

Intestinal microflora

part I – general overview

Jana Juránková¹, Jan Lata², Veronika Příbramská², Dagmar Koukalová³

¹Department of Clinical Microbiology, Brno and University Hospital Brno, Czech Republic

²Department of Internal Medicine – Hepatogastroenterology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno and University Hospital Brno, Czech Republic

³Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

Summary

The article presents an overview of development of intestinal microflora, its composition and function in individual parts of the gastrointestinal tract, and the role of both internal and external factors. At the same time,

colonisation resistance is detailed, i.e. commensal bacteria in the intestine preventing pathogens from growing. In addition, the impact of intestinal microflora on the immune system is explained.

KEYWORDS: IMMUNE SYSTEM, COLONISATION RESISTANCE, INTESTINAL MICROFLORA

In adult humans, the intestine is a tube about 7–10 metres long. Its extremely irregular surface is covered by a single layer of epithelial cells, representing an area approximately equal to the size of a tennis court (200 m²). The intestine, sterile during foetal development, is first colonised only as the foetus passes through the birth canal. After birth, the intestine is rapidly colonised by many microorganisms whose composition varies markedly in the first days of life. Within a week, intestinal microflora has a stable composition, depending on the form of birth, surrounding environment and nutrition. Bifidobacteria, prevailing in breastfed infants, are much less frequent in those who are formula-fed. Also, breastfed babies are earlier colonised by those bacterial genera typical for the intestinal microflora of adult humans [24]. Another determining factor is the environment as in babies born by Caesarean section, the composition of intestinal microflora is stabilised much later. Preterm infants and those hospitalised for a long time have an aberrant composition of intestinal microflora.

Their normal healthy microflora, comprising mainly lactobacilli and bifidobacteria, is replaced by hospital strains, such as potentially pathogenic enterococci, staphylococci, enterobacteria and others. The initial intestinal colonisation is crucial for the further development of humans as the bacteria present may modulate gene expression in epithelial cells and thus produce a favourable environment for themselves [6]. Primary colonisers are already permanently settled in the intestine, determine its colonisation by other bacterial genera later in life and are essential to the final composition of the intestinal microflora in adulthood.

Major changes in the character of intestinal ecosystem occur after the baby is no longer breastfed and solid foods are introduced [12]. During this period, anaerobes such as bacteroides and clostridia gain their position and the intestinal ecosystem develops into its stable form. Intestinal microflora weighing over 1 kg contains an enormous number of microbes. Their amount is more than ten times the number of cells in the human body. The intestinal microbial

community comprises over 500 species, of which most have never been cultured and many have not even been identified. Intestinal microflora contains both autochthonous or resident bacteria and allochthonous or transient bacteria, i.e. those only passing through the intestine [19]. Most intestinal bacteria function as an anaerobic bioreactor facilitating digestion of polysaccharides difficult to digest and synthesising micronutrients including vitamins and short-chain fatty acids. Products of fermentation by these bacteria may provide as much as 10% of an individual's daily energy needs [5,18].

The relationship between the host and bacteria in intestinal microflora also plays an important role in postnatal development, intestinal maturation and development of the mucosal immune system [13].

MICROFLORA IN THE INDIVIDUAL PARTS OF THE GIT

Normal microflora of the gastrointestinal tract is an enormously complex ecosystem comprising both aerobic and anaerobic microorganisms. Together

Střevní mikroflóra

I. část – obecný přehled

Jana Juránková¹, Jan Lata², Veronika Příbramská², Dagmar Koukalová³

¹Oddělení klinické mikrobiologie, FN Brno

²Interní hepato-gastroenterologická klinika, LF MU a FN Brno

³Ústav mikrobiologie, LF UP a FN Olomouc

Souhrn

V článku je podán přehled o vývoji střevní mikroflóry, jejím složení a funkci v jednotlivých částech gastrointestinálního traktu a vlivu vnitřních i vnějších faktorů. Současně je rozebrána kolonizační rezistence, kdy

komensální bakterie ve střevě zabraňují přerůstání patogenů. Rovněž je věnována pozornost vlivu střevní mikroflóry na imunitní systém.

KLÍČOVÁ SLOVA: IMUNITNÍ SYSTÉM, KOLONIZAČNÍ REZISTENCE, STŘEVNÍ MIKROFLÓRA

ÚVOD

Střevo dospělého člověka je 7–10 m dlouhá trubice. Jeho extrémně nepravidelný povrch je pokryt jednou vrstvou epiteliálních buněk, které reprezentují plochu velikosti asi tenisového kurtu (200 m²). V období fetálního vývoje je sterilní a prvními mikroorganismy se začíná osídlovat teprve při průchodu plodu porodními cestami. Po porodu je střevo velmi rychle kolonizováno různými mikroorganismy, prvních několik dní života je jejich složení značně variabilní. Po prvním týdnu již má střevní mikroflóra stabilní zastoupení, které je závislé na způsobu porodu, okolním prostředí a druhu výživy. U kojených dětí převažují bifidobakteria, zatímco u dětí s umělou výživou může být jejich počet několiknásobně menší. Kojené děti jsou dříve kolonizovány bakteriálními rody, jejichž výčet připomíná střevní mikroflóru dospělého člověka [24]. Životní prostředí je dalším důležitým určujícím faktorem, neboť děti narozené císařským řezem dosahují stabilního složení střevní mikroflóry podstatně později. Také předčasně narozené a dlouhodobě hospitalizované děti

mají zastoupení střevní mikroflóry aberantní. Normální zdravá mikroflóra, sestávající se hlavně z laktobacilů a bifidobakterií, u nich bývá nahrazena nemocničními kmeny, jako jsou potenciálně patogenní enterokoky, stafylokoky, enterobakterie a další. Počáteční kolonizace střeva hraje velmi důležitou roli i v dalším vývoji člověka, protože přítomné bakterie mohou modulovat expresi genů epiteliálních buněk, a vytvářet tak pro sebe příznivé prostředí [6]. Primární kolonizátoři sídlí již ve střevě trvale a determinují kolonizaci střeva dalšími bakteriálními rody později v životě a jsou důležití pro konečné složení střevní mikroflóry v dospělosti.

