[1] *Servicio de Gastroenterología, Sanatorio Güemes;* [2] *Instituto Nacional de Microbiología Carlos Malbrán;* [3] *Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (OPS/OMS), Martínez, Buenos Aires*

Resumen El reciente aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* de lesiones de pacientes con enfermedad de Crohn (EC) reavivó el interés en el posible origen micobacteriano de esta enfermedad. Sin embargo, las evidencias inmunológicas acumuladas en favor de esta hipótesis son poco sólidas. La respuesta específica en la EC podría estar enmascarada por el amplio cruzamiento antigénico que existe entre micobacterias. En este estudio se aplicó un procedimiento propuesto para develar la presencia de anticuerpos anti-*M. paratuberculosis* en la enfermedad de Johne bovina: la absorción de los anticuerpos con reactividad cruzada mediante la preincubación de los sueros con *M. phlei*. Se cuantificó por enzimoinmunoensayo IgG anti-*M. paratuberculosis* en 90 muestras de suero de 17 pacientes con EC, 23 con colitis ulcerosa (CU) y 14 con otras patologías intestinales (OP). Muestras de 86 individuos sanos, con tuberculosis, micobacteriosis o micosis sirvieron como control. Se comparó los resultados con los obtenidos con antígenos de *M. avium* y *M. tuberculosis*. Se observó una discreta reactividad humoral a micobacterias en pacientes con EC, CU y OP. Las alteraciones fueron de muy escasa magnitud y frecuencia en relación con las observadas en pacientes con tuberculosis, micobacteriosis y micosis. La absorción de los sueros no develó una presunta respuesta específica en la EC. Tampoco se detectaron elevaciones en los niveles de anticuerpos de pacientes analizados periódicamente. Estos datos no agregan evidencia sólida a la hipótesis del origen micobacteriano de la EC.

La enfermedad de Crohn consiste en una inflamación granulomatosa del tracto gastrointestinal de etiología desconocida y su diagnóstico se basa en la asociación de una serie de características clínicas, radiológicas, endoscópicas e histopatológicas[27]. Si bien Crohn *et al.*[7] la identificaron definitivamente como una entidad diferente de la tuberculosis intestinal, la idea de su origen micobacteriano nunca fue desechada por completo. Durante la última década esta hipótesis ha resurgido a raíz del aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* a partir de lesiones de pacientes con enfermedad de Crohn. Los microorganismos aislados eran bioquímica y genéticamente idénticos al causante de la enfermedad de Johne bovina, que es un parásito obligado intracelular y un patógeno estricto[8]. Sugestivamente, la enfermedad del rumiante consiste en una reacción granulomatosa transmural del intestino cuyas localización e histopatología presentan notables semejanzas con las de la enfermedad de Crohn[16].

La búsqueda de evidencias inmunológicas de una etiología micobacteriana ha atraido la atención de numerosos grupos de investigación. Grange *et al* [12] hallaron niveles elevados de IgA

Recibido: 11-III-1994 Aceptado: 6-IV-1994

* Miembro de la Carrera de Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Dirección postal: Dra. Isabel N. de Kantor, INPPAZ (OPS/OMS), CC 44, 1640 Martinez, Buenos Aires, Argentina

This One
2QL2-SNP-SF7C
Copyrighted material

e IgM reactivas contra BCG en pacientes con enfermedad de Crohn. En estudios más recientes, Wayne *et al.*[26] también observaron elevación de IgA contra antígenos micobacterianos. Thayer *et al* [24] detectaron respuesta humoral a *M. paratuberculosis*, pero no contra *M. tuberculosis* ni contra *M. kansasii*. Los resultados de estos estudios contrastan con los de Blaser *et al* [3], Cho *et al.*[9], Tanaka *et al* [23] y Stainsby *et al.*[22], quienes no hallaron evidencia de serorreactividad contra antígenos de *M. paratuberculosis*. El análisis de la respuesta inmune celular, tanto *in vitro* de linfocitos periféricos como de reactividad cutánea a antígenos micobacterianos tampoco arrojaron datos concluyentes en esta enfermedad[4, 10, 20].

