

**António Pedro Alegre Martinho**

**Rastreio de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* na Doença de Crohn**

**Universidade Fernando Pessoa**

**Porto, Junho 2012**



**António Pedro Alegre Martinho**

**Rastreio de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* na Doença de Crohn**

**Projecto de Pós-Graduação/Dissertação apresentado à Universidade Fernando Pessoa, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Prof. Doutora Amélia Assunção.**

**António Pedro Alegre Martinho**

---

**Porto, Junho 2012**

## **Resumo**

O possível envolvimento de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) na etiologia da doença de Crohn tem gerado muita controvérsia ao longo dos anos. A utilização de métodos de identificação por PCR reportou a detecção de MAP em pacientes com doença de Crohn, mas também em indivíduos sem doença. Outros estudos reportam resultados negativos para ambos os grupos. O objectivo deste trabalho foi verificar se na população de doentes estudada se encontrava uma associação entre presença de MAP e DC.

Efectuou-se detecção de MAP em 29 amostras de sangue periférico: 11 amostras de pacientes com doença de Crohn e 18 amostras de indivíduos controlos. As amostras foram analisadas por desagregação das células e extracção do DNA tendo sido, de seguida, utilizada a técnica de PCR-nested para amplificação de parte da sequência de inserção IS900, específica do MAP e presente em elevado número de cópias. A análise dos produtos amplificados foi efectuada por electroforese em gel de agarose. DNA de MAP foi detectado em 9 dos 11 pacientes (82%) e 4 dos 18 controlos (22%), o que sugere uma associação entre MAP e DC na população estudada.

## **Agradecimentos**

A elaboração deste trabalho científico foi possível pela orientação sempre prestável e competente da Prof. Doutora Amélia Assunção.

Agradeço também toda a colaboração e partilha de conhecimentos da Dra. Nair Nazareth e Dr. Ricardo Silva.

## Índice

1. Introdução .....	pág.1
1.1. Género <i>Mycobacterium</i> .....	pág.2
1.2. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) .....	pág.4
2. Doença de Johne (DJ) .....	pág.4
3. Doenças Inflamatórias Intestinais .....	pág.6
3.1. CU e DC .....	pág.6
3.2. Sintomas de DC .....	pág.7
3.3. Epidemiologia .....	pág.8
3.4. Etiologias IBD (Doenças inflamatórias intestinais) .....	pág.10

4. Evidências que suportam a hipótese infecciosa de DC por MAP .....	pág.11
5. Métodos .....	pág.14
6. Resultados .....	pág.17
7. Discussão .....	pág.18
Bibliografia .....	pág.22

### **Abreviaturas**

ATCC - American Type Culture Collection

CU	-	Colite Ulcerosa
CWD	-	Deficiência na parede Celular
DC	-	Doença de Crohn
DII	-	Doenças Inflamatórias Intestinais
DJ	-	Doença de Johne
ELISA	-	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
IFN- $\gamma$	-	Interferão-gama
MAC	-	Complexo <i>M. avium-intracellulare</i>
MAP	-	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MHC	-	Complexo Major de Histocompatibilidade
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
SIDA	-	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
TNF- $\alpha$	-	Fator de necrose tumoral-alfa

## 1. Introdução

A doença de Crohn (DC) é uma patologia crónica, que tem aumentado a sua prevalência nos países ocidentais mais industrializados, causando sintomatologias extremamente desconfortantes e por vezes severas aos seus portadores, estando a sua qualidade de vida bastante comprometida.

A etiologia desta doença é desconhecida, tendo sido propostas várias possibilidades etiológicas, desde doença auto-imune até possível consequência de infecções bacterianas ou viricas (Sartor, 2007).

É possível que uma bactéria pertencente ao genero *Mycobacterium*, o *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), esteja associada a esta doença, como agente causador ou como oportunista.

Esta hipótese decorre de uma grande semelhança entre a DC nos humanos e a doença de Johne no gado e em outras espécies de mamíferos. Está comprovado, pelos postulados de Koch, que MAP é o agente etiológico da doença de Johne (Dalziel, 1932). As semelhanças entre estas duas doenças decorrem de observações histológicas dos tecidos afectados, assim como dos sintomas e progressão da doença. Existem também, semelhanças entre a DC e a tuberculose iliecal (Crohn et al., 1932).

Apesar de diversas investigações nesta área, não foi encontrado até ao momento um factor etiológico que permita estudos complementares de diagnóstico e tratamento.

Esta tese, além de sintetizar uma abordagem sobre a doença e hipóteses etiológicas, aprofunda a hipótese de etiologia infecciosa, tendo como base estudos que revelam uma forte associação entre DC e MAP. Estão documentados inúmeros estudos que documentam esta associação, mas também estudos que a descartam. A falta de concordância entre diferentes estudos pode resultar de diferenças nas metodologias das técnicas de colheita, processamento das amostras e identificação de MAP.

Deste modo, foi efectuado um rastreo de MAP numa população de pacientes internados no Hospital de São João (HSJ) com DC em fase ativa, com o intuito de verificar a associação de DC com MAP nesta população.

### **1.1. Género *Mycobacterium*:**

O género *Mycobacterium* engloba actualmente 56 espécies reconhecidas internacionalmente, pelo Comité Internacional de Bacteriologia Sistemática. Sabemos que a maioria destas espécies não é patogénica, embora algumas provoquem doença no homem e/ou outros animais.

David e colaboradores (H. David *et al.*, 1994) propuseram a classificação clínica do género *Mycobacterium* em 3 grupos, de acordo com a sua patogenicidade para o Homem:

- 1) Patogénios estritos: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. leprae*.
- 2) Espécies normalmente saprófitas, podendo actuar como patogénios oportunistas: inclui espécies ou complexos como MAC (complexo *M. avium-intracellulare*), *M. kansasii* e o complexo *M. fortuitum-chelonae*, entre outros.
- 3) Espécies saprófitas: isto é, que raramente se encontram como patogénios.

Sendo a maioria das espécies de *Mycobacterium* agentes não patogénicos, algumas são patogénicos extremamente competentes, como o *M. tuberculosis* que é um agente patogénico, com mais de 1/3 da população mundial colonizada. Outros patogénicos competentes são *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. Bovis*. (Cosma *et al.*, 2003).

As espécies patogénicas são patogénicos intracelulares, que residem dentro dos macrófagos e células dendríticas, as quais actuam como um nicho de crescimento. (Jiao *et al.*, 2002; Markesich *et al.*, 1988; Assunção, 2008).

Todos os dias contactamos com micobactérias saprófitas, que inalamos ou ingerimos regularmente. Deste modo, não é de estranhar que por vezes sejamos colonizados por estes microrganismos nas vias respiratórias e digestivas, através de poeiras, aerossóis, bebidas e restante alimentação.

As micobactérias apresentam algumas características comuns, entre as quais o crescimento lento (taxa de duplicação variável entre 2-60 dias), sendo aeróbias, imóveis, não capsuladas, não formadoras de esporos, com morfologia bacilar (os bacilos são caracteristicamente finos, rectos ou ligeiramente encurvados, apresentando-se isolados, aos pares ou em pequenos agrupamentos de bacilos paralelos) ou cocobacilar (mais raramente com formas filamentosas), parede celular rica em lípidos, caracteristicamente ácido micólicos com cadeias longas e ramificadas, o que torna a superfície hidrofóbica, e lhes confere álcool-ácido resistência. A parede rica em lípidos providencia resistência ao frio e calor (excepto temperaturas muito elevadas) e ao stress ambiental (Cosma *et al.*, 2003).

## **1.2. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP)**

A espécie *M. avium* revela grande variabilidade, podendo esta ser comparável à variabilidade na espécie *E.coli*. O MAP, uma subespécie de *M. avium*, apresenta um crescimento *in vitro* dependente de micobactina J (um ionóforo). O mapeamento do genoma de MAP revelou a presença de 17 elementos de inserção IS900, 7 elementos IS1311 e 3 elementos IS1245. A sequência de IS900 presente no MAP é característica deste organismo, sendo utilizada para diagnóstico de MAP em amostras clínicas, tanto de animais como humanos.