Velké změny v charakteru střevního ekosystému nastanou po skončení kojení a převedení dítěte na pevnou stravu [12]. Během tohoto období získávají svoje pevné postavení anaeroby, jako jsou *Bacteroides* sp. a *Clostridium* sp. a střevní ekosystém se vyvíjí do své stabilní podoby. Střevní mikroflóra obsahuje nepředstavitelné množství mikrobů vážících více než 1 kg, toto množství přesahuje desetinásobně počet buněk v lidském těle.

Mikrobiální komunita ve střevě čítá více než 500 druhů, většina z nich nebyla nikdy vykultivována a mnoho z nich nebylo nikdy ani identifikováno. Střevní mikroflóra obsahuje bakterie, které jsou ve střevě pevně usazené (autochtonní, rezidentní), a bakterie, které střevem pouze procházejí (alochtonní, tranzientní) [19]. Většina z bakterií obsažených ve střevě vytváří anaerobní bioreaktor, který napomáhá trávit těžko stravitelné polysacharidy a syntetizuje mikronutrienty včetně vitaminů a mastných kyselin s krátkým řetězcem. Produkty fermentace těmito bakteriemi mohou poskytovat až 10 % denní energetické potřeby jedince [5,18].

Vztahy mezi hostitelem a bakteriemi jeho střevní mikroflóry hrají důležitou roli také v postnatálním vývoji, v dozrávání střeva a ve vývoji slizničního imunitního systému [13].

MIKROFLÓRA V JEDNOTLIVÝCH ČÁSTECH GIT

Fyziologická mikroflóra trávicího ústrojí je enormně komplexní ekosystém sestávající z mikroorganismů aerobních a anaerobních. Slouží spolu

ther with the mucosal immune system, it protects the host's organism from pathogen invasion and plays a positive role in certain metabolic processes [2].

In the oral cavity, anaerobes predominate over aerobes in a ratio of about 100:1. Saliva contains approximately 10^9 bacteria per mL, mainly streptococci, lactobacilli, neisseria, peptococci, peptostreptococci, bacteroides and fusobacteria. In patients with periodontal diseases, anaerobes are significantly more common. This is also true for people with poor oral hygiene. Together with saliva and food, oral microorganisms pass through the oesophagus to the stomach. In the oesophagus, analogical microflora multiplies, especially under pathological conditions, such as in the case of any oesophageal obstruction, both organic and functional. Other contributing factors are severe devastating conditions and immune insufficiency. In such cases, candida or viral infections are involved, e.g. in candida or viral oesophagitis.

Most microorganisms passing from the oral cavity to the stomach are

destroyed by acid gastric juices. Thus, the stomach of healthy individuals is usually sterile, with transient microflora being mostly gram-positive and aerobic. The concentration of microorganisms is usually less than 10^3 CFU/mL (CFU – Colony Forming Units). The most commonly isolated genera are enterococci, staphylococci, lactobacilli and yeasts. Less frequent are oral anaerobes, such as peptostreptococci, fusobacteria and bacteroides. Normally, coliform bacteria are very rare. Under pathological conditions, changes occur as bacterial overgrowth tends to be common in all conditions connected with hypoacidity or achlorhydria as well as with severely impaired stomach emptying. However, microorganisms may enter the stomach during duodenogastric reflux.

In the oral part of the small intestine, enterobacteria are sometimes present in a concentration of 10^{2-5} CFU/mL. In patients with bleeding ulcers, gastric hydrochloric acid is neutralised, which promotes the growth of microorganisms. In such cases, a mixture of aerobes and anaerobes is found. A si-

milar phenomenon could be observed in duodenal ulcers, pyloric obstruction or gastric carcinoma. Achlorhydria and bacterial overgrowth are also connected with drugs suppressing gastric acidity, e.g. H_2 blockers and proton pump inhibitors. The microbial flora of the oral part of the small intestine has a composition similar to that of the stomach and to a certain extent is influenced by pathological conditions of the stomach. The normal concentration of bacteria is 10^{3-4} CFU/mL. Microbes increase in number especially in intestinal stasis (intestinal obstruction, blind loop syndrome). In the jejunum, aerobic and gram-positive bacteria prevail. However, coliform and anaerobic bacteria are also present there, even more commonly than in the stomach. In the distal ileum, gram-negative microorganisms begin to predominate over gram-positive bacteria. Commonly found are coliform bacteria as well as anaerobic bacteroides, bifidobacteria, fusobacteria and clostridia. The similarity to the large intestinal microflora is due to microorganisms penetrating through the ileocaecal valve (backwash mechanism).

Table 1. Composition of the human gastrointestinal tract [27].

Microorganisms	Numbers of microorganisms (CFU/mL or CFU/g)			
	stomach	jejunum	ileum	colon
total bacterial count	$0-10^3$	$0-10^5$	10^3-10^9	$10^{10}-10^{12}$
aerobically growing agents				
family <i>Enterobacteriaceae</i>	$0-10^2$	$0-10^3$	10^2-10^7	10^4-10^{10}
streptococci	$0-10^3$	$0-10^4$	10^2-10^6	10^5-10^{10}
staphylococci	$0-10^2$	$0-10^3$	10^2-10^5	10^4-10^9
lactobacilli	$0-10^3$	$0-10^4$	10^2-10^3	10^6-10^{10}
yeasts	$0-10^3$	$0-10^2$	10^2-10^4	10^4-10^6
anaerobic bacteria				
bacteroides	rare	$0-10^3$	10^3-10^7	$10^{10}-10^{12}$
bifidobacteria	rare	$0-10^4$	10^3-10^9	10^4-10^{11}
peptostreptococci	rare	$0-10^3$	10^2-10^6	$10^{10}-10^{12}$
clostridia	rare	rare	10^2-10^4	10^6-10^{11}
eubacteria	rare	rare	rare	$10^{10}-10^{12}$

s imunitním slizničním systémem k ochraně organismu hostitele před invazí patogeny a příznivě se účastní některých metabolických pochodů [2].

V dutině ústní převládají anaeroby před aeroby v poměru asi 100 : 1. Sliny obsahují přibližně 10^9 bakterií na 1 ml. Dominují streptokoky, laktobacily, neisserie, peptokoky, peptostreptokoky, bakteroidy a fusobakteria. Nemocní s periodontopatiemi mají významně vyšší zastoupení anaerobů, podobně jako lidé nedodržující ústní hygienu. Mikroorganismy dutiny ústní se dostávají slinami a potravou jícnem do žaludku. V jícnu dochází k pomnožení analogické mikrobioty především za patologických stavů, každá obstrukce jícnu, ať organická, nebo funkční, vytváří vhodné podmínky. Dalším podpůrným mechanismem jsou těžké devastující stavy a imunologická insuficience. V těchto případech se uplatňují také infekce kvasinkové anebo virové, např. kandidová nebo virová ezofagitida.

Většina mikroorganismů, které se dostanou z dutiny ústní do žaludku, je destruována kyselou žaludeční šťá-

vou. Žaludek je tak u zdravých jedinců většinou sterilní, případná přechodná mikrobiota je převážně grampozitivní a aerobní. Koncentrace mikrobů je obvykle méně než 10^3 CFU/ml jednotky tvořící kolonie (CFU – Colony Forming Units). Nejčastěji izolovanými rody jsou enterokoky, stafylokoky, laktobacily a kvasinky. Anaeroby z dutiny ústní jsou přítomny v malém počtu (peptostreptokoky, fusobakteria, bakteroidy), koliformní mikroorganismy jsou fyziologicky vysloveně vzácné. Ke změně dochází především za patologických stavů, k mikrobiálnímu přerůstání mají sklon všechny stavy spojené s hypaciditou a achlorhydrií, ale též s hrubou poruchou evakuace žaludku. Mikroorganismy se však dostávají do žaludku i při duodenogastrickém refluxu.

V orální části tenkého střeva se občas vyskytují i enterobakterie v koncentraci 10^{2-5} CFU/ml. U nemocných s krvácejícím vředem dochází k neutralizaci kyselé žaludeční šťávy a vzniká vhodná živná půda pro růst mikroorganismů. Nalézána je potom směs aerobů a anaerobů. Podobně je tomu u duodenálního vředu, obstrukce

pyloru či karcinomu žaludku. Problém achlorhydrie a přerůstání mikroorganismů je také spojován se snižováním žaludeční acidity léky, např. H_2 blokátory a inhibitory protonové pumpy. Mikrobiální flóra orální části tenkého střeva má složení podobné jako žaludek a je také do jisté míry ovlivňována patologickými stavy žaludku. Normální koncentrace bakterií je 10^{3-4} CFU/ml. K nárůstu mikrobů dochází zejména při městnání střevního obsahu (střevní obstrukci, syndromu slepé kličky). V jejunumu převládají aeroby a grampozitivní bakterie, ale vyskytují se zde i koliformní bakterie a anaeroby, dokonce častěji než v žaludku. V distálním ileu začínají převládat gramnegativní mikroorganismy nad grampozitivními. Běžně se vyskytují koliformní bakterie, z anaerobů bakteroidy, bifidobakteria, fusobakteria, klostridia. Podobnost s mikrobiotou tlustého střeva je dána průnikem mikroorganismů přes ileocekální chlopu (tzv. back wash mechanism).

Distálně od ileocekální chlopu množství aerobních a anaerobních mikroorganismů narůstá. Asi jednu

Tab. 1. Složení mikrobioty lidského GIT [27].

Mikroorganismy	Počty mikroorganismů (CFU/ml nebo CFU/g)			
	žaludek	jejunum	ileum	kolon
celkový počet bakterií	0– 10^3	0– 10^5	10^3 – 10^9	10^{10} – 10^{12}
aerobně rostoucí agens				
čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	0– 10^2	0– 10^3	10^2 – 10^7	10^4 – 10^{10}
streptokoky	0– 10^3	0– 10^4	10^2 – 10^6	10^5 – 10^{10}
stafylokoky	0– 10^2	0– 10^3	10^2 – 10^5	10^4 – 10^9
laktobacily	0– 10^3	0– 10^4	10^2 – 10^3	10^6 – 10^{10}
kvasinky	0– 10^3	0– 10^2	10^2 – 10^4	10^4 – 10^6
anaerobní bakterie				
bakteroidy	vzácné	0– 10^3	10^3 – 10^7	10^{10} – 10^{12}
bifidobakteria	vzácné	0– 10^4	10^3 – 10^9	10^4 – 10^{11}
peptostreptokoky	vzácné	0– 10^3	10^2 – 10^6	10^{10} – 10^{12}
klostridia	vzácné	vzácné	10^2 – 10^4	10^6 – 10^{11}
eubakteria	vzácné	vzácné	vzácné	10^{10} – 10^{12}

The numbers of aerobic and anaerobic microorganisms increase with the distance from the ileocaecal valve. Live bacteria account for about one third of faecal dry matter. The prevailing aerobe is *Escherichia coli* which may be isolated in a concentration of 10^{7-8} CFU/g of stools. Anaerobes are dominated by *Bacteroides fragilis* and *Eubacterium* spp. Also frequent are anaerobic gram-positive cocci (*Peptostreptococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Clostridium* spp.). Additionally, aerobically growing enterococci and various members of the *Enterobacteriaceae* family are commonly isolated. In the colon, bacteria significantly increase in number orally from an obstruction of any origin. Microflora of the large intestine varies in different geographical areas, apparently influenced by dietary habits. According to studies, anaerobic gram-negative bacteria, in particular bacteroides, prevail in Western Europe and the USA, whereas gram-positive anaerobes, especially eubacteria, are more prevalent in India and Japan [2].

FAECAL PH

Normal faecal pH ranges from 6.1 to 7.9. The influencing factors are nutrition (dietary fibre content), fermentation processes, bacterial population and administration of antibiotics. Acidic stool (pH < 6.1) is usually connected with diarrhoea, osmotic laxatives, malabsorption or the action of bacterial toxins. Lower pH may also be due to food allergens. Very high pH (> 7.9) is usually found in excessive dietary intake of proteins and putrefactive processes when the contents of the large intestine moves more slowly [17].

FACTORS INFLUENCING COMPOSITION OF THE INTESTINAL MICROFLORA

The composition of the intestinal microflora is regulated by saliva (antibacterial activity of lysozyme, lactoferrin

and rhodanide), gastric acid (pH) and pepsin, bile containing bile salts and unconjugated bile acids, pancreatic juice (lipase) and intestinal motility. Also of importance is regeneration of intestinal mucosal cells. Microflora has its own regulatory mechanisms (colonisation resistance) that prevent penetration of unwanted organisms and substances and inhibit pathogenic microflora by bactericidal action of short-chain fatty acids and production of hydrogen peroxide or hydrogen sulphide. Besides these non-immunological defence mechanisms, there are cellular (intestinal lymphoid tissue, T and B lymphocytes) and humoral (secretory immunoglobulin A) immune defence mechanisms [23].

The intestinal system may be severely affected by diseases and their treatment. An example may be reduced salivary secretion in Sjögren's syndrome or long-course radiotherapy of the head and neck, decreased production of gastric acid in pernicious anaemia, after surgery (gastrectomy, vagotomy) or in treatment with H₂ blockers or proton pump inhibitors. Under such circumstances, coliform and potentially pathogenic bacteria grow in number and the risk of salmonella, shigella or candida infection increases. In biliary obstruction, bile duct infections are frequent. Bacterial overgrowth occurs in pancreatic insufficiency when bile and pancreatic juice secretion is impaired, in impaired motility of a part of the gastrointestinal tract, such as stasis in diverticula of the duodenum or small intestine, in strictures and stenoses of the ileum in intestinal inflammatory diseases, in diabetic gastroparesis, scleroderma or intestinal pseudo-obstruction. Alterations may also be caused by prokinetics or laxatives substantially reducing natural microflora in number, particularly anaerobes. Intestinal mucosal cells are generally killed by radiotherapy, chemotherapy and malnutrition as well. In some cases of immunodeficiency,

non-immunological mechanisms maintain balanced colonisation for a long time. However, these abnormalities may result in abnormal composition of the microflora and colonisation of the intestine by pathogenic microorganisms [23].

Another role in intestinal colonisation is played by ageing. With increasing age, less saliva is secreted, swallowing is less frequent and mucosal cell renewal is reduced. Therefore, colonisation by gram-negative bacteria such as enterobacteria and pseudomonas is more likely to occur. In addition to that, intestinal bifidobacteria decrease in number and coliform bacteria, clostridia and candida become predominant. However, these changes may be secondary to impaired motility and more frequent atrophic gastritis in old age. The same is true for decreased immunological tolerance and slower cell regeneration [23].

The external factors influencing the composition of intestinal microflora include nutrition, treatment, environment and stress. Changes in dietary habits and drugs, such as laxatives (magnesium sulphate promoting peristaltic movement of the intestine) and antibiotics, directly affecting intestinal microflora. Antibiotic therapy may lead to diarrhoea varying in severity or even pseudomembranous colitis, caused by *Clostridium difficile* toxins. These serious complications occur in cases of insufficient resorption of antibiotics as well as in decreased secretion of saliva, bile and intestinal mucus. Resistance, bacterial overgrowth, sepsis, diarrhoea, infection or superinfection may develop.

Intestinal microflora is also affected by stress. This was proved by studies of both animals exposed to low temperatures or prolonged starvation and humans staying in space or experiencing physical strain. In stress, a reduced number of lactobacilli in the proximal portion of the digestive tract

třetinu fekální sušiny tvoří živé bakterie. *Escherichia coli* převládá mezi aeroby a může být izolována v koncentraci 10^{7-8} CFU/g stolice. Mezi anaeroby dominuje *Bacteroides fragilis* a *Eubacterium* sp., časté jsou i anaerobní grampozitivní koky (*Peptostreptococcus* sp., *Peptococcus* sp.), *Clostridium* sp. Dále jsou běžně izolovány aerobně rostoucí enterokoky a různé druhy čeledi *Enterobacteriaceae*. K výraznému narůstání bakterií v kolon potom dochází orálně od obstrukce jakéhokoli původu. Mikroflóra tlustého střeva je velmi rozdílná v různých geografických oblastech, je evidentně ovlivňována stravovacími zvyklostmi. Podle studií převažují v západní Evropě a Spojených státech anaerobní gramnegativní bakterie, zejména bakteroidy, v Indii a v Japonsku jsou to grampozitivní anaeroby, zejména eubakteria [2].

pH STOLICE

Fyziologicky se pH stolice pohybuje v rozmezí 6,1–7,9. Ovlivňujícími faktory jsou výživa (obsah vlákniny v potravě), fermentativní procesy, bakteriální populace, aplikace antibiotik. Kyselost stolice (pH < 6,1) bývá obvykle spojována s průjmem, použitím osmoticky působících laxativ, malabsorpcí nebo s působením bakteriálních toxinů, také alergeny v potravě pH snižují. Příliš vysoké pH (> 7,9) bývá zjišťováno při nadměrném příjmu bílkovin v potravě a hnilobných procesech, při kterých bývá zpomalen průchod obsahu tlustým střevem [17].

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ SLOŽENÍ STŘEVNÍ MIKROFLÓRY

Složení střevní mikroflóry je regulováno již slinami (antibakteriálně působícím lyzozymem, laktoferinem, rhodanidem), žaludeční kyselinou (pH) a pepsinem, žlučí s obsahem žlučových solí a nekonjugovaných žlučových kyselin, pankreatickou

šťávou (lipázou) a také střevní motilitou. Důležitou roli hraje rovněž regenerace buněk střevní sliznice. I mikroflóra má vlastní regulační schopnosti (tzv. kolonizační rezistence), brání průniku nežádoucích organismů a látek, inhibuje patogenní mikroflóru baktericidním působením mastných kyselin s krátkým řetězcem a produkcí peroxidu vodíku nebo sirovodíku. Vedle těchto neimunologických obranných nástrojů existuje buněčný (lymfoidní tkáň střeva, T a B lymfocyty) a humorální (sekreční imunoglobulin A) imunitní obranný mechanismus [23].

Nemoc a s ní spojená léčba může střevní ekosystém vážně ovlivnit. Příkladem může být redukce slinné sekrece u Sjögrenova syndromu nebo při dlouhodobé radioterapii hlavy a krku, dále snížená produkce žaludeční kyseliny chlorovodíkové u perniciózní anémie, po chirurgických výkonech (gastrektomii, vagotomii) nebo při léčbě H_2 blokátory či inhibitory protonové pumpy. Za těchto okolností dochází často k nárůstu koliformních a potenciálně patogenních mikrobů, ke zvýšenému riziku salmonelové, shigellové či kandidové infekce. V případech biliární obstrukce jsou časté infekce žlučových cest. K bakteriálnímu přerůstání dochází u pankreatické insuficience, při poškození sekrece žluči a pankreatické šťávy, také v případech porušené motility části gastrointestinálního traktu, jako je např. stáza v objemných divertiklech duodena či tenkého střeva, při strikturách a stenózách ilea v rámci střevních zánětlivých chorob, u diabetické gastroparézy, sklerodermie či střevní pseudoobstrukce. Změny mohou působit také prokinetika či laxativa, neboť výrazně sníží přirozenou mikroflóru, zejména anaeroby. Také radioterapie, chemoterapie a malnutriční stavy obecně ničí buňky střevní sliznice. U imunodeficitních stavů v některých případech neimunologické mechanismy

udrží rovnováhu v osídlení dlouhou dobu, avšak tyto abnormality mohou vést k významné dysmikrobii a kolonizaci střeva patogenními mikroorganizmy [23].

Také stárnutí hraje ve střevním osídlení svoji roli. Věkem dochází k poklesu sekrece slin, polykání je méně častější a je snížena obnova slizničních buněk. Tak dochází snadněji ke kolonizaci gramnegativními bakteriemi, jako jsou enterobakterie a pseudomonády. Věkem rovněž klesá počet střevních bifidobakterií a predominantními se stávají koliformní bakterie, klostridia a kandidy. Tyto změny však mohou být sekundární při zhoršené motilitě a častější atrofické gastritidě ve stáří, stejně tak jako snížená imunologická tolerance a zpomalená buněčná regenerace [23].

Zevní faktory, které ovlivňují složení střevní mikroflóry, zahrnují výživu, léčbu, zevní prostředí a stres. Změny ve stravování a léky, jako např. laxativa (magnesium sulfuricum zvyšující střevní peristaltiku) a antibiotika, přímo ovlivňují střevní mikroflóru. Léčba antibiotiky může vést ke vzniku různě těžkého průjmu až pseudomembranózní kolitidy, často způsobené toxiny *Clostridium difficile*. K těmto závažným komplikacím dochází v případech nedostatečné resorpce antibiotika a také při nižší sekreci slin, žluči a hlenu střevní sliznice. Může vzniknout rezistence, bakteriální přerůstání, sepse, průjem, infekce či superinfekce.

Střevní mikroflóru ovlivňuje i stres. Toto bylo prokázáno v experimentu na zvířatech, která byla vystavena nízkým teplotám nebo delšímu hladovění, také však u lidí při pobytu ve vesmíru nebo velké fyzické zátěži. Při stresu byl popsán pokles laktobacilů v proximální části trávicího traktu a vzestup koliformních bakterií v jeho distálních částech.

Střevní mikroflóra je ovlivňována rovněž nemocemi a jejich léčbou, nedostatečnou výživou, ale i emočním

and a higher number of coliform bacteria in its distal parts have been described.

Finally, intestinal microflora is influenced by diseases and their treatment, inadequate nutrition as well as emotional stress, such as fear, anger and depression in illness.

FUNCTIONS OF NORMAL MICROFLORA

Intestinal microflora must be capable of providing many functions:

- maintaining a microbial barrier against obligate and potential pathogens
- affecting motility and perfusion of the intestinal wall
- stimulating the intestinal immune system and thus the so-called common mucosal immune system
- reducing bacterial translocation
- producing vitamins

The gradual transition from aerobes dominating the upper intestine to anaerobes predominant in the distal portions represents the basic functional and structural changes. In the entire microsystem, aerobes are responsible for the so-called scavenging effect. This means that they, in particular *Escherichia coli*, consume oxygen in oxidative phosphorylation reactions in energy metabolism. Distally, the redox potential decreases, facilitating the growth of anaerobes, otherwise sensitive to the presence of oxygen due to their enzyme make-up (catalase, cytochrome oxidase, superoxide dismutase) insufficient to eliminate superoxide and other oxygen radicals. Thus, the existence of the two groups of microbes is mutually determined as any damage to aerobes apparently leads to subsequent harm to the anaerobic population [4,15]. Impairment of the microsystem of the original intestinal microflora is common in patients with chronic liver disease. Significantly increased numbers of live aerobic

gram-positive and gram-negative bacterial species are repeatedly found in cirrhotic patients' faeces [3].

COLONISATION RESISTANCE

The microbial barrier made of beneficial commensal bacteria in the intestine, preventing pathogens from overgrowing, is referred to as colonisation resistance of the gastrointestinal tract. It acts against both obligate (salmonella, shigella, yersinia, campylobacter, vibrio and other species) and potential pathogens (clostridia, candidae etc.) [22].

Thus, normal intestinal microflora is capable of preventing pathogens from colonisation and proliferation. It also controls the opportunistic microflora (enterobacteria, pseudomonas, staphylococci, streptococci etc.).

According to van der Waaij, colonisation resistance is based on the following mechanisms [21]:

- occupying potential binding sites of the intestinal lining – the so-called receptor blockade
- growth inhibition and/or killing of foreign microorganisms
- competition for substances, vitamins and growth factors
- lowering intestinal pH
- direct antagonism of normal microflora against the obligate and potentially pathogenic microflora

In animal studies, colonisation of the intestinal epithelium by commensal bacterial strains resulted in expression of a large number of genes that promote intestinal epithelial cells maturation and strengthening of the mucosal barrier [6]. Besides regulating local gene expression in the intestinal epithelium, commensal bacteria may even control gene expression affecting the host's characteristics, such as fat deposition [1] and the related effect of aberrant microflora on obesity development and longevity [11].

THE INTESTINE AND THE IMMUNE SYSTEM

The commensal intestinal microflora present activates anti-inflammatory intestinal systems protecting the intestinal epithelium from inflammation as a reaction to invading pathogens [8]. Moreover, intestinal commensals have a huge regulatory effect on immune responses even outside the intestinal tract [16]. The human organism has mechanical, chemical and immunological barriers that, at the point of contact, protect its internal environment from uncontrolled penetration of antigenic and mitogenic stimuli. The main barriers and contact places involve mucosal surfaces of the digestive, respiratory and genitourinary tracts. The intestinal mucosal immune system provides a barrier against pathogenic microorganisms and immunogens from the diet. The basic features of the mucosal immune system are prevailing IgA antibodies, preferential colonisation of both mucosal and excretory glands by cells originating from intestinal lymph follicles and, finally, polymeric immunoglobulins transported to the secretion through epithelial cells.

The gut-associated lymphoid tissue (GALT) is a system that processes information from about 100–200 tons of food per lifetime and is permanently colonised by normal and, intermittently, non-physiological microflora. The GALT develops mainly in the early postnatal period and is made up of organised lymphoid tissue, free intraepithelial lymphocytes and lamina propria lymphocytes.

The organised lymphoid tissue is covered by an epithelial layer containing special microfold cells (M cells) which lack the brush border and are in close contact with lymph follicle cells. The M cells vigorously ingest antigens which probably translocate into the follicular environment and induce mucosal immune reaction. However, as the M cells do not have the fea-

stresem, jako je strach, zloba a deprese při nemoci.

FUNKCE FYZIOLOGICKÉ MIKROFLÓRY

Střevní mikroflóra musí být schopna zajistit mnoho funkcí:

- udržovat mikrobiální bariéru proti obligátním a potenciálním patogenům
- ovlivňovat motilitu a prokrvení střevní stěny
- stimulovat imunitní střevní systém, a tím i tzv. společný slizniční imunitní systém
- redukovat bakteriální translokaci
- produkovat vitaminy

Postupný přechod dominance aerobů v horních částech střeva k převaze anaerobů v distálních partiích představuje základní funkčně strukturální změnu. Aeroby totiž pro celý mikroekosystém zajišťují tzv. scavenger effect tím, že s dominancí *Escherichia coli* spotřebovávají kyslík v reakcích oxidativní fosforylace při energetickém metabolismu. Tím klesá distálním směrem redoxní potenciál umožňující růst anaerobům, které jsou jinak citlivé na přítomnost kyslíku, protože nejsou dostatečně vybaveny enzymy (katalázou, cytochromoxidázou, superoxidodismutázou) k eliminaci superoxidu a dalších kyslíkových radikálů. Takto je zajištěna vzájemná podmíněnost existence obou skupin mikrobů, neboť je zřejmé, že poškození aerobů vede následně k postižení anaerobní populace [4,15]. Narušení mikroekosystému původní střevní mikroflóry jsou běžné u pacientů s chronickým jaterním onemocněním. Signifikantní zvýšení obsahu živých aerobních grampozitivních a gramnegativních bakteriálních druhů jsou opakovaně zjišťovány ze stolice cirhotických pacientů [3].

KOLONIZAČNÍ REZISTENCE

Mikrobiální bariéra z prospěšných komensálních bakterií ve střevě,

zabraňující přerůstání patogenů, bývá označována jako kolonizační rezistence gastrointestinálního traktu. Je namířena proti obligátním (salmonelám, shigellám, yersiniím, kampylobakterům, vibriím a dalším) i potenciálním patogenům (klostridiím, kandidám atd.) [22].

Jedná se tedy o schopnost fyziologické střevní mikroflóry zabránit uchycení a proliferaci patogenů. Součástí je také kontrola oportunní mikroflóry (enterobakterií, pseudomonád, stafylokoků, streptokoků atd.).

Kolonizační rezistenci definoval van der Waaij jako zajišťovanou následujícími mechanismy [21]:

- obsazení potenciálních vazebných míst střevní výstelky – tzv. receptorová blokáce
- inhibice růstu a/nebo usmrcení cizích mikroorganismů
- konkurence v získávání látek, vitaminů a růstových faktorů
- snížení střevního pH
- přímý antagonismus fyziologické mikroflóry vůči mikroflóře obligátně a potenciálně patogenní

Kolonizace sterilního střevního epitele pokusných zvířat komensálními bakteriálními kmeny vedla k expresi širokého množství genů, které umožňují dozrávání střevních epitelálních buněk a posílení slizniční bariéry [6]. Kromě lokální genové exprese ve střevním epitelu, komensální bakterie mohou dokonce regulovat i genovou expresi ovlivňující charakteristiku hostitele, jako např. ukládání tuků [1] a s tím související vliv aberantní mikroflóry na vznik obezity a dlouhověkost [11].

STŘEVO A IMUNITNÍ SYSTÉM

Přítomnost komensální střevní mikroflóry aktivuje protizánětlivé střevní systémy, které ochraňují střevní epitel proti zánětům reagujícím na invadující patogeny [8]. Kromě toho střevní komensálové mají velký regulační vliv

na imunitní odpovědi i mimo střevní trakt [16]. Lidský organizmus je vybaven mechanickými, chemickými a imunologickými bariérami, které v místech kontaktu brání nekontrolovatelnému průniku antigenních a mitogenních podnětů do vnitřního prostředí organismu. K hlavním bariérám a kontaktním místům patří slizniční povrchy trávicího, dýchacího a urogenitálního traktu. Imunitní systém střevní sliznice zajišťuje bariéru proti patogením mikroorganismům a imunogenům z potravy. K základním rysům slizničního imunitního systému patří převaha protilátek třídy IgA, přednostní osídlování sliznic i exkrečních žláz buňkami, které pocházejí ze střevních lymfatických foliklů a konečně transport polymerních imunoglobulinů do sekretu prostřednictvím epitelových buněk.

Lymfoidní tkáň střeva (GALT – Gut Associated Lymphoid Tissue) je systém, který během života zpracuje informace asi ze 100–200 tun stravy a je permanentně osídlen fyziologickou a intermitentně i nefyziologickou mikroflórou. Vývoj GALT probíhá hlavně v časném postnatálním období a tvoří ji organizovaná lymfoidní tkáň, volné intraepitelové lymfocyty a lymfocyty lamina propria.

Organizovaná lymfoidní tkáň je kryta epitelovou vrstvou, která však obsahuje zvláštní, tzv. M buňky (microfold cells), jimž chybí kartáčový lem a které naopak jsou v úzkém kontaktu s buňkami lymfatických foliklů. M buňky mohutně pohlcují antigeny, které patrně translokují do prostředí foliklů, čímž indukují slizniční imunitní reakci. Přitom však M buňky nejsou vybaveny znaky hlavního histokompatibilního systému II. třídy, tedy informace pouze přenášejí bez dalšího imunologického zpracování.

Volné intraepitelové lymfocyty (IEL) jsou vymezeny mezi epitelii klků, většinou se jedná o T lymfocyty, převážně CD4 (T helper) nebo CD8 (T supressor), vzácně CD5, které patří

tures of the major histocompatibility complex class II, they only transmit information without their further immunological processing.

The free intraepithelial lymphocytes (IELs) are intercalated between villous epithelial cells. These are mostly T lymphocytes, predominantly CD4 (T helper) or CD8 (T suppressor), rarely CD5 belonging to B lymphocytes as well. The IELs both produce cytokines (lymphokines) playing a role in antimicrobial protection of mucosa and are able to react with antigens and inhibit reactions to food antigens, thus preventing inadequate reactions, for example in the form of food allergy.

Lymphocytes at lamina propria are predominantly CD4 lymphocytes, mainly of the Th1 subset. Less common are B lymphocytes, leading to production of IgA, less frequently IgM and rarely IgG [7,15,25].

Immune reaction in the GIT mucosa produces not only local but also general immune response in other mucosae or distant organs, the so-called common mucosal immune system. Following their contact with allergens, cells, especially those in the intestinal mucosa, migrate to regional lymph tissue (Peyer's patches, lymph nodes), via the lymphatic system to the bloodstream and from there to all mucosae and endocrine glands (the so-called homing). Thus, some of the recirculating cells return either to the original sites or to those reacting by mucosal inflammation. This process is

physiological, taking place as lymphocytes move from the circulation to tissues only following an activation signal from cytokines. Back into the intestinal wall, mainly activated T lymphocytes and small memory T lymphocytes return. Using specific binding sites for adhesins of organised lymphocytes and mucosal epithelial cells, an activation cascade of certain lymphocytes and the relevant immune response may be triggered. Immunoregulatory processes are significantly modulated by the response of CD4 lymphocyte subset, leading to production of various cytokines [26].

Thus, the normal intestinal microflora trains the immune system of the gastrointestinal tract which acts as a barrier against foreign invaders but also leads to enhanced specific and non-specific immune responses. This is done by activation of the phagocytic ability of macrophages, stimulation of IgA-producing plasma cells of the lamina propria mucosae and increasing the production of interleukin-6.

Dendritic cells contained in the intestinal wall play an important role in monitoring the intestinal contents. Their long processes reach the intestinal lumen, passing between tightly connected epithelial cells without breaking the mucosal barrier. Therefore, commensal bacteria are constantly monitored, giving an impulse for induction of regulatory T cells [9]. These T lymphocytes are necessary for induction of oral tolerance

against harmless dietary components and they counteract the severe responses from Th1 and Th2 cells connected with inflammatory or autoimmune and allergic diseases, respectively [14]. Commensal microflora is also thought to control antibody production by peripheral B lymphocytes, thus contributing to protection of the host against unwanted pathogens [10]. The risk of bacterial infection increases in immunocompromised individuals, including patients with liver cirrhosis, due to, among others, alterations in their normal digestive microflora.

Postnatal colonisation of the intestine by the microbial flora is crucial for developing oral tolerance. However, this postnatal process is completely random and it is known that in the early stages of the neonatal immune system development, the response to environmental antigens is shifted in favour of the Th2 cytokine profile that is typical for allergic diseases. Insufficient postnatal exposition of the intestine to microflora, necessary for balanced maturation of the immune system to a non-atopic state, is considered the likely cause of a significant increase in atopic disease in developed countries. The condition might be treated by controlled early postnatal exposition to probiotic strains [4,20].

Financially supported by the Czech Ministry of Education research grant MSM 6198959223 and IGA NR 9116-3

i k B lymfocytům. IEL jednak produkují cytokiny (lymfokiny) hrající roli v anti-mikrobiální ochraně sliznic, jednak jsou schopny reagovat s antigeny a řízeně tlumit reakce na antigenní složky potravy, brání tak vzniku neúměrné reakce, např. v podobě potravinové alergie.

Lymfocyty lamina propria představují převážně CD4 lymfocyty, zejména ze subpopulace Th1. Méně často jsou přítomny B lymfocyty, vedoucí k produkci IgA, vzácněji IgM a nejméně IgG [7,15,25].

Imunitní reakce na sliznici GIT nevedou pouze k lokální, ale také celkové odpovědi i na jiných sliznicích či vzdálených orgánech, jde o tzv. společný slizniční imunitní systém. Buňky, především ve střevní sliznici, po kontaktu s antigeny migrují do regionální mízní tkáně (Peyerovy pláty, lymfatické uzliny), lymfatickou cestou pak do krevního řečiště a odtud do všech sliznic a endokrinních žláz (tzv. homing). Některé z recirkulujících buněk se tedy vrací zpět i na původní místa nebo na místa reagující zánětem na sliznicích. Tento děj je fyziologický a proběhne přestupem lymfocytu z cirkulace do tkáně pouze na základě aktivačního signálu prostřednictvím cytokinů. Zpět do stěny střeva se dostávají především aktivované T lymfocyty a malé paměťové T lymfocyty. Pomocí specifických vazebných

míst pro adheziny organizovaných lymfocytů a epitelii sliznic se pak může realizovat kaskáda aktivace určitých lymfocytů, a tedy příslušná imunitní odpověď. Imunoregulační pochody jsou významně modulovány odpovědí CD4 lymfocytárních subpopulací, která vede k produkci různých cytokinů [26].

Fyziologická střevní mikrobióta tak provádí tzv. trénink imunitního systému gastrointestinálního traktu, který tvoří jednak bariéru proti invazi cizích zárodků a jednak vede ke zvýšení specifické i nespecifické imunitní odpovědi. Děje se tak aktivací fagocytární schopnosti makrofágů, stimulací IgA produkