



Kolonizacja przewodu pokarmowego przez grzyby z rodzaju *Candida* wśród dzieci z celiakią w porównaniu do dzieci zdrowych

Agnieszka Krawczyk¹, Dominika Salamon¹, Zofia Grzenda-Adamek², Kinga Kowalska-Duplaga², Tomasz Gosiewski¹

¹Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Lekarski, Katedra Mikrobiologii, Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

²Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Lekarski, Instytut Pediatrii, Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia

WPROWADZENIE:

Do rozwoju celiakii (CD) konieczne są zmiany w genotypie, a mianowicie występowanie haplotypów DQ2 lub DQ8, kodujących specyficzne antygeny w regionie HLA. Jednak sam czynnik genetyczny jest niewystarczający do wyzwolenia objawów klinicznych, co sugeruje kluczowe znaczenie czynników środowiskowych w patogenezie CD. Ostatnio, istotną rolę w etiologii celiakii przypisuje się dysbiozie jelitowej. Przypuszcza się, że niektóre mikroorganizmy występujące w nadmiernej liczbie wśród chorych pacjentów, oddziałują z glutenem, wytwarzając peptydy aktywujące silną reakcję immunologiczną pojawiającą się w przebiegu celiakii. Większość dotychczasowych badań skupiała się na analizie bakteriobiomu, natomiast niewiele z nich uwzględniało udział grzybów, które także wchodzą w skład naturalnej mikrobioty jelitowej. Brakuje również badań dynamiki zmian mikrobiomu przewodu pokarmowego w czasie, które przybliżą do uzyskania odpowiedzi czy udokumentowana dysbioza jest czynnikiem wyzwalającym zachorowanie na celiakię u osób predysponowanych genetycznie, czy jest to wynik stosowania rygorystycznej diety i trwającego stanu zapalnego.

Wobec powyższego, za cel postawiono sobie określenie liczby grzybów *Candida albicans* u dzieci w momencie rozpoznania celiakii oraz po 6 miesiącach od rozpoznania choroby w porównaniu do dzieci zdrowych.

MATERIAŁ I METODY:

Materiałem poddanym badaniom były próbki kału pobrane od dzieci:

- 1) z celiakią - w momencie zdiagnozowania choroby (n=33)
- 2) z celiakią - 6 miesięcy od pierwszorazowego rozpoznania choroby (n=14)
- 3) zdrowych - stanowiących grupę kontrolną (n=23)

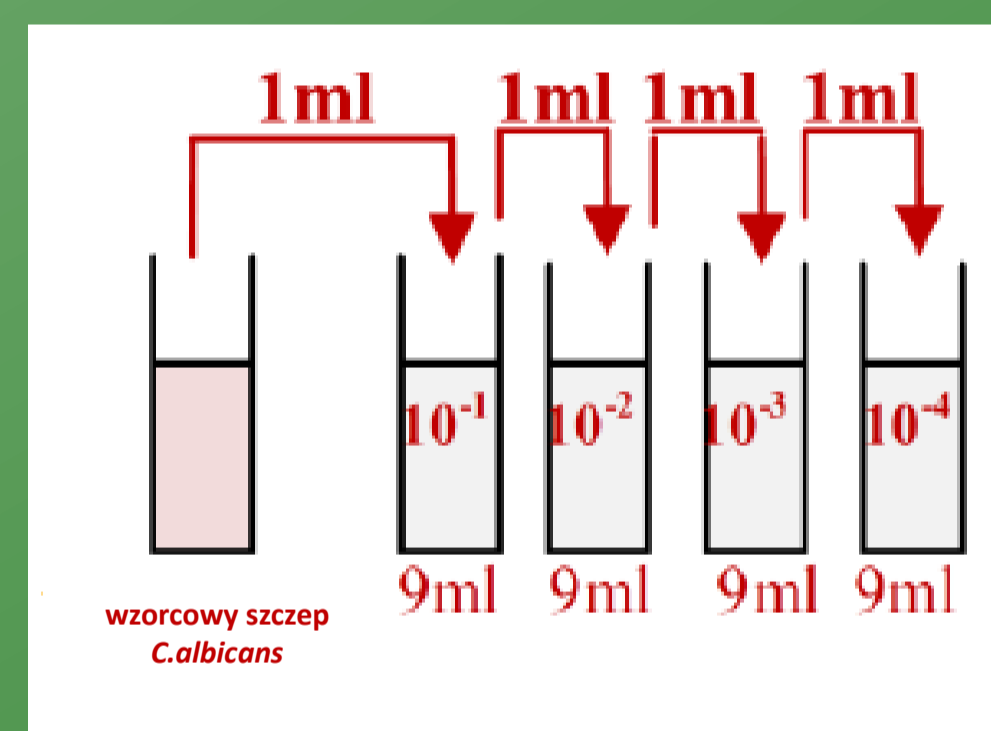
Z próbek kału wyizolowano DNA grzybicze, które następnie poddano amplifikacji metodą qPCR, w celu określenia liczby komórek *C. albicans* w poszczególnych grupach. Do precyzyjnego oznaczenia liczby grzybów wygenerowano krzywe wzorcowe. W tym celu przeprowadzono izolację DNA z 48-godzinnych hodowli szczepu referencyjnego *C. albicans* ATCC 1023. Krzywe standardowe wykreślono z 10-krotnych seryjnych rozcieńczeń odpowiadających od 10^1 do 10^7 CFU/ml, dzięki czemu mając dany punkt Ct na krzywej wzorcowej, możliwe było określenie dokładnej liczby mikroorganizmów w badanych próbkach.



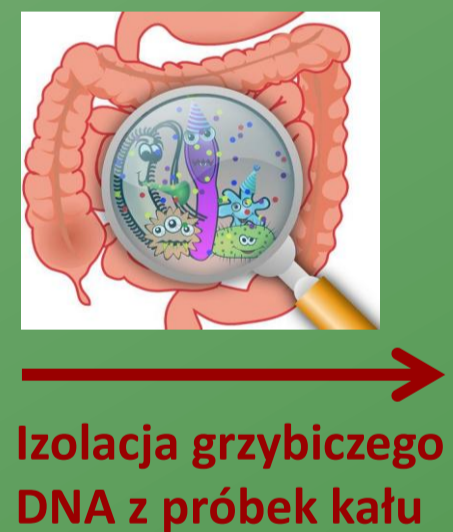
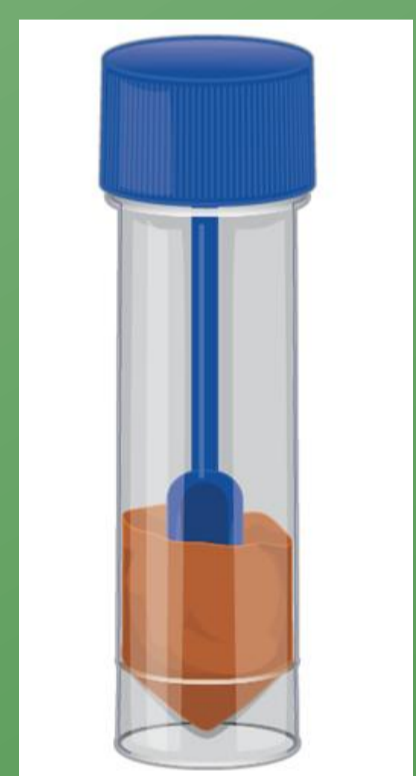
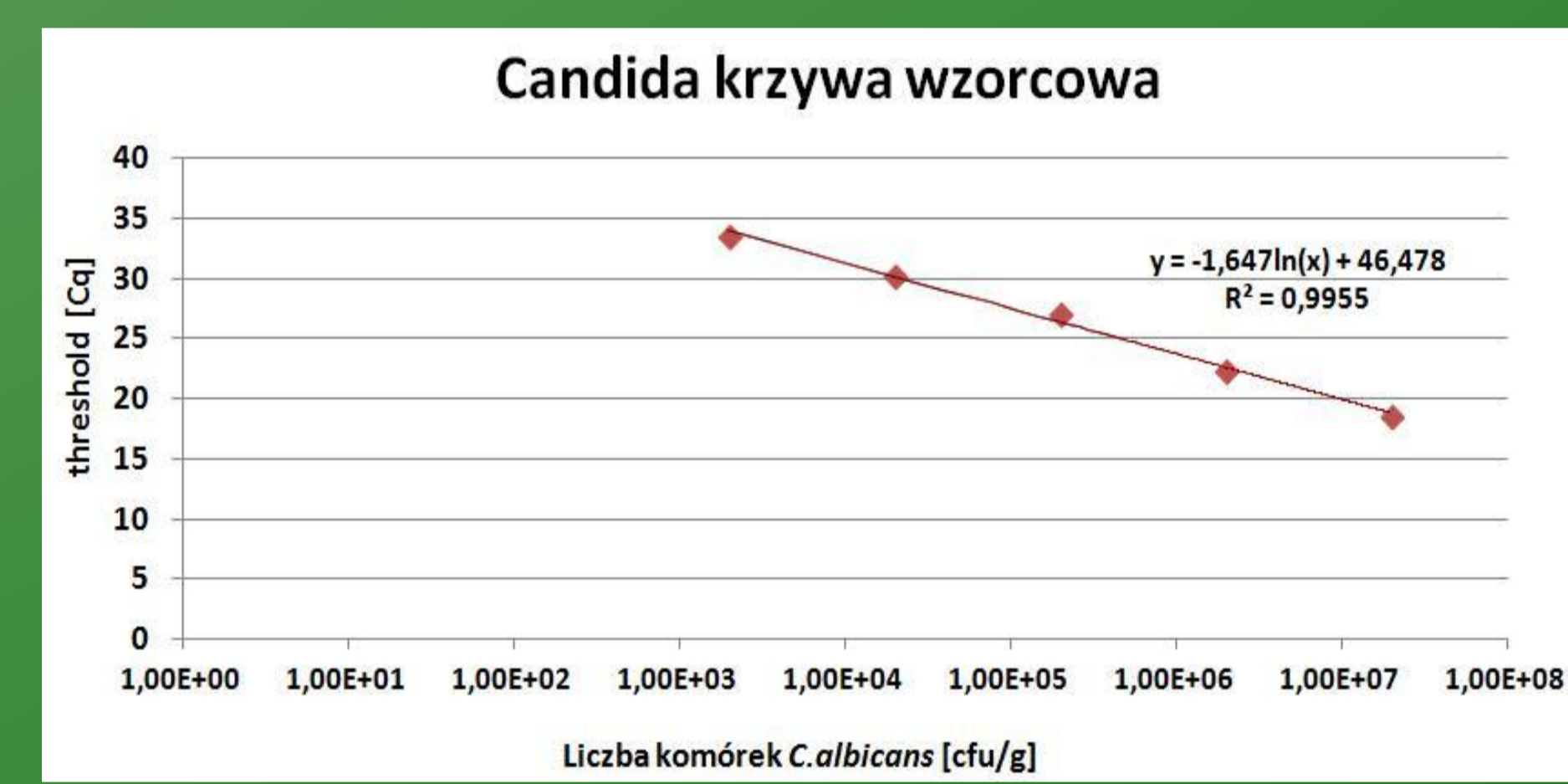
Z powierzchni pożywki hodowlanej pobrano biomasę grzybiczą



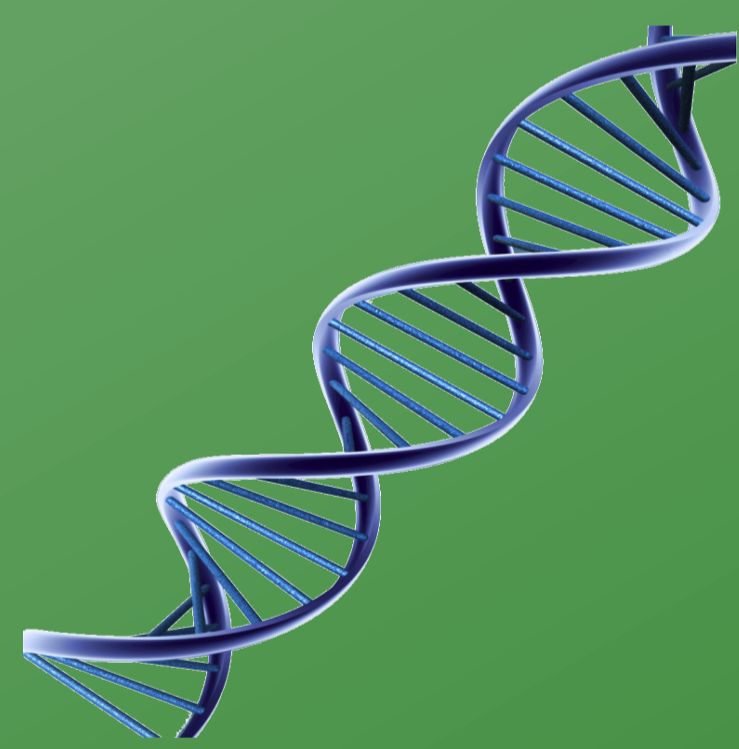
Za pomocą densyrometru doprowadzono do 5 jednostek w skali McFarlanda.



Wykreślono krzywe standardowe z 10-krotnych seryjnych rozcieńczeń odpowiadające od 10^1 do 10^7 CFU/ml



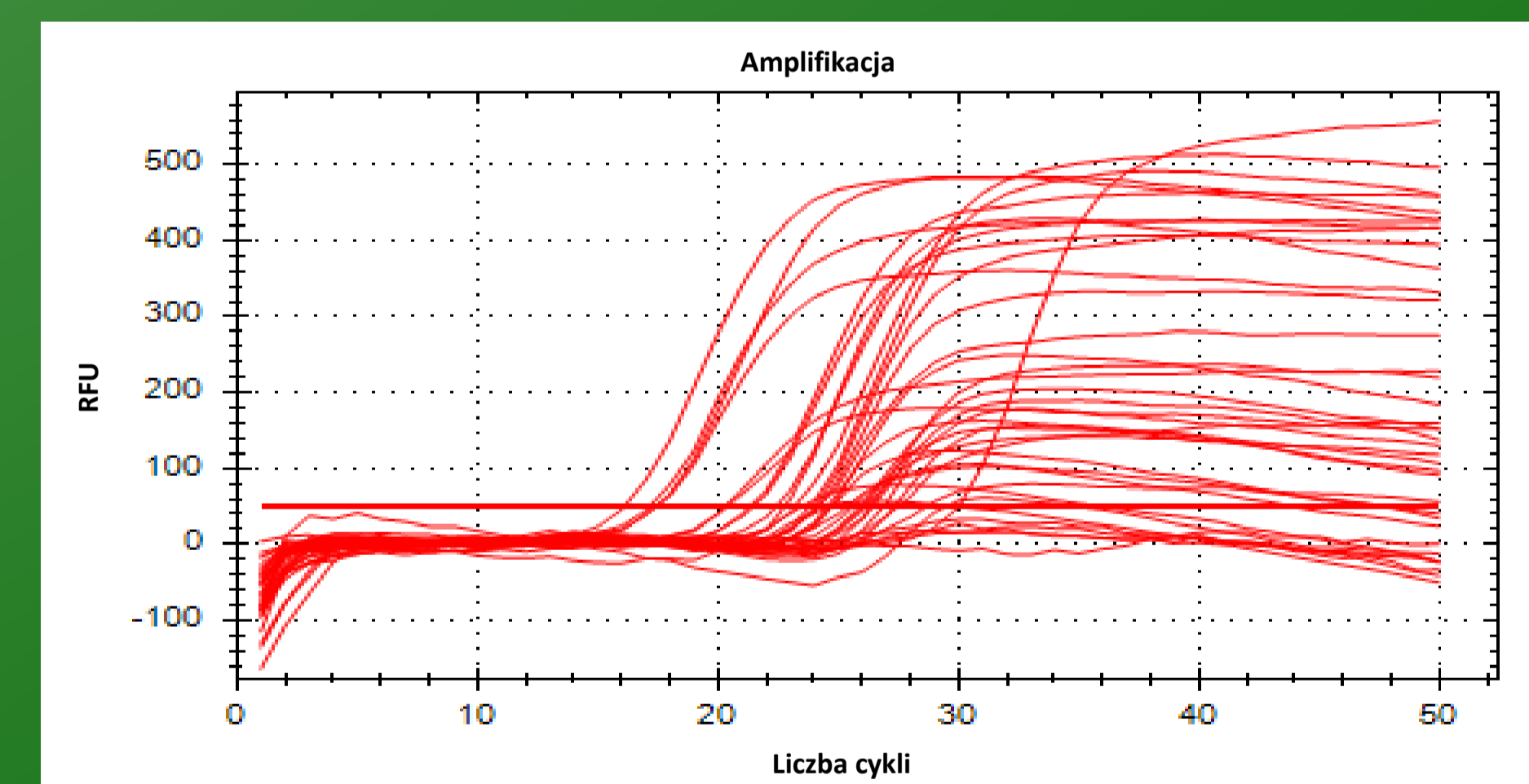
Izolacja grzybiczego DNA z próbek kału



Real-Time PCR



Przykładowy wykres amplifikacji *Candida albicans* badanych prób



WYNIKI:

W grupie pacjentów z pierwszorazowym rozpoznaniem celiakii, liczba *C. albicans* oscylowała na poziomie 3.51×10^8 CFU/g ($\pm 1.34 \times 10^9$) i była porównywalna ($p=0.65$) z liczbą grzybów w grupie kontrolnej 7.07×10^8 CFU/g ($\pm 1.7 \times 10^9$). Liczba *C. albicans* u pacjentów z celiakią po 6 miesiącach od diagnozy choroby, wzrosła do wartości 2.95×10^9 CFU/g ($\pm 7.96 \times 10^9$), natomiast zmiany te nie były istotne statystycznie w porównaniu do liczby grzybów wśród pacjentów z pierwszorazowym rozpoznaniem celiakii oraz w stosunku do grupy kontrolnej ($p>0.05$).

WNIOSKI:

1. Liczebność *C. albicans* wśród pacjentów z celiakią w momencie diagnozy choroby nie różni się istotnie w porównaniu do liczby tych grzybów kolonizujących jelito dzieci zdrowych.
2. Liczba *C. albicans* wśród pacjentów z celiakią wzrosła po 6 miesiącach od diagnozy choroby, co sugeruje, iż stwierdzane zaburzenia w obrębie mykrobiomu jelitowego być może są wynikiem stosowanej diety bezglutenowej, natomiast nie jest to czynnik indukujący zachorowanie.

Liczba *C. albicans* w badanych próbkach kału