MAP é o agente etiológico de uma doença designada Doença de Johne ou paratuberculose, em bovinos. Dadas as semelhanças histopatológicas da DJ com a DC pensa-se que estas podem estar relacionadas, podendo surgir do mesmo agente etiológico.

Embora *M. avium* seja considerado um dos principais microrganismos oportunistas em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) nos Estados Unidos (Falkinham, 1994), não é comum a associação entre MAP e SIDA. MAP em humanos assume um fenótipo esferoplástico, perdendo a parede celular e a álcool-ácido resistência (Graham et al., 1987).

## **2. Doença de Johne (DJ)**

MAP é o agente etiológico da DJ, uma doença inflamatória intestinal em vacas, ovelhas, coelhos e alguns primatas (Glawischnig *et al.*, 2006; Judge *et al.*, 2005; McClure *et al.*, 1987).

As populações de gado mais susceptíveis à infecção são os neonatos e juvenis (Clarke, 1994). A infecção é classificada em 4 fases: infecção silenciosa, sub-clínica, clínica e clínica avançada (Whitlock e Buergelt, 1996). A via infecciosa mais provável é a fecal-oral.

O MAP coloniza a mucosa associada a tecidos linfóides do tracto gastrointestinal superior, após endocitose pelas células M, presentes nas placas de Peyer. Os bacilos são subsequentemente fagocitados pelos macrófagos sub-epiteliais e intra-epiteliais (Geijtenbeek et al., 2003; Lugton, 1999; Momotani et al., 1988). Pensa-se que o antígeno FAP-P ("fibronectin attachment protein" - proteína de ligação à fibronectina), facilita a endocitose mediada pelas integrinas da superfície apical das células M (Secott et al., 2004).

Uma vez internalizados, os bacilos permanecem no interior das células fagocíticas e multiplicam-se no compartimento do fagossoma (Kaufmann, 1993). A resposta imunitária subsequente leva à formação de granuloma e ao envolvimento dos nódulos linfáticos adjacentes (Clarke, 1994; Lugton, 1999).

MAP causa diminuição da expressão de MHC classe I e classe II à superfície de macrófagos bovinos e impede que essa expressão seja restaurada por intermédio de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A expressão diminuída de moléculas MHC classes I e II pode conduzir a diminuição da apresentação de antígenos de MAP a linfócitos T, atenuando ou atrasando a resposta imune específica. Esta atenuação pode providenciar às micobactérias tempo para proliferar e, assim, superar a capacidade de resposta imunológica do organismo bovino (Weiss et al., 2001).

Entretanto a inflamação desenvolvida conduz à manifestação clínica da doença, caracterizada pelo enrugamento do epitélio intestinal. A consequência final leva ao síndrome de malnutrição associado à DJ e à morte do animal.

### 3. Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)

As DII descrevem um grupo de desordens gastrointestinais inflamatórias de etiologia desconhecida ou não provada (Papadakis e Targan, 2000). Em pessoas saudáveis, o intestino inflama em resposta a um potencial patógeno, retornando a um estado de tolerância assim que o agente patógeno é erradicado (Hanauer, 2006).

As DII são idiopáticas e caracterizadas por uma predisposição para o desenvolvimento de reacções inflamatórias de carácter crónico e recidivante, sendo a cronicidade devido à desregulação homeostática do sistema imune da mucosa intestinal.

As principais doenças de carácter inflamatório intestinal são a DC e a Colite Ulcerosa (CU). Apesar de estarem interligadas, são aceites como patologias distintas clinicamente, anatomicamente e histologicamente (Sands, 2004). Existem ainda formas atípicas, provavelmente derivadas destas, que não podem ser categorizadas em nenhuma das doenças referidas anteriormente e que tornam o diagnóstico inicial difícil.

#### 3.1. CU e DC

A Colite Ulcerosa, é caracterizada por uma inflamação generalizada da mucosa do recto até ao cólon de forma continuada, isto é, sem hiatos. Pode afectar o cólon todo ou parte deste. Em 10% a 20% dos pacientes com colite, o processo inflamatório pode-se estender até ao íleo (Friedman e Blumberg, 1999; McQuaid, 1999; Targan et al., 2003).

A Doença de Crohn foi originalmente descoberta por Crohn, Ginzburg e Oppenheimer em 1932 (Crohn et al., 1932). É caracterizada por uma inflamação granulomatosa que envolve qualquer segmento do trato gastrointestinal, geralmente o íleo terminal e o cólon (mas pode afectar qualquer parte do tracto gastrointestinal) da boca ao ânus. Pode também envolver o fígado e o pâncreas, quando atinge o intestino grosso.

Ao contrário da colite ulcerosa, a doença de Crohn apresenta-se segmentada com áreas de tecido saudável intercalado com tecido inflamado (Friedman e Blumberg, 1999; McQuaid, 1999; Targan et al., 2003).

As lesões podem afectar qualquer camada da parede digestiva, apresentando nas submucosas alterações histológicas marcantes, tais como granulomas, infiltrado inflamatório e espessamentos (Friedman e Blumberg, 1999; McQuaid, 1999; Targan et al., 2003). Muitos destes danos são causados por células do sistema imunitário, afetando parte dos tecidos do tubo digestivo, embora a etiologia auto-imune seja difícil de sustentar.

A grande diversidade de sintomas entre CU e DC sugere um distinto mecanismo patogénico. (Friedman e Blumberg, 1999; McQuaid, 1999; Targan et al., 2003).

### **Sintomas de DC**

A doença progride com alguns períodos sintomáticos interrompidos por outros assintomáticos. Pode progredir com deterioração contínua das lesões, ou ser não progressiva, com regeneração das regiões atingidas entre as crises. Metade dos doentes apresentam lesões em ambos ileo e cólon, enquanto 25% apresentam-nas limitadas ao cólon.

Os sintomas mais comuns são diarreia e dor abdominal, geralmente à volta do umbigo, na região inferior direita (muitas vezes confundida com a apendicite), acompanhada de náuseas e vômitos, febre moderada, sensação de distensão abdominal agravada com as refeições, perda de apetite e peso (podendo provocar atraso de desenvolvimento e problemas de crescimento em adolescentes), mal-estar geral e cansaço. Nas fezes pode haver eliminação de sangue, muco ou pus. Apesar de serem raras, as crises respiratórias podem ocorrer, tendo o paciente ataques violentos de tosse, principalmente durante a noite. (Chacon et al., 2004).

Em alguns casos há desenvolvimento de aftas, artralgias, abscessos e fístulas, eritema nodoso, inflamação nos olhos (conjuntivite secundária), problemas nos vasos sanguíneos (tromboses ou embolias) e deficiência de ferro, vitamina B12 e ácido fólico, obstruções intestinais, fissuras e abscessos anais.

Menos frequentemente, pode ocorrer perfuração intestinal levando a sangramento e peritonite, complicações cardíacas, biliares, oculares e mucocutâneas. O cancro do cólon é raro, ao contrário do que ocorre na Colite ulcerosa.

A doença severa, é caracterizado por mais de seis sangramentos intestinais por dia, que pode levar a anemia, hipovolemia, taquicardia e hipoalbuminemia, assim como também dor abdominal e desconforto. (Chacon et al., 2004).

### **3.2. Epidemiologia das DII**

É possível estabelecer padrões mais ou menos definidos de distribuição da DC e CU, não só temporalmente, mas também geográfica e racialmente.

Deste modo, verifica-se a existência de uma maior prevalência da patologia na América do Norte e Europa, havendo um gradiente decrescente no sentido Norte-Sul (Nerick et al., 2006).