Las micobacterias poseen antígenos ampliamente compartidos con otros miembros del género, con otros microorganismos y aun con eucariontes. Estas homologías limitan la especificidad de las pruebas que miden la respuesta inmune del huésped[18] y podrían ser responsables de la ambigüedad de los resultados obtenidos en la enfermedad de Crohn. Elsaghier *et al.*[11] hallaron que un alto porcentaje de pacientes con esta enfermedad eran serorreactivos contra proteínas purificadas de *M. paratuberculosis* altamente inmunogenéticas. Un procedimiento más simple —frecuentemente empleado para develar respuestas específicas— consiste en la preincubación de los sueros en presencia de antígenos capaces de absorber los anticuerpos con reactividad indeseable. Yokomizo *et al.*[28] observaron que la absorción de sueros bovinos con *M. phlei* —micobacteria no patógena de crecimiento rápido— no afectaba los niveles de anticuerpos específicos contra *M. paratuberculosis*, y eliminaba en cambio las frecuentes falsas reacciones positivas de animales no infectados con esta micobacteria. Recientemente se ha difundido un enzimoinmunoensayo para el diagnóstico de la enfermedad de Johne bovina basado en estos hallazgos[6, 21]. En el presente estudio se aplicó este método a sueros humanos con el objeto de explorar la respuesta humoral específica a *M. paratuberculosis* en la enfermedad de Crohn. Se analizó la presencia de anticuerpos anti-*M. paratuberculosis* en pacientes con esta enfermedad, se investigó su especificidad mediante experimentos de absorción con *M. phlei* y se compararon estos resultados con los obtenidos con antígenos de *M. avium* y *M. tuberculosis*.

Población y métodos

Población

Fueron investigados 54 pacientes atendidos en el Servicio de Gastroenterología de un Sanatorio de la ciudad de Buenos Aires: 17 de ellos padecían enfermedad de Crohn (8 varones, 9 mujeres, edad media: 46,5; intervalo: 22 a 78 años), 23 tenían colitis ulcerosa (17 varones, 6 mujeres, edad media: 55,3; intervalo: 27 a 70 años). Los 14 restantes tenían otras enfermedades intestinales (8 varones, 6 mujeres, edad media: 48,4; intervalo 25 a 74 años) con los siguientes diagnósticos: colitis banal 7, salmonelosis 1, colitis actínica 1, colitis isquémica 2, pólipo de colon 1, síndrome post-gastrectomía 2. Excepto en dos casos de enfermedad de Crohn con localización ileal, el diagnóstico clínico-radiológico de enfermedad inflamatoria crónica inespecífica del intestino fue confirmado por los hallazgos endoscópicos e histopatológicos del material de biopsia según criterios aceptados[27]. En 8 casos de enfermedad de Crohn se obtuvo evidencia anatomopatológica definitiva a partir de la pieza de resección quirúrgica. Los pacientes fueron incorporados al estudio en diversos estadíos de la enfermedad y bajo diferentes regímenes terapéuticos. En todos los pacientes se efectuaron exámenes bacteriológicos para gérmenes comunes y parasitológico de materia fecal. En todos los pacientes se investigó la presencia de anticuerpos antimicobacterias en al menos una muestra de suero. Además, en 9 pacientes con enfermedad de Crohn, en 8 con colitis ulcerosa y en 4 con otras patologías intestinales fueron analizadas 31, 17 y 9 muestras de suero respectivamente, obtenidas en sucesivas consultas durante un período aproximado de 2 a 18 meses.

Muestras pertenecientes a 86 individuos sin patología gastrointestinal: 52 adultos sanos y 34 con enfermedades causadas por micobacterias y géneros relacionados (19 casos de tuberculosis, 7 de micobacteriosis no tuberculosa y 8 de micosis sistémica, todos ellos confirmados por aislamiento e identificación del agente etiológico) fueron también investigadas.

Métodos

Se analizó mediante enzimoinmunoensayo la presencia de anticuerpos IgG séricos contra *M. paratuberculosis*, *M. tuberculosis* y *M. avium*. Los sueros fueron alicuotados y conservados a -20°C hasta su utilización. La determinación de anticuerpos anti-*M. paratuberculosis* se realizó según una adaptación del método descrito para la detección de anticuerpos bovinos[21]. Brevemente, las placas de microtitulación (Immulon I, Dynatech, Alex, U.S.A.) fueron sensibilizadas con antígeno protoplasmático de *M. paratuberculosis* de origen comercial (Allied Lab. Inc., Ames, Iowa, U.S.A.) 0,035 mg/ml en solución reguladora de carbonatos 0,05 M pH 9,6. Los sueros fueron analiza-

