

Andrzej Szkaradkiewicz¹, Izabela Chudzicka-Strugała¹, Barbara Zwoździak¹,
Ryszard Marciniak², Agnieszka Wasilewska², Michał Drews²

**MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS
W NIESWOISTYCH CHOROBYCH ZAPALNYCH JELIT**

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM w Poznaniu

Kierownik: Andrzej Szkaradkiewicz

²Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej,

Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej AM w Poznaniu

Kierownik: Michał Drews

*W pracy przedstawiono wyniki badań występowania zakażenia *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego oraz u ochotników zdrowych. Uzyskane wyniki pozwalają sugerować współudział *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* w etiopatogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna.*

*Słowa kluczowe: choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, *Mycobacterium paratuberculosis**

*Key words: Leśniowski-Crohn's disease, ulcerative colitis, *Mycobacterium paratuberculosis**

WSTĘP

Nieswoiste choroby zapalne jelit są to przewlekłe choroby zapalne o nieznannej etiologii i obejmują dwie główne grupy: chorobę Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (1). Choroba Leśniowskiego-Crohna jest pełnościennym, przeważnie ziarniniakowym zapaleniem, rozwijającym się w dowolnym odcinku przewodu pokarmowego. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego charakteryzuje się niezziarniniakowym przewlekłym zapaleniem zlokalizowanym wyłącznie w śluzówce odbytnicy i okrężnicy. Powyższe zespoły chorobowe nadal stanowią poważny problem kliniczny, determinowany ich przewlekłym, ciężkim przebiegiem i występowaniem powikłań miejscowych oraz odległych (2). Ostatnio sugeruje się związek etiopatogenetyczny bakterii *Mycobacterium paratuberculosis* (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*) z chorobą Leśniowskiego-Crohna, co wydaje się stwarzać nowe perspektywy terapeutyczne (3).

Biorąc pod uwagę powyższe, celem pracy było zanalizowanie występowania zakażeń *M. avium* subsp. *paratuberculosis* u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego-Crohna.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono u 36 chorych, hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej A.M. w Poznaniu i u 12 zdrowych ochotników. Wśród chorych wyodrębniono następujące grupy badawcze: grupę 1 obejmującą 16 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna w wieku 15-42 lat i grupę 2 obejmującą 20 pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego w wieku 21-50 lat. Grupę 3 (kontrolną) stanowiło 12 zdrowych ochotników w wieku 23-60 lat. Charakterystyki pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego przedstawiono w tabeli I. U wszystkich chorych przeprowadzono zabieg operacyjny polegający na resekcji częściowej lub całkowitej jelita grubego. Materiał do badań stanowiły fragmenty pobranego jelita. Natomiast w grupie 3 (kontrolnej) wykonano kolonoskopię z pobraniem wycinka jelit; w badaniu histologicznym nie wykazano żadnych zmian patologicznych.

Ekstrakcja DNA. Materiał tkankowy homogenizowano (Power Gen 125, Fisher Scientific), wirowano i nadsącz zawieszano w buforze lizującym dla *Mycobacterium*, inkubując przez 6 godz. w temp. 37°C, a następnie izolowano DNA, przy użyciu zestawu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Oznaczanie DNA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. DNA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* wykrywano stosując metodę PCR-ELISA (*Mycobacterium paratuberculosis* PCR; Institut Pourquier - France). Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z instrukcją w objętości całkowitej 50 µl (48 µl mieszaniny + 2 µl DNA), z użyciem biotynylowanych starterów dla sekwencji IS900, stosując następujący program: 1 cykl 37°C przez 5 min, 1 cykl 95°C przez 5 min, 45 cykli: 95°C przez 30 sek, 62°C przez 30 sek, 72°C przez 40 sek, a następnie 1 cykl 72 °C przez 8 min. Uzyskany biotynylowany produkt PCR analizowano kolorymetryczną metodą mikropłytkową z użyciem komplementarnej jednoniciowej sondy RNA znakowanej digoksygeniną (DIG). Immobilizowane hybrydy wykrywano za pomocą przeciwciał anty-DIG, skoniugowanych z peroksydazą. Reakcję barwną wywoływano stosując substrat TMB. Absorbancję odczytywano z użyciem czytnika (Behring Microstrip Reader), przy $\lambda=450$ nm.

Wyniki jako pozytywne dla DNA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* uznawano, zgodnie z instrukcją, przy wartości absorbancji (A) $\geq 0,300$.

Analiza statystyczna wyników. Różnice w częstości pozytywnych wyników w badanych grupach analizowano przy użyciu dokładnego testu Fishera. Hipotezy statystyczne weryfikowano na poziomie istotności $p<0,05$.

WYNIKI

Tabela I. Charakterystyka badanych pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

Table I. Characteristics of studied patients with Leśniowski-Crohn's disease and ulcerative colitis

Charakterystyka	Pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna	Pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego
Wiek (w chwili rozpoznania choroby) zakres:	15-42 lat	21-50 lat
Płeć	M (liczba)	9
	K (liczba)	11
Immunosupresja (liczba pacjentów)		
Sterydoterapia	8	11
Immunomodulatory	0	2
		(Azathiopryna)
Wskazania do zabiegu operacyjnego: liczby		
Zwężenie	8	4
Przetoka	4	0
Zwężenie + przetoka	0	0
Zapalenie jelit (częściowe/pancolitis)	0	11/12
Inne (zmiany w jel. grubym)	3	20

Uzyskane wyniki oznaczeń DNA *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w poszczególnych grupach badanych przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Wyniki oznaczeń DNA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* w poszczególnych grupach badanychTable II. Results of DNA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in individual groups of studied individuals

Grupa badanych	Liczba badanych	Liczba (%) przypadków	
		DNA (+) <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	DNA (-) <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
Grupa 1 (pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohna)	16	10 (62,5%)*	6 (37,5%)
Grupa 2 (pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego)	20	5 (25%)	15 (75%)
Grupa 3 (grupa kontrolna)	12	1 (8,3%)	11 (91,7%)

* istotność statystyczna w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$) – statistical significance as compared to the control group

W grupie 1 obejmującej 16 pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna wykazano obecność *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w 10 (62,5%) przypadkach. W grupie 2 liczącej 20 chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego *M. avium* subsp. *paratuberculosis* zidentyfikowano w 5 (25%) przypadkach. W grupie 3 (kontrolnej) obejmującej 12 pacjentów, występowanie zakażenia *M. avium* subsp. *paratuberculosis* stwierdzono w 1 (8,3%) przypadku. Analizując statystycznie uzyskane wyniki stwierdzono, że *M. avium* subsp. *paratuberculosis* występuje istotnie częściej w grupie 1 pacjentów w porównaniu z grupą 2 i 3 ($p < 0,05$). Natomiast nie wykazano statystycznej różnicy w częstości występowania *M. avium* subsp. *paratuberculosis* między grupą 2 i 3 ($p > 0,05$).

DYSKUSJA

Dobrze już udokumentowano rolę atypowego prątka *M. avium* subsp. *paratuberculosis* jako czynnika etiologicznego przewlekłego zapalenia ziarniniakowatego jelit (tzw. choroby Johnego, JD) u przeżuwaczy, głównie u bydła (4,5). Jednocześnie opisano podobieństwo zmian histologicznych w rozpoznawanej u ludzi chorobie Leśniowskiego-Crohna, a ponadto w jej przebiegu wykazano możliwość występowania także *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (6,7). Jednak do chwili obecnej, etiologia nieswoistych chorób zapalnych jelit (choroby Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego) nie została ostatecznie wyjaśniona. Aktualnie uznaje się znaczenie czynników genetycznych, środowiskowych i immunologicznych w patogenezie tych chorób, chociaż dokładny mechanizm występujących uszkodzeń tkankowych nadal nie jest znany (7,8). Badania dotyczące roli *M. avium* subsp. *paratuberculosis* jako czynnika przyczynowego choroby Leśniowskiego-Crohna dają kontrowersyjne wyniki. Z jednej strony, stwierdza się bowiem zwiększoną częstość występowania *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w materiale tkankowym pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (3,7,9), natomiast z drugiej strony, wykazano odrębność genotypową między szczepami bydłowych *M. avium* subsp. *paratuberculosis* i uzyskanymi od chorych osób. Ponadto brak jest danych epidemiologicznych potwierdzających transmisyjność tego patogenu u ludzi, a także nie stwierdzono występowania komórkowej odpowiedzi odpornościowej wobec *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna (10,11,12). Z kolei, w badaniach odpowiedzi humoralnej u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit i u osób zdrowych, wykazano u około 35% wszystkich pacjentów obecność surowicznych przeciwciał anty-*M. avium* subsp. *paratuberculosis* (13). Jednak częstość występowania seropozytywności nie różniła się statystycznie w chorobie Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego i grupie kontrolnej, co może przemawiać przeciwko swoistości oddziaływania *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w chorobie Leśniowskiego-Crohna.

W prezentowanych w tej pracy badaniach wykryto w grupie osób zdrowych (kontrolnej) w materiale tkankowym obecność *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w 1 przypadku (8,3%). Stwierdzony niski odsetek występowania tego patogenu w grupie kontrolnej jest zgodny z innymi danymi (7,9), co może uwiarygodniać uzyskane wyniki. U chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego odsetek wykrywalności *M. avium* subsp. *paratuberculosis* był wyższy (25%). Jednak nie różnił się statystycznie od częstości występowania tego patogenu w grupie kontrolnej, co koresponduje z wynikami innych autorów (7,9).

Jednocześnie wykazana statystycznie częstsza wykrywalność *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w chorobie Leśniowskiego-Crohna w porównaniu z pozostałymi grupami badanych, pozwala sugerować współdziałanie wymienionego patogenu w etiopatogenezie tej jednostki chorobowej.

Z kolei, wiadomym jest, że do zakażenia człowieka *M. avium* subsp. *paratuberculosis* najczęściej dochodzi drogą pokarmową poprzez produkty spożywcze, głównie mleko, zanieczyszczone w/w patogenem, występującym u zwierząt. Stwierdzono bowiem, że standardowa pasteryzacja mleka (w warunkach: 63,5 °C przez 30 min. lub 71,7 °C przez 15 sek.) jest niewystarczająca dla całkowitej inaktywacji *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w mleku (14,15). Tak więc, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* stanowi dla człowieka potencjalny czynnik chorobotwórczy pochodzenia odzwierzęcego.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki mogą wskazywać na udział *M. avium* subsp. *paratuberculosis* w etiopatogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna. Diagnostyka laboratoryjna tej jednostki chorobowej powinna zatem obejmować badanie mikrobiologiczne wycinka jelit w kierunku obecności tego patogenu dla uwzględnienia leczenia przeciwpłatkowego. Jednocześnie, produkty spożywcze zanieczyszczone *M. avium* subsp. *paratuberculosis* mogą stanowić potencjalne źródło zakażenia dla ludzi.

*A Szkaradkiewicz, I Chudzicka-Strugała, B Zwoździak, R Marciniak, A Wasilewska,
M Drews*

MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

SUMMARY

In the paper results were presented of a study on manifestation of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 16 patients aged 15-42 years with Leśniowski-Crohn disease (group 1), in 20 patients aged 21-50 years with ulcerative colitis (group 2) and in 12 healthy individuals aged 23-60 years (group 3, control). All the ill patients were subjected to surgery, involving partial or total resection of large intestine, while individuals in group 3 (control) were subjected to colonoscopy with sampling of large intestine. Using mechanical/enzymatic technique DNA was extracted from the tissue material and was identified using PCR-ELISA technique (*Mycobacterium paratuberculosis* PCR; Institut Pourquier – France). Colour reaction was evoked using the TMB substrate. In the studies presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* was noted in 10 (62.5%) patients with Leśniowski-Crohn disease, in 5 (25%) patients with ulcerative colitis and in 1 patient 1 (8.3%) patient of the control group. The obtained results permit to suggest that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bacteria participate in etiopathogenesis of Leśniowski-Crohn disease.

PIŚMIENNICTWO

1. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. Clin Microbiol Rev 2002;15:79-94.

2. Farthing MJG. Severe inflammatory bowel disease: medical management. *Dig Dis* 2003;21:46-53.
3. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, i in. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2003;41:2915-2923.
4. Chiodini RJ, Kruiningen HJV, Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet* 1984;74:218-262.
5. Collins MT. Paratuberculosis: review of present knowledge. *Acta Vet Scand* 2003;44:217-221.
6. Chiodini RJ. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:90-117.
7. Sanderson JD, Moss MT, Tizard ML, i in. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992;33:890-896.
8. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-536.
9. Autschbach F, Eisold S, Hinz U, i in. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 2005;54:944-949.
10. Motiwala AS, Strother M, Amonsin A, i in. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:2015-2026.
11. Olsen I, Wiker HG, Johnson E, i in. Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Scand J Immunol* 2001;53:198-203.
12. Sartor RB. Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* 2005;54:896-898.
13. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, i in. Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2004;42:1129-1135.
14. Chiodini RJ, Hermon-Taylor J. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 629-631.
15. Grant IR, Ball HJ, Neill SD, Rowe MT. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 631-636.

Otrzymano: 16.11.2006 r.

Adres autora:

Prof. dr hab. med. Andrzej Szkaradkiewicz
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM
ul. Wieniawskiego 3, 61-712 Poznań
e-mail: szkaradkiewicz@poczta.onet.pl