No entanto, ao longo dos anos, vários estudos demonstraram que esta diferença se tem tornado cada vez mais ténue, provavelmente por uma estabilização dos valores do Norte, acompanhada de uma subida acentuada dos casos de DC e CU a Sul (Shivananda et al., 1996). Observa-se ainda que, entre as populações orientais, bem como entre as populações de África (à exceção da África do Sul) e América do Sul, a prevalência da doença é extremamente baixa, embora esteja a aumentar (Thia et al., 2008; Katz, 1994).

A prevalência é também elevada em algumas populações, como na população de judeus Ashkenazi.

Segundo vários estudos, houve um aumento de incidência destas patologias ao longo da segunda metade do século XX, sobretudo entre as décadas de 50 e 70, seguindo-se um período de estabilização dos valores a partir da década de 80 (Loftus et al., 1998).

Tal estabilização poderá estar relacionada não só com o acesso a técnicas de diagnóstico cada vez mais específicas e avançadas, mas também com uma exposição mais intensa das populações a factores de risco da doença. As diferenças entre as técnicas e condições de diagnóstico entre o eixo norte sul também pode ter influência nos casos detectados.

Estudos realizados em diferentes épocas e em várias populações, demonstraram a existência de uma maior incidência de casos entre populações de sexo feminino (Fonager et al, 1998). Na base desta diferença poderão estar factores de origem hormonal, estilo de vida, entre outros.

Relativamente à relação entre a idade e o aparecimento da DC, verifica-se que esta tem o seu pico em grupos etários entre os 15 e os 25 anos, podendo, no entanto, haver casos de diagnóstico desde a infância e ao longo de toda a vida dos indivíduos, já na CU o primeiro pico situa-se entre os 10 e 20 anos. No entanto, alguns estudos mostraram o surgimento de um pico menor de incidência para ambas as doenças, numa fase mais tardia da vida, dos 55 aos 65 anos (Gasche et al., 2000; Silverberg et al., 2005; Freeman, 2001).

O aumento da incidência em países desenvolvidos, bem como em populações não caucasianas que emigraram para países industrializados, e o aumento da prevalência das doenças no século XX, suportam a hipótese de que factores ambientais estão envolvidos no desenvolvimento destas doenças.

### 3.3. Etiologias da DII

O estilo de vida dos países desenvolvidos e a mudança de hábitos de dieta, consumo de tabaco, variação da exposição ao sol, poluição e químicos industriais, podem ter um papel importante no desenvolvimento da doença.

A etiologia das DII é ainda oficialmente desconhecida. Nos últimos anos têm sido identificados variados polimorfismos genéticos associados à suscetibilidade às DII. Estes polimorfismos encontram-se em genes relacionados com receptores de reconhecimento inato, diferenciação de linfócitos, autofagia, manutenção da integridade da barreira epitelial e da orquestração da resposta imune secundária. Únicos da DC (não partilhados com CU) são polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunitária inata a microrganismos, como o receptor de reconhecimento inato NOD2/CARD15 e proteínas envolvidas no processo de autofagia (ATG16L1 e IRGM) (Lees et al, 2011).

Apesar da importância da predisposição genética individual na DC, a presença da flora intestinal é condição necessária para que ocorra a doença, segundo estudos em modelos murinos. De facto, estudos demonstraram que a existência de uma barreira epitelial comprometida foi suficiente para ocorrer inflamação intestinal (Xavier e Podolsky, 2007).

Assim, supõe-se que a doença seja resultado de hiperactividade do sistema imunitário digestivo à flora comensal, em indivíduos geneticamente predispostos, o que não exclui a possibilidade do envolvimento de um particular agente infeccioso, ainda indeterminado (Friedman e Blumberg, 1999).

A ocorrência de uma microflora intestinal anormal tem vindo também a ser referida em pacientes com DC, podendo contribuir para a desregulação intestinal (Barnich, 2007; Darfeuille-Michaud, 1998).

Diversos microorganismos como *Helicobacter pylori* (Pearce et al., 2000), MAP, *Pseudomonas spp* e *Yersinia spp*, foram associados com a etiologia da DC (Chiodini, 1989; Katz e Fiocchi, 1996), assim como o vírus de Epstein-Barr e outros vírus citopáticos intestinais de RNA.

A bactéria *E.coli*, um componente da flora comensal, é capaz de adesão ao epitélio, mas apresenta uma baixa taxa de invasão em indivíduos saudáveis, dado que uma mucosa saudável impede ou reduz a internalização dos microorganismos, conseguindo o sistema imune debelar a infecção (Buhner, 2006; Irvine e Marshall, 2000; May et al., 1993; Soderholm, 2002). Porém, na DC tem sido isolado uma estirpe de *E.coli* aderente e invasiva, replicando-se em macrófagos e levando à formação de granulomas (Friswell et al, 2010).

#### **4. Evidências que suportam a hipótese infecciosa de DC por MAP**

A principal diferença existente entre MAP e outros patogéneos candidatos na causalidade de DC, é o estabelecimento de múltiplos hospedeiros entéricos crónicos. De facto, MAP é capaz de iniciar e manter a inflamação crónica do intestino numa grande diversidade de espécies (Scanu et al., 2007).

Não existem dados que demonstrem que o MAP é inofensivo para humanos. MAP foi detectado na cadeia alimentar, estando presente na carne e leite (Streeter et al., 1995).

Alguns estudos ambientais sugerem existir uma forte probabilidade de MAP ser um patógeno para humanos (Feller et al., 2007), mesmo apesar de estudos recentes sugerirem falta de sucesso de uma antibioterapia direccionada para MAP (Selby et al., 2007). É possível que a baixa penetração dos antibióticos dentro dos macrófagos e os mecanismos de resistência conhecidos do género *Mycobacterium*, possam explicar esta falta de sucesso (Friswell et al., 2010). Contudo estão a decorrer ensaios clínicos para aprofundar o conhecimento da actuação de diferentes combinações de antibióticos (Singh et al., 2009). É também possível que MAP esteja a actuar como um patógeno indirecto, uma vez que o manano existente na sua parede tem um efeito inibitório da actividade antibacteriana de macrófagos (Mpofu et al., 2007). No entanto, o aumento da colonização por MAP em pacientes com DC sugere um papel directo desta micobactéria na doença (Friswell et al., 2010).

Um estudo recente demonstrou que pacientes com DC, que apresentam mutação no gene *NOD2/CARD15* têm um reconhecimento ineficaz de MAP (Ferwerda et al., 2007). Mutações em pacientes com DC em genes relacionados com o mecanismo de autofagia podem levar a alteração da capacidade macrofágica de eliminar bactérias intracelulares. De facto, foi demonstrado que diminuição da expressão de IRGM aumenta a sobrevivência de *M. bovis* BCG dentro de linhas celulares humanas, diminuindo a autofagia (Singh et al., 2006).

Em indivíduos com DC, há presença de células T reactivas ao MAP, o que não acontece em grupos controlo (Friswell et al., 2010). Em macrófagos bovinos, MAP inibe a acidificação dos fagossomas e decresce a maturação destes. (Weiss et al., 2004; Hostetter et al., 2003; Assunção, 2008). Os isolados de MAP encontrados em bovinos e humanos apresentam diferenças, sendo que em humanos há uma maior expressão de 6 proteínas, entre as quais PepA e ModD. PepA é uma serino-protease e ModD uma proteína de ligação á fibronectina importante para a invasão epitelial e internalização de MAP pelos macrófagos (Shin et al., 2009). Um estudo que promoveu a infecção de macrófagos *in vivo* por MAP demonstrou redução da expressão de 17 genes nos macrófagos, relacionados com a expressão de mecanismos pro-inflamatórios, o que aumenta a possibilidade de sobrevivência do organismo em macrófagos bovinos (Basler et al. 2008).

A detecção de MAP em pacientes com DC tem-se revelado inconstante, podendo este facto dever-se à evolução nos métodos de identificação de MAP. Nos primeiros métodos realizados utilizando a técnica de PCR os primers eram inespecíficos e ligavam-se a sequências similares em outras micobactérias (Ellingson et al., 2000; Vary et al., 1990). Porém, a utilização de PCR-nested com primers específicos tem permitido resultados mais concordantes, sendo positivos em 52%-92% dos ensaios de detecção de MAP em pacientes com DC (Autschbach et al., 2005; Bull et al., 2003).