Copyrighted material

dos pre y post-absorción con *Mycobacterium phlei* según la técnica descrita por Yokomizo *et al* [28] a una dilución final 1: 100 en solución reguladora de fosfatos, gelatina 0,2%, Tween 80 0,05%, pH 7,2. Los lavados se realizaron con solución salina, Tween 80 0,05%. Como conjugado se empleó proteína A peroxidasa (Sigma Co., St Louis M. O.), en la dilución óptima 1: 10.000 en solución reguladora de fosfatos gelatina 0,2%, Tween 80 0,05%, según lo determinado en titulaciones previas. El sustrato-cromógeno se preparó inmediatament antes de su uso con 0,06 ml de una solución "stock" 22 mg/ml de 2,2 azinobis (3 etilbenzotiazolin sulfato) (ABTS), 0,048 ml de peróxido de hidrógeno 4,3% y 12 ml de solución reguladora de citratos 0,05M pH 4,0. Se detuvo la reacción a los 20 minutos con ácido fluorhídrico 0,1 M pH 3,3. Para el ensayo de anticuerpos anti-*M. tuberculosis* y anti-*M. avium* se aplicó el método descrito con anterioridad[2], empleando como antígenos PPD *M. tuberculosis* H37 Rv 0,005 mg/ml y PPD *M. avium* 0,010 mg/ml respectivamente. Los niveles de anticuerpos, expresados en valores de densidad óptica (DO), fueron determinados a 405 nm en un lector microELISA Titertek Multiskan MCC 1340. Cada suero fue analizado al menos en dos oportunidades para asegurar la reproducibilidad de los resultados y se registró el valor promedio de los mismos. El valor límite entre positivos y negativos se calculó mediante la suma de dos desvíos estándar (DS) al valor medio de DO obtenido con los sueros de la población de adultos sanos. Para el cálculo de la DO media de cada grupo de pacientes con cada uno de los antígenos, de aquellos pacientes examinados periódicamente se consideró el valor de DO obtenido en la primera muestra de suero.

Resultados

La Tabla 1 muestra las DO medias, el rango de valores obtenidos con los sueros de cada grupo de pacientes en los ensayos *M. paratuberculosis*, *M. avium* y *M. tuberculosis* y el valor de DO límite entre positivos y negativos calculado para cada ensayo. La frecuencia de valores positivos observados en cada grupo de pacientes para los distintos antígenos se presenta en la Tabla 2. Los niveles más altos de anticuerpos séricos contra los tres antígenos, así como las máximas frecuencias de valores positivos fueron obtenidos con los sueros de pacientes con tuberculosis, micobacteriosis y micosis. En el ensayo con antígeno *M. paratuberculosis*, la pre-absorción de los sueros con *M. phlei* no redujo sino que

TABLA 1.— *Niveles de anticuerpos anti-micobacterias determinados por enzimoinmunoensayo en pacientes con Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y otras patologías intestinales y en sueros control*

		M. tuberculosis		*M. avium*		*M. paratuberculosis*			
						pre-absorción		post-absorción	
	n	DO+DS	(p)	DO+DS	(p)	DO+DS	(p)	DO+DS	(p)
Enf. de Crohn	17	0,13 + 0,12	(< 0,001)	0,07 + 0,03	(NS)	0,21 + 0,12	(< 0,001)	0,11 + 0,07	(< 0,001)
Colitis ulcerosa	23	0,11 + 0,07	(NS)	0,06 + 0,03	(NS)	0,13 + 0,15	(NS)	0,07 + 0,11	(< 0,005)
Otras patologías intestinales	14	0,10 + 0,03	(NS)	0,08 + 0,06	(< 0,001)	0,18 + 0,11	(< 0,001)	0,08 + 0,06	(< 0,001)
Tuberculosis	19	0,59 + 0,49		0,20 + 0,16		0,56 + 0,39		0,40 + 0,33	
Micobacteriosis	7	0,23 + 0,05		0,14 + 0,03		0,33 + 0,26		0,20 + 0,16	
Micosis	8	0,39 + 0,39		0,22 + 0,12		0,45 + 0,34		0,32 + 0,32	
Controles sanos	52	0,11 + 0,05		0,06 + 0,03		0,12 + 0,14		0,06 + 0,07	
Valor límite		0,21		0,12		0,40		0,20	

DO+DS: densidad óptica media + desvío estándar
p: nivel de significación con respecto al grupo de controles sanos
NS: no significativo
Valor límite entre resultados positivos y negativos para cada ensayo calculado según la fórmula: DO+2DS del grupo de controles sanos

Copyrighted material

TABLA 2.— *Frecuencia de resultados positivos de anticuerpos IgG anti-micobacterias determinados por enzimoinmunoensayo en pacientes con Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y otras patologías intestinales y en sueros control*

	n	*M. tuberculosis* positivos (%)	*M. avium* positivos (%)	*M. paratuberculosis* pre-absorción positivos (%)	*M. paratuberculosis* post-absorción positivos (%)
Enf. de Crohn	17	3 (18,7)	0 (0,0)	2 (12,5)	2 (12,5)
Colitis ulcerosa	23	1 (4,3)	0 (0,0)	2 (8,7)	2 (8,7)
Otras patologías intestinales	14	0 (0,0)	3 (21,4)	1 (7,1)	1 (7,1)
Tuberculosis	19	14 (73,7)	11 (57,8)	11 (57,8)	12 (63,1)
Micobacteriosis	7	4 (57,1)	6 (85,7)	6 (85,7)	3 (42,9)
Micosis	8	5 (62,5)	7 (87,5)	7 (87,5)	4 (50,0)
Controles sanos	52	2 (3,8)	3 (5,8)	3 (5,8)	2 (3,8)

aumentó la frecuencia de valores positivos en estos tres grupos control.

En pacientes con enfermedad de Crohn y en aquellos con otras patologías intestinales los niveles de anticuerpos dirigidos contra *M. paratuberculosis* resultaron significativamente mayores que los de individuos sanos, tanto pre como post-absorción con *M. phlei*. Diferencias de menor significación fueron observadas en el grupo con colitis ulcerosa. También se detectaron niveles elevados contra *M. tuberculosis* en pacientes con enfermedad de Crohn y contra *M. avium* en el grupo con otras patologías intestinales. Se observó la mayor frecuencia de valores positivos para *M. tuberculosis* y *M. paratuberculosis* en el grupo de pacientes con enfermedad de Crohn y para *M. avium* entre los individuos con otras patologías intestinales. Sin embargo, los niveles de anticuerpos en la mayoría de estos casos positivos excedían sólo discretamente el valor límite calculado y no superaban el rango de DO del grupo de individuos normales. Se observó paralelismo entre los resultados del mismo suero con los tres antígenos, más estrecho entre *M. tuberculosis* y *M. paratuberculosis*. No se registró variación significativa de los niveles de anticuerpos en las muestras de suero de los pacientes analizados periódicamente.

Discusión

La absorción con *M. phlei*, permitió a Yokomizo *et al* [28] remover la reactividad cruzada de sueros bovinos en pruebas inmunoenzimáticas con el antígeno protoplasmático de *M. paratuberculosis*, aun aquella presente en sueros de animales tuberculosos. En contraste, en el presente estudio —el primero en nuestro conocimiento que aplica este método a sueros humanos— *M. phlei* no logró absorber la reactividad de los sueros de los pacientes con tuberculosis, micobacteriosis o micosis[17]. Un similar fracaso de *M. phlei* en la absorción de reacciones cruzadas con *M. paratuberculosis* fue constatado en nuestro laboratorio con sueros de bovinos tuberculosos[13]. Nuestras observaciones ponen en evidencia la inmunodominancia de antígenos comunes a varias especies patógenas y cuestionan la eficacia de este procedimiento.

El parentesco antigénico y genético de *M. paratuberculosis* con *M. avium* ha sido exhaustivamente documentado[1, 14,15]. Sin embargo, esta relación no se manifestó con nitidez en el presente estudio. Se observó, por lo demás, un bajo rango de respuesta a *M. avium* en los sueros de todos los grupos analizados, aun en aquellos pertenecientes a pacientes con micobacteriosis,

Copyrighted material

la mayoría de los cuales padecía enfermedad por esta micobacteria oportunista. Cabe señalar que resultados similares fueron obtenidos en experimentos previos por enzimoinmunoensayo con otros tres PPDs *M. avium* de diversos orígenes, incluido el estándar internacional (datos no publicados).

Los datos aquí presentados sugieren una discreta tendencia a la reactividad humoral a *M. tuberculosis* y *M. paratuberculosis* en pacientes con enfermedad de Crohn. Sin embargo, también se observó cierta actividad humoral contra micobacterias en los otros grupos con enfermedades intestinales y —tanto en la enfermedad de Crohn como en estos grupos— las alteraciones fueron de muy escasa magnitud y frecuencia con respecto a las observadas en los pacientes con tuberculosis, micobacteriosis y micosis. Además, las expectativas de develar una presunta respuesta específica en los pacientes con enfermedad de Crohn mediante la absorción de anticuerpos con reacción cruzada no se cumplieron. Por lo tanto, estas observaciones no agregan evidencia sólida a la hipótesis del origen micobacteriano de la enfermedad de Crohn.

Cabe destacar, sin embargo, que la respuesta inmune humoral a las micobacterias suele ser débil, tardía e inconstante: se atribuye a factores genéticos y a exposición a micobacterias ambientales la marcada diversidad en las respuestas de diferentes individuos a antígenos micobacterianos[11,18]. Estas imbricadas interacciones huésped-parásito, aún no bien comprendidas, podrían ser responsables de la exigüidad de evidencias inmunológicas de asociación entre infección por micobacterias y enfermedad de Crohn acumuladas hasta el presente. Por lo tanto —si bien el hallazgo de una nítida respuesta inmune a antígenos micobacterianos la habría validado— resultados ambiguos o negativos como los del presente estudio y los de varias publicaciones previas no son suficientes para refutar la hipótesis en cuestión.

La aplicación de modernas herramientas de biología molecular al estudio de esta presunta asociación etiológica tampoco ha arrojado aún resultados concluyentes. Secuencias genómicas específicas de *M. paratuberculosis* han sido detectadas en lesiones de algunos de —si bien no de todos— los pacientes con enfermedad de Crohn examinados[5, 19, 25]. Esos hallazgos reavivan la polémica acerca de uno de los múltiples posibles factores etiológicos de esta enigmática entidad clínica.

Summary

Humoral response to mycobacteria in Crohn' s disease

The recent recovery of *Mycobacterium paratuberculosis* from tissues of patients with Crohn' s disease has highlighted the possible etiologic role of this microorganism in the disease. However, the immunological evidence generated by various groups supporting this hypothesis is as yet inconclusive. A specific antibody response might be masked in these patients by the wide antigenic homologies prevailing within the genus *Mycobacterium*. The present study was undertaken with the purpose of exploring the humoral response to *M. paratuberculosis* in patients with Crohn' s disease, by means of a cross-absorption procedure recently proposed for unveiling the presence of specific antibodies in bovine paratuberculosis.

Antibodies IgG to *M. paratuberculosis* were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay in 90 serum samples from 17 patients with Crohn's disease, 23 patients with ulcerative colitis an 14 with other bowel diseases. Samples from 86 subject without bowel disease (healthy individuals and patients with tuberculosis, mycobacterioses and fungal diseases) were also included as controls. The specificity of these antibodies was explored by the absorption of sera with an ubiquitous Mycobacterium (*M. phlei*). The results were compared to those obtained by similar ELISA tests employing *M. avium* or *M. tuberculosis* as antigens.

A faint humoral response to *M. paratuberculosis* and *M. tuberculosis* was detected in patients with Crohn's disease. Cross-absorption with *M. phlei* did not disclose a specific response nor was an increase in antibody levels detected in patients studied periodically. Sera from patients with ulcerative colitis and other bowel diseases also showed a slight reaction to mycobacteria. In addition, the antibody response in these three groups was much less conspicuous in terms of magnitude and frequency than that observed in patients with tuberculosis, mycobacterioses or fungal diseases. The results of this study do not add evidence to support the hypothesis that *M. paratuberculosis* does trigger Crohn' s disease.

Copyrighted material

Bibliografía

1. Baess I: Desoxyribonucleic acid relatedness among species of slow growing mycobacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand* 7: 221, 1979.
2. Barrera L, Miceli I, Ritacco V, et al: Detection of circulating antibodies to PPD by enzyme-linked immunosorbent assay: its potential for the rapid diagnosis of tuberculosis. *Pediatr Infec Dis* J 8: 763, 1989.
3. Blaser MJ, Miller RA, Lacher J, Singleton JW: Patients with active Crohn' s disease have elevated serum antibodies to antigens of seven enteric bacterial pathogens. *Gastroenterology* 87: 888, 1984.
4. Burnham WR, Lennard-Jones JE: Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease. *Lancet* 2: 693, 1978.
5. Cellier C, Debenhouwer H, Faucheron JL, et al: *Mycobacterium paratuberculosis* and *avium subsp-silvaticum* DNA cannot be detected in Crohn's - disease tissues. *Gastroenterology* 104: 678, 1993.
6. Collins MT, Sockett DC, Ridge S, Cox JC: Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne' s disease. *J Clin Microbiol* 29: 272, 1991.
7. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD: Regional ileitis. A pathologic and clinical entity. *JAMA* 99: 1323, 1932.
8. Chiodini RJ: Crohn' s disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* 2: 90, 1989.
9. Cho S, Brennan PJ, Yoshimura HH, Korelitz BI, Graham DY: Mycobacterial aetiology of Crohn' s disease: serologic study using common mycobacterial antigens and a species-specific glycolipid antigen from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Gut* 27: 1353, 1986.
10. Elliot PR, Lennard-Jones JE, Burnham WR, White S, Standford JL: Further data on skin testing with mycobacterial antigens in inflammatory bowel disease. *Lancet* 2: 483, 1980.
11. Elsaghier A, Prantera C, Moreno C, Ivanyi J: Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*-specific protein antigens in Crohn' s disease. *Clin exp Immunol* 90: 903, 1992.
12. Grange JM, Gibson J, Nassau E, Kardjito T: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a study of antibodies to Mycobacterium tuberculosis in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease. *Tubercle* 61: 145, 1980.
13. López B, Ritacco V, Kantor IN de, Debenedetti R, Nader A, Bernardelli A: Evaluation of an ELISA for the serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Paratuberculosis Newsletter* 2: 5, 1990.
14. McFadden JJU, Butcher PD, Thompson J, Chiodini R, Hermon-Taylor J: The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length-polymorfisms to examine the *Mycobaterium avium* complex. *Mol Microbiol* 3: 283, 1987.
15. McIntyre GM, Stanford JL: Immunodiffussion analysis shows that *Mycobacterium paratuberculosis* and other mycobactine-dependent mycobacteria are variant of *Mycobacterium avium*. *J Appl Bacteriol* 61: 295, 1986.
16. Morgan K: Johne's and Crohn's: chronic inflammatory bowel disease of infectious aetiology? *Lancet* 1: 1017, 1987.
17. Ritacco V, López B, Barrera L, Morgante P, Kantor IN de: *Mycobacterium phlei* fails to absorb human IgG cross reacting with *M. paratuberculosis*. *Paratuberculosis Newsletter* 5: 50, 1993.
18. Rook GAW: An integrated view of the immunology of the mycobacterioses in guinea pigs, mice and men. *In*: The biology of mycobacteria. Vol. 2, Ratledge and Stanford (eds), Academic Press, New York, 1983.
19. Sanderson JD, Moss MT, Tizard MLV, Hermon-Taylor J: *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 33: 890, 1992.
20. Seldenrijk CA, Drexhage HA, Meuwissen SGM, Meijer CJLM: T-cellular immune reactions (in macrophage inhibition factor assay) against *Mycobacterium paratuberculosis, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium* in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 31: 529, 1990.
21. Sockett DC, Richards WD, Cooley AJ, et al: Evaluation of the ELISA, CF and AGID tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Paratuberculosis Newsletter* 1: 17, 1989.
22. Stainsby KJ, Lowes JR, Allan RN, Ibbotson JP: Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* and 9 species of environmental mycobacteria in Crohn's disease and control subjects. *Gut* 34: 371, 1993.
23. Tanaka K, Wilks M, Coates PJ, et al: *Mycobacterium paratuberculosis* and Crohn's disease. *Gut* 32: 43, 1991.
24. Thayer WR, Coutu JA, Chiodini RJ, Van Kruningen HJ, Merkal RS: Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II: Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 29: 1080, 1984.
25. Wall S, Kunze ZM, Saboor S, et al: Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's-disease and control tissues by polymerase chain-reaction. *J Clin Microbiol* 31: 1241, 1993.
26. Wayne LG; Hollander D, Anderson B, et al: Immunoglobulin A (IgA) and IgG serum antibodies to mycobacterial antigens in Crohn's disease patients and their relatives. *J Clin Microbiol* 30: 20, 1992.
27. Whitehead R: Major problems in pathology. Vol. 3. Mucosal biopsy of the gastrointestinal tract. 3rd. ed. W. B. Saunder, Philadelphia1985.
28. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS: A method for avoiding false positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn J Vet Sci* 47: 111, 1985.

Copyright:ce material