A dificuldade de isolamento e identificação de formas de MAP com deficiência na parede celular (CWD) encontrados em humanos, também conhecidos como formas-L, bem como o baixo número de bactérias que colonizam a mucosa intestinal, tem possivelmente contribuído para obtenção de resultados falso-negativos em doentes com DC. (Chiodini, 1989).

Há dificuldades no crescimento e isolamento de MAP, o que pode ser devido à entrada num estado de latência ou ao baixo número de bactérias colonizantes (Selby et al, 2004). Em 2003 foram realizadas culturas de MAP a partir de biópsias frescas de mucosa humana num sistema BACTEC (Difco), especialmente desenvolvido para o crescimento de MAP. Só 17 de 66 tubos mostraram turvação, confirmando-se posteriormente a presença de MAP por PCR-nested detectando o IS900. As tentativas de cultivar este organismo em meio sólido não tiveram sucesso (Bull et al., 2003).

Embora a detecção por PCR-nested tenha permitido aumentar consideravelmente a sensibilidade, alguns autores afirmam não encontrar associação entre DC e detecção da sequência IS900 (Frank et al,1996., Kanazawa et al,1999).

Fomos ver o que se passava nesta população, 1º estudo realizado numa população portuguesa, com o objetivo também de posteriormente relacionar prevalência de MAP com certas características da DC, tais como tipo e localização.

## 5. Materiais e Métodos

### Pacientes e Controlos

Neste estudo foram incluídos 29 indivíduos, 18 indivíduos sem sinais de DII (com uma média de idades de 32,7 de 18 a 64 anos, dos quais 13 eram mulheres e 6 eram homens) e 10 pacientes com DC (com uma média de idades de 40,7 anos dos 22 aos 64 anos, dos quais 5 eram mulheres e 6 eram homens). Todos os pacientes com DC estavam sob terapia com prednisolona. Foi obtido um consentimento informado, de acordo os procedimentos institucionais do IBMC, Universidade Fernando Pessoa (UFP) e Hospital São João (HSJ). Os pacientes com DC foram recrutados no serviço de Gastroenterologia do HSJ. O diagnóstico de DC foi baseado em endoscopia e critérios histopatológicos e radiológicos (Sands et al, 2004). O grupo controlo foi recrutado da comunidade académica da Faculdade de ciências da saúde, Universidade Fernando Pessoa, não apresentando qualquer sintoma de DII.

### Extracção de DNA

Foi colhido sangue de pacientes com DC e controlos para um tubo contendo 4 ml de EDTA e as células mononucleares foram obtidas por centrifugação por gradiente de densidade com Histopaque 1077 (Sigma, St.Louis, MO, USA). As células mononucleares foram então ressuspensas em solução de lise de micobactérias (2ml de EDTA sódico, 400mM NaCl, 10mM tris-HCl, 0,6% SDS e 33 mg/ml de proteinase K) e o DNA foi extraído conforme descrito por Bull e colaboradores (Bull et al., 2003). Em resumo, as amostras com solução de lise de micobactérias foram rapidamente incubadas a 37°C durante 2 horas com agitação. Os tubos foram então arrefecidos em gelo e as células presentes nas amostras foram posteriormente lisadas mecanicamente com auxílio de Mini Beadbeater<sup>TM</sup> (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). As amostras obtidas foram então tratadas sequencialmente com fenol, fenol-cloroformio-álcool isoamílico e cloroformio-álcool isoamílico.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 10M de acetato de amonio e homogeneizado. Seguidamente adicionou-se 1ml de etanol absoluto para permitir a precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 10 000g durante 20 minutos, sendo o pellet lavado com etanol 70% e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente para secar. Seguidamente ressuspendeu-se em TEN buffer (10mM tris-HCl, 1mM de EDTA sódico, pH8) e permitiu-se que redissolvesse "overnight" a 4°C. A solução obtida contendo DNA, foi distribuída por alíquotas e congelada a -20°C até ser utilizada no método de PCR. Todos os reagentes foram adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

### **PCR-nested IS900**

O PCR-nested foi efectuado com os primers derivados da sequência de inserção IS900.

Na 1ª corrida de PCR, foram usados os seguintes primers L1 (5'-CTT TCT TGA AGG GTG TTC GG-3') e L2 (5'-ACG TGA CCT CGC CTC CAT-3'), que amplificaram um fragmento de 398pb da IS900. Na 2ª corrida, foram utilizados os primers AV1 (5'-ATG TGG TTG CTG TGT TGG ATG G-3') e AV2 (5'-CCG CCG CAA TCA ATC CCA G-3'). Estes primers amplificaram uma sequência de 298 pb a partir da sequência interna do oligonucleótido de 398 pb obtido no 1º PCR.

A mistura reacional do 1º PCR consistiu em 5 µl do extracto da amostra de DNA com um volume final de 50 µl, contendo o tampão de reacção: 1,5 µM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Madison, WI, USA), 10% de dimetilsulfoxido (Sigma), 2 µM de cada primer L1 e L2, 200 µM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP, dTTP e 3,5 U GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Como controlo positivo foi utilizado DNA extraído da estirpe de MAP ATCC 43015. As condições da corrida foram: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos: a 94°C durante 1 minuto cada, a 58°C durante 1 minuto, a 72°C durante 3 minutos; seguido de 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. Para reduzir o risco de amplificações de contaminações, os produtos do 1º PCR foram tratados com 1U de uracyl-DNA glicosilase (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) a temperatura ambiente durante 10 minutos.

O PCR-nested teve os mesmos reagentes da 1ª mistura reaccional, mas foi colocado em reacção 5 µl do produto do 1º PCR em vez da amostra, 2 µM dos primers AV1 e AV2 foram usados e 400 µM de dUTP, em vez de dTTP. As condições da corrida foram: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; seguido de 40 ciclos: a 94°C durante 1 minuto, a 58°C durante 1 minuto, e 72°C durante 3 minutos; seguido de 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos.

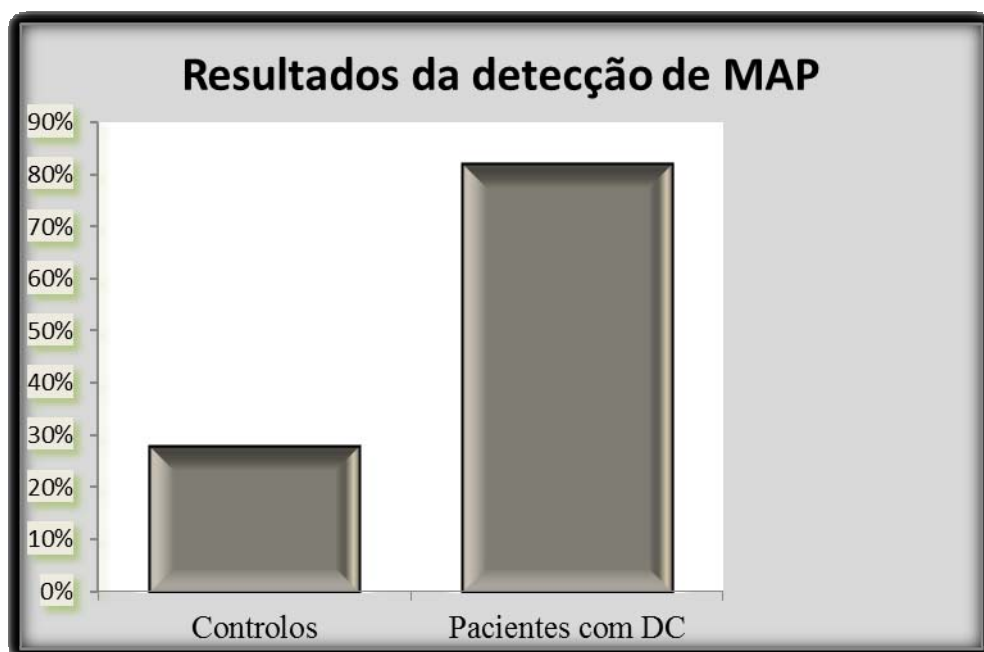
Os fragmentos de DNA com o tamanho esperado foram visualizados com SYBR safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em gele de agarose a 3%.

## 6. Resultados

As amostras positivas para o IS900 são identificadas por uma banda de 298 pb no gele de agarose 3%.

Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 1. Foi detectado DNA de MAP em 13 dos 29 indivíduos em estudo, dos quais 9 em 11 pacientes e 4 de 18 controlos correspondendo a 82% em pacientes com DC e 22% no grupo controlo.

**Resultados da detecção de DNA de MAP em pacientes com DC e grupo controlo.**



GRUPO	Nº TOTAL DE INDIVÍDUOS	Nº DE INDIVÍDUOS POSITIVOS PARA DNA DE MAP
Controlos	18	4
Pacientes com DC	11	9

## 7. Discussão

Como referido anteriormente, a associação entre MAP e a DC ainda não foi estabelecida, dado que muitas perguntas ainda estão por responder. O que é inegável é que a presença no organismo humano de uma bactéria pertencente à família *Mycobacterium* é um facto preocupante, aliada ao facto de esta bactéria ser um patogénio entérico crónico para múltiplos hospedeiros e estar reportada a sua presença na cadeia alimentar (Streeter et al, 1995).

A similaridade da DC em humanos com a DJ em bovinos revelada por dados histopatológicos (inflamação entérica crónica, presença de granulomas, infiltrados inflamatórios e espessamentos) é, pelo menos, sugestiva de uma etiologia comum.

Embora a associação entre MAP e DC ainda não tenha sido provada, dados a seu favor têm surgido como resultado de investigação nesta área, o que levou a Food Standards Agency (FSA, USA) e o Comité Científico da União Europeia a examinar as evidências desta associação em 2002 (Rubery, E. 2002, European Commission. 2000). Embora estes dois estudos tenham reportado que ainda não foi encontrada uma associação conclusiva, indicaram a necessidade de vigilância do papel do MAP, o que levou mesmo a FSA a estabelecer um programa com intuito de determinar a presença de MAP viável na cadeia alimentar, nomeadamente em lacticínios. As conclusões revelam a presença ocasional de MAP viável na cadeia alimentar (Report from the microbiological safety of food funders group 2006).

Uma das principais dificuldades tem sido a difícil detecção de MAP em pacientes com DC. De facto, MAP, além de ser uma das espécies de crescimento mais lento na família *Mycobacteriaceae*, pode adoptar uma forma esferoplástica (deficiente na parede celular), perdendo a álcool-ácido resistência típica das micobactérias. Formas esferoplásticas foram já isoladas (Chiodini et al., 1984) e detectadas (Chiodini et al. 1986) em pacientes com DC. A dificuldade em detectar MAP em pacientes com DC pode ser explicada pela presença destas formas que são muito difíceis de cultivar e não coram pela coloração de Zhiel-Neelsen (Bernan et al., 2006). Recentemente foram desenvolvidos métodos moleculares para identificação de MAP em hospedeiros.

Com o mapeamento do genoma de MAP e a descoberta do seu elemento de inserção específico designado por IS900, a identificação de DNA de MAP por PCR tornou-se mais simples. Porém estes métodos não apresentam uma taxa de identificação de 100%, mesmo se realizados a partir de amostras de animais com DJ diagnosticada e confirmada, o que sugere a presença de um número baixo de bacilos no hospedeiro. Bull e colaboradores (Bull *et al.*, 2003) identificaram DNA de MAP em biópsias intestinais de 92% de pacientes com DC, comparando com 26% em indivíduos controlo.

O trabalho prático desenvolvido na UFP utilizou o método de detecção proposto por Bull *et al.* (2003) adaptado para a utilização de amostras de sangue periférico, e pretendeu investigar se a população de doentes estudada (a primeira a ser estudada em Portugal) apresentava uma prevalência semelhante à encontrada em outros estudos. O estudo da prevalência de MAP nesta população servirá de base para detetar também possíveis associações entre MAP e a observação de determinadas características da DC presentes nos pacientes estudados.

De forma a comparar, interpretar e integrar os resultados obtidos, efectuamos uma pesquisa às meta-análises sistemáticas existentes sobre a detecção de MAP em pacientes com DC. Estas revelam uma grande percentagem de artigos excluídos por falta de informação ou erros na metodologia, grupos de controlo inelegíveis, ou duplicação de amostras (Feller *et al.*, 2007).

Os resultados encontrados demonstram uma maior detecção de MAP em pacientes com DC do que em grupos controlo, quer isentos de DII quer em pacientes com CU, independentemente do método utilizado.

Na meta-análise efectuada por (Feller *et al.*, 2007), são apresentados 18 estudos de detecção de MAP por PCR, nos quais 2 não revelam associação com DC (Bernstein *et al.*, 2003; Rowbothan *et al.*, 1995) e 11 são muito sugestivos desta associação (Dell'Isola *et al.*, 1994; Autschbach *et al.*, 2005; Bull *et al.*, 2003; Hultén *et al.*, 2001; Lisby *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 1992; Sechi *et al.*, 2005; Tiveljung *et al.*, 1999).

Pelo método de ELISA de detecção de antígenos de MAP no soro, são apresentados 13 estudos dos quais 3 não apresentam associação (Cho et al., 1986; Tanaka et al., 1991; Walmsley et al., 1996) e 6 são muito sugestivos da presença de associação entre MAP e DC (3 de Collins et al., 2000; Elsaghier et al., 1992; Suenaga et al., 1999; Thayer et al., 1984).

Segundo a meta-análise realizada por Abubakar et al. (2008), em que os resultados são semelhantes à realizada por Feller et al. (2007), o método de PCR é considerado como o mais fiável, mas Bull et al. (2003) apresenta dados importantes de optimização desta metodologia. Podemos salientar a optimização da desagregação da membrana celular, (Herman-Taylor et al., 2000; Odumeru et al., 2001) e a correcta selecção de primers, dado que outras micobactérias apresentam elementos de inserção parecidos com o IS900 (Cousins et al., 1999; Englund et al., 2002) podendo originar resultados falso-positivos.

Naser et al. (2004) afirma que os resultados inconstantes na detecção de MAP se devem às diferentes metodologias utilizadas e aponta para o facto da não distinção pelo método de PCR entre MAP morto e MAP viável (Green et al., 1989; Lisby et al., 1994). Neste artigo (Naser et al., 2004) foram obtidos resultados relevantes, dado que apenas nos pacientes com DC e CU, e não nos indivíduos sem DII, foi obtido crescimento de MAP em cultura no sistema BACTEC, enquanto que em todos os grupos se detetou DNA de MAP. É provável que nos indivíduos saudáveis colonizados por MAP a bactéria tenha sido morta pelo sistema imune.

Os resultados obtidos neste trabalho são aproximados dos descritos por Bull et al. (2003) embora estejam condicionados pelo reduzido número de amostras realizadas. Porém, é importante referir que Bull et al. (2003) utilizou amostras de biópsias da mucosa intestinal, enquanto que neste trabalho utilizamos sangue periférico. Num estudo realizado por Naser et al. (2004) em que foi realizada detecção de DNA de MAP em sangue periférico, foi obtida detecção de MAP em 46% em pacientes com DC e 44% em pacientes com CU.

A prevalência de MAP nos pacientes com DC encontrada por Naser e colaboradores foi inferior à obtida por nós, o que pode ser explicado pelo facto de aqueles autores terem estudado pacientes em fase inativa da doença, enquanto que neste trabalho realizado na UFP as amostras foram de pacientes em fase ativa da DC.

Após as experiências realizadas por mim, o trabalho foi completado com outras populações de doentes. Foi analisada a prevalência de MAP em pacientes com DC em fase inativa da doença, mas também em pacientes com CU quer em fase ativa quer em fase inativa. Em fase ativa, a prevalência de MAP foi semelhante em pacientes com DC e CU. No entanto, obteve-se uma maior prevalência de MAP em pacientes com DC em fase inativa do que em pacientes com CU em fase inativa (Nazareth et al., 2012 manuscrito em preparação). Estes dados sugerem que a igual prevalência de DC e CU pode resultar de um aumento da permeabilidade intestinal nesta fase. No entanto, a maior prevalência de MAP em pacientes com DC em fase inativa comparativamente a pacientes com CU, confirma a associação de MAP com DC nesta população estudada.

No futuro, tornar-se-á cada vez mais prioritário o estudo dos efeitos da infecção por MAP em humanos suscetíveis. Os resultados obtidos em diferentes estudos revelam a associação deste organismo com a DC estando, no entanto ainda por defenir se como oportunista ou agente etiológico. O aumento de conhecimento desta associação é de extrema importância dado o aumento de prevalência que a DC apresenta e a morbidade que acarreta.

## **Bibliografia**

- Abath, F.G.C., Werkhauser, R.P. e Melo F.L., inventors; FIOCRUZ, assegee. (2001). Método, kit e iniciadores para a identificação de seqüências específicas de nucleotídeos através da reação em cadeia da polimerase tipo nested em um único tubo de reação. Repartição de Patente do Brasil (INPI) BRPI015740-5. Nov 29.
- Abreu, M.T. (2002). The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians. *Curr Gastroenterol Rep.*;4:481–489.
- Abubakar, MD., Myhill, D., Aliyu, S.H. e Hunter, P.R. (2007) Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* from Patients with Crohn's Disease Using Nucleic Acid-Based Techniques: A Systematic Review and Meta-analysis.
- Andres, P.G. e Friedman, L.S. (1999). Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 28, 255 in Sands, Bruce E. (2002).
- Aisenberg, J. e Janowitz, H.D. (1993). Cluster of inflammatory bowel disease in three close college friends? *J Clin Gastroenterol.* 17: 18-20.
- Assunção, A. (2008). *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* detection from blood of Crohn's disease patients in a portuguese hospital. *Revista faculdade de Ciências da Saúde*, vol. 5, edições UFP, pp. 48-54.
- Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Loffler, T., Buchler, M.W. e Schmidt, J. (2005). High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54, 944–949.
- Bannantine, J.P., Barletta, R.G., Stabel, J.R., Paustian, M.L. e Kapur V. (2004).

Application of the genome sequence to address concerns that *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a foodborne pathogen. *Foodborne Pathog. Dis.* 1:3–15

- Barnich, N. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* 117, 1566–1574.
- Basler, T., Geffers, R., Weiss, S., Valentin-Weigand, P. e Goethe, R. (2008) *Mycobacterium avium* subspecies induce differential expression of pro-inflammatory mediators in a murine macrophage model: evidence for enhanced pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology*;213:879-888.
- Bentley, R.W., Keenan, J.I., Gearry, R.B., Kennedy, M.A., Barclay, M.L. e Roberts, R.L. (2008). Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a populationbased cohort of patients with Crohn's disease and control subjects. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1168–1172.
- Bernan, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L., Pavlik, I. (2006) Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review *Veterinarni Medicina*, 51, 365–389  
Review Article 365
- Bernstein, C.N., Nayar, G., Hamel, A. e Blanchard J.F. (2003). Study of animal-borne infections in the mucosas of patients with inflammatory bowel disease and population based controls. *J. Clin. Microbiol.* 41:4986–90.
- Bertalot, G., Villanacci, V., Gramegna, M., Orvieto, E. e Negrini, R., et al. (2001). Evidence of Epstein-Barr virus infection in ulcerative colitis. *Dig. Liver Dis.* 33: 551–58.
- Board on Agriculture and Natural Resources. (2003). *Diagnosis and Control of Johne's Disease*. Washington, DC: Natl. Acad. Press.
- Bouma, G. e Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 3:521–533.

- Buhner, S. (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 55, 342–347.
- Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R. e Hermon-Taylor, J. (2003). Detection and verification of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2915–2923.
- Cassatella, M. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 16:21–26.
- Chacon, O., Bermude, L.E. e Barletta, R.G. (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium Paratuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:329–63.
- Chamberlin, WM. e Naser, SA,. (2006) Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit*; 12: RA27–33.
- Chiodini, R.J. (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:90–117.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., Thayer, W.R. Jr. e Coutu, J.A. (1984). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 20:966–71.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Merkal, R.S. e Coutu, J.A. (1984). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 29:1073–79.

- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Coutu, J.A. (1986). The spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 24:357-363.
- Cho, J.H. (2003). Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Rev. Gastroenterol. Disord.* 3(Suppl. 1):S18-22.
- Clarke, C.J. (1994). Host responses to *Mycobacterium paratuberculosis*/*M. avium* infection. *Proc. 4th Int. Colloq. Paratuberc.*, pp. 345-54. Cambridge, UK.
- Collins, M.T., Lisby, G., Moser, C., Chicks, D. e Christensen, S., et al. (2000). Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J. Clin. Microbiol.* 38:4373-81.
- Comes, M.C., Gower-Rousseau, C., Colombel, J.F., Belaiche, J., Van Kruiningen, H.J., Nuttens, M.C. e Cortot, A. (1994). Inflammatory bowel disease in married couples: 10 cases in Nord Pas de Calais region of France and Liege county of Belgium. *Gut.* 35: 1316-1318.
- Cosma, C.L., Sherman, D.R. e Ramakrishnan, L. (2003). The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 57: 641-676.
- Cousins, D.V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R.J. e Kluver, P. (1999) Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes*; 13: 431-42.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L. e Oppenheimer, G.D. (1932). Regional ileitis: a pathological and clinical entity. *JAMA.* 99: 1323-9.
- Cuthbert, A.P., Fisher, S.A. e Mirza M.M., et al. (2002). The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease.

Gastroenterology. 122:867–874.

- Dalziel, T.K. (1913). Chronic interstitial enteritis. *BMJ*. ii:1068-9.
- Darfeuille-Michaud, A. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405–1413.
- David, H., Brum L., Prieto, E. (1994). *Manual de Micobacteriologia em Saúde pública: princípios e métodos*. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical. p. 85.
- Dell'Isola, B., Poyart, C. e Goulet, O. (1994). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. *J Infect Dis*; 169: 449–51.
- Ellingson, J.L., Stabel, J.R., Bishai, W.R., Frothingham, R. e Miller, J.M., (2000). Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol. Cell. Probes* 14, 153–161.
- European Commission. (2000) Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare Adopted 21 March 76p.
- Evans, A.S. (1976). Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale J. Biol. Med.* 49:175–95.
- Falkinham, J. O. (1994). Epidemiology of *Mycobacterium avium* infections in the pre- and post-HIV era. *Res. Microbiol.* III 145:169-172. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis.* 10(Suppl. 2):S274–76.
- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H.,

Pfyffer G.E., Jemmi, T., Baumgartner, A., Egger, M. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*; 7: 607–13

- Ferwerda, G., Kullberg, B.J. e de Jong, D.J., et al. (2007). *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J Leukoc Biol*;82:1011-1018.

- Fonager, K., Sørensen, HT. e Olsen, J. (1997). Change in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Denmark. A study based on the National Registry of Patients, 1981-1992. *Int J Epidemiol.*;26:1003–1008. [PubMed].

- Frank, TS. e Cook, S.M., (1996) Analysis of paraffin sections of Crohn's disease for *Mycobacterium paratuberculosis* using polymerase chain reaction. *Mod Pathol*. 1996;9:32–35.

- Fredericks, D.N. e Relman, D.A. (1996). Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:18–33.

- Freeman, H.J. (2001). Application of the Vienna Classification for Crohn's disease to a single clinician database of 877 patients. *Can J gastroenterol.*;15:89–93. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

- Friedman, S. e Blumberg, R.S. (1999). Inflammatory bowel disease. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*, ed. E Braunwald, SA Fauci, DL Kasper, SL Hauser, DL Longo, et al., pp. 1679–91. New York: McGraw-Hill. 15th ed.

- Friswell, M., Campbell, B. e Rhodes, J. (2010) The Role of Bacteria in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease *Gut and Liver*, Vol. 4, No. 3, September, pp. 295-306.

- Fuss, I.J., Heller, F. e Boirivant, M., et al. (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative

colitis. J Clin Invest. 113:1490–1497.

- Fuss, I.J. (2003). Cytokine network in inflammatory bowel disease. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2:101–112.
- Gasche, C., et al. (2000). A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology. Inflamm Bowel Dis 6 (1), 8-15.
- Gasche, C., Scholmerich, J., Brynskov, J., D'Haens, G., Hanauer, S.B., Irvine, E.J., Jewell, D.P., Rachmilewitz, D., Sachar, D.B. e Sandborn, W.J. (2000). A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. Inflamm Bowel Dis. 6:8–15. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M. e Vandembroucke Grauls, C.M., et al. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. J. Exp. Med. 197:7–17.
- Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M. e Vandembroucke Grauls C.M., et al. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. J. Exp. Med. 197:7–17.
- Gionchetti, P. (2003). Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. Gastroenterology 124, 1202–1209.
- Glawisc, W., Steineck, T. e Spargser, J. (2006). Infections caused by *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *hominissuis*, and *paratuberculosis* in free ranging red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in Austria, 2001-2004. J Wildl Dis. 42: 724-731.
- Graham, D.Y., Markesich, D.C. e Yoshimura H.H. (1987). Gastroenterology. Feb;92(2):436-42. PMID: 3792780. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

- Hanauer, S. (2006). Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. Volume 12, Supplement 1: S3-S9.
- Harris, N.B. e Barletta R.G. (2001). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in veterinary medicine. Clin. Microbiol. Rev. 14:489–512.
- Hendrickson, B.A., Gokhale, R. e Cho J.H. (2002). Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. Clin Microbiol Rev. 15:79–94.
- Hill, A.B. (1965). The environment and disease: association or causation? Proc. R. Soc. Med. 58:295–300.
- Hodgson, H.J., Potter, B.J. e Jewell, D.P. (1977). Immune complexes in ulcerative colitis and Crohn's disease. Clin. Exp. Immunol. 29:187–96.
- Hostetter, J., Steadham, E., Haynes, J., Bailey, T. e Cheville, N. (2003). Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 26: 269-283.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S. e Cezard, J.P., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 411:599–603.
- Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., Gower- Rousseau, C., Olson, J.M. e Lee, J.C., et al. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature 379:821–23.
- Hulten, K., El Zimaity, H.M. e Karttunen, T.J. (2001). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. Am J Gastroenterol; 96: 1529–35.
- Inderlied, C.B., Kemper, C.A. e Bermudez, L.E. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. Clin. Microbiol. Rev. 6:266– 310.

- Irvine, E. J. e Marshall, J. K. (2000). Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 119, 1740–1744.
- Jiao, X., Lo-Man, R., Guermonprez, P., Fiette, L., Deriaud, E. e Burgaud, S., et al. (2002). Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol.* 168: 1294- 1301.
- Juste, A.R., Elguezabal, N., Garrido, J.M., Pavon, A., Geijo, M.V., Svila, I., Cabriada, J., Tejada, A., Garcia-Campos, F., Casado, R., Ochotornena, I., Izeta, A., Greenstein, R.J. (2008). On the Prevalence of *M. avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA in the Blood of Healthy Individuals and Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Plosone*: 7:e2537.
- Kanazawa, K., Haga, Y. e Funakoshi, O., et al. (1999) Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. *J Gastroenterol.*;34:200 –206.
- Katz, J. (1994). The course of inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am.*;78:1275–1280. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Katz, J.A. e Fiocchi, C. (1996). Causes and mechanisms of Crohn's disease. In *Crohn's Disease*, ed. C Prantera, BI Korelitz, pp. 9–56. New York: Marcel Dekker.
- Kaufmann, S.H.E. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11:129 – 63.
- Koch, R. (1932). *The Aetiology of Tuberculosis*. New York: Natl. Tuberc. Assoc. 48 pp.
- Kucharzik, T., Lugerling, N., Weigelt, H., Adolf, M., Domschke, W. e Stoll, R. (1996). Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin. Exp. Immunol.* 104:483–90.

- Lambrecht, R.S. e Collins, M.T. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 15:239–46.
- Langholz, E., et al. (1997). Inflammatory bowel disease with onset in childhood. Clinical features, morbidity and mortality in a regional cohort. *Scand J Gastroenterol.* 32, 1939-1947. in Colli, Márcia Valéria (2007).
- Lees, CW., Barrett, JC., Parkes, M. e Satsangi, J. (2011) New IBD genetics: common pathways with other diseases, *Gut Online First*, published on February 7, as 10.1136/gut.2009.199679.
- Lisby, G., Andersen, J., Engbaek, K. e Binder, V. (1994). *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scand J Gastroenterol*; 29: 923–29.
- Loftus, E.V. Jr., Silverstein, M.D. e Sandborn, W.J., et al. (1998). Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology.* 114, 1161. in Sands, Bruce E. (2002).
- Lugton, I.W. (1999). Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol. Cell Biol.* 77:364–72.
- Markesic, D.C., Graham, D.Y. e Yoshimura, H.H. (1988). Progress in culture and subculture of spheroplasts and fastidious acid-fast bacilli isolated from intestinal tissues. *J Clin Microbiol.* 26: 1600-1603.
- May, G. R., Sutherland, L. R. e Meddings, J. B. (1993). Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 104, 1627–1632.
- McClure, H.M., Chiodini, R.J., Anderson, D.C., Swenson, R.B., Thayer, W.R.

- e Coutu, J.A. (1987). *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J Infect Dis.* 155: 1011-1019.
- McQuaid, K.R. (1999). Alimentary tract. In *Current Medical Diagnosis and Treatment*, ed. LM Tierney, SJ McPhee, MA Papadakis, pp. 538–637. Stanford, CT: Appleton & Lange.
  - Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B. e Cheville, N.F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* 25:131–37.
  - Mpofu, C.M., Campbell, B.J. e Subramanian, S., et al. (2007) Microbial mannan inhibits bacterial killing by macrophages: a possible pathogenic mechanism for Crohn's disease. *Gastroenterology*;133:1487-1498.
  - Munkholm, P. (1997). Crohn's disease-occurrence, course and prognosis. An epidemiologic cohort-study. *Dan. Med. Bull.* 44, 287. in Sands, Bruce E. (2002).
  - Murray, A., Oliaro, J., Schlup, M.M. e Chadwick, V.S. (1995). *Mycobacterium paratuberculosis* and inflammatory bowel disease: frequency distribution in serial colonoscopic biopsies using the polymerase chain reaction. *Microbios*; 83: 217–28.
  - Naser, S.A., Schwartz, D. e Shafran, I. (2000). Isolation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* 95:1094–95.
  - Nazareth, N., Magro, F., Martinho, A., Rodrigues, P., Alves, R., Macedo, G.N., Appelberg, R., Dias, C., Silva, F., Rodrigues, S., Lopes, S., Macedo, G., Sarmiento, A. (2012). *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* prevalence in portuguese IBD patients: correlation with disease activity and infliximab therapy. Manuscrito em preparação.

- Nerich, V., Monnet, E., Etienne, A., Louafi, S., Ramée, C., Rican, S., Weill, A., Vallier, N., Vanbockstael, V. e Auleley, G.R. (2006). Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis.*;12:218–226. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Neurath, M.F., Weigmann, B. e Finotto, S., et al. (2002). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med.* 195:1129–1143.
- Ogura, Y., Bonen, D.K. e Inohara, N., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411:603– 606.
- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E. e Dowds, T.A., et al. (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52:1591–97.
- Papadakis, K.A. e Targan, S.R. (2000). Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Annu Rev Med.*;51:289–298.
- Pearce, C.B., Duncan, H.D., Timmis, L. e Green, J.R. (2000). Assessment of the prevalence of infection with *Helicobacter pylori* in patients with inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12:439–43.
- Podolsky, D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 347: 417–429.
- Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J.F. e Naser, S.A. (2005). Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm Bowel Dis*; 11: 116–25.
- Report from the microbiological safety of food funders group. (2006). UK publicly founded research relating to *Micobacterium avium* subs. *Paratuberculosis*.

Research from 1990 to 2005.

- Richter, E., Wessling, J., Lugering, N., Domschke, W. e Rusch-Gerdes, S. (2002). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in a patient with HIV, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 8:729– 31.
- Rowbotham, D.S., Mapstone, N.P., Trejdosiewicz, L.K., Howdle, P.D. e Quirke, P. (1995). *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut*; 37: 660–67.
- Ryan, P., Bennett, M.W. e Aarons, S. (2002). PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut*; 51: 665–70.
- Rubery, E. (2002). A Review of the Evidence for a Link between Exposure to *Mycobacterium Paratuberculosis* (MAP) and Crohn's Disease (CD) in Humans. A report for the Food Standards Agency
- Sanderson, J.D., Moss, M.T., Tizard, M.L. e Hermon-Taylor, J. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut*; 33: 890–96.
- Sands, B.E. (2004). From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 126:1518–1532.
- Sands, Bruce E. (2002). Crohn's Disease Gastrointestinal and Liver Disease:Pathophysiology/Diagnosis/Menagement. vol.2, 2005-2038.
- Sartor, R.B. (2007). Bacteria in Crohn Disease: mechanisms of inflammation and therapeutics implications. *J Clin Gastroentrol.* May/Jun;41:37-43.
- Satsangi, J., Morecroft, J. e Shah, N.B., et al. (2003) Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17:3–18.

- Scanu, A.M., Bull, T.J., Cannas, S., Sanderson, J.D., Sechi, L.A., Dettori, G., Zanetti, S. e Hermon-Taylor J. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *J Clin Microbiol.* Dec;45(12):3883-90. Epub 2007 Oct 3.
- Secott, T.E., Lin, T.L. e Wu, C.C. (2002). Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 70:2670–75.
- Secott, T.E., Lin T.L. e Wu C.C. (2004). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* Fibronectin Attachment Protein Facilitates M-Cell Targeting and Invasion through a Fibronectin Bridge with Host Integrins. July. *Infect. Immun.* Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Sechi, L.A., Mura, M., Tanda, F., Lissia, A. e Solinas, A., et al. (2001). Identification of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 39:4514–17.
- Sechi, L.A, Gazouli, M. e Ikonopoulou, J. (2005). *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*, genetic susceptibility to Crohn's disease, and Sardinians: the way ahead. *J Clin Microbiol* ; 43: 5275–77.
- Secott, T.E., Lin, T.L. e Wu, C.C. (2001). Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 69:2075–82.
- Selby, W.S. (2004) *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis bacteraemia in patients with inflammatory bowel disease. *Lancet*;364: 1013–1014.
- Sellon, R. K. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice.

Infect. Immun. 66, 5224–5231.

- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., et al. (2007). *Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease*. *Gastroenterology*;132: 2313-2319.
  
- Shin, AR., Kim, HJ. e Cho, SN., et al. (2009) Identification of seroreactive proteins in the culture filtrate antigen of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* human isolates to sera from Crohn's disease patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*;58:128-137.
  
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J. e Logan, R., et al. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south?. Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 39,690. In: “Sands, Bruce E. (2002)”.
  
- Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D., Bernstein, C.N., Brant, S.R., Caprilli, R., Colombel, J.F., Gasche, C. e Geboes, K. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*;19 Suppl A:5–36. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
  
- Singh, SB., Davis, A.S., Taylor, G.A. e Deretic, V. (2006) Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*;313:1438-1441.
- Singh, S., Graff, L.A., Bernstein, C.N. (2009). *Do NSAIDs, antibiotics, infections, or stress trigger flares in IBD?* *Am J Gastroenterol*;104:1298-1313.
  
- Soderholm, J. D. (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 50, 307–313.
  
- Sousa, J. e Ferreira, W. (2000). *Microbiologia*. Lisboa, Lidel, vol.2. pp.85-98.

- Streeter, R.N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P. e Rings, DM. (1995) Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*;56:1322-1324.
- Stenson, W.F. (2000). Inflammatory bowel disease. In *Cecil Textbook of Medicine*, ed. L Goldman, JC Bennett, Philadelphia: Saunders, pp. 722–29.
- Sutherland, L. (1991). Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* 32, 1071–1075.
- Sweeney, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12:305–12.
- Tamura, K., Fukuda, Y., Sashio, H., Takeda, N. e Bamba, H., et al. (2002). IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease. *J. Gastroenterol.* 37(Suppl. 14):111–16.
- Targan, S.R., Shanahan, F. e Karp, L.C. (2003). *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Boston: Kluwer.
- Tasara, T. e Stephan, R. (2005) Development of an F57 sequence-based realtime PCR assay for detection of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol*; 71: 5957–68.
- te Velde, A.A., Van Kooyk, Y., Braat, H., Hommes, D.W. e DelleMijn, T.A., et al. (2003). Increased expression of DC-SIGN+IL- 12+IL-18+ and CD83+IL-12– IL-18– dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Eur. J. Immunol.* 33:143–51.
- Thia, K.T., Loftus, E.V., Sandborn, W.J. e Yang, S.K. (2008). An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol*;103:3167–3182. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Timms, V.J., Gehringer, M.M., Mitchell, H.M., Dascalopoulos, G., Neilan, B.A. (2011). How accurately can we detect *Mycobacterium avium subsp.*

Paratuberculosis infection?. Journal of Microbiological Methods. 85 1-8

- Tiveljung, A., Soderholm, J.D., Olaison, G., Jonasson, J. e Monstein, H.J. (1999). Presence of eubacteria in biopsies from Crohn's disease infl ammatory lesions as determined by 16S rRNA gene-based PCR. J Med Microbiol ; 48: 263–68.
- Tysk, C., Lindberg, E., Jarnerot., G. e Floderus-Myrhed, B. (1988). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. Gut. 29: 990-996.
- Twort, F. e Ingram, G.L.Y. (1912). A method for isolating and cultivating the Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. Proc. R. Soc. Ser. B 84:517–42.
- Van Den Bogaerde, J., Cahill, J., Emmanuel, A.V., Vaizey, C.J. e Talbot, I.C., et al. (2002). Gut mucosal response to food antigens in Crohn's disease. Aliment. Pharmacol. Ther. 16:1903–15.
- Van Deventer, S.J. (2000). Immunotherapy of Crohn's disease. Scand. J. Immunol. 51:18–22.
- Vary, P.H., Andersen, P.R., Green, E., Hermon-Taylor, J. e McFadden, J.J. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect Mycobacterium paratuberculosis in Johne's disease. J. Clin. Microbiol. 28, 933–937.
- Xavier, R.J. e Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Vol 448: 26 July jdoi:10.1038/nature06005.
- Weiss, D.J., Evanson, O.A., Deng, M. e Abrahamsen, M.S. (2004). Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Vet Pathol. 41: 326-337.

- Weiss, D.J., Evanson, O.A., McClenahan, D.J., Abrahamsen, M.S. e Walcheck, B.K. (2001). Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* or *Mycobacterium avium subsp. avium*. *Infect Immun.* Feb;69(2):1002-8.
  
- Whitlock, R.H. e Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12:345–56.
  
- Wright, J.P., Froggatt, J. e O’Keefe, E.A., et al. (1986). The epidemiology of inflammatory bowel disease in Cape Town 1980-1984. *S Afr Med J.* 70, 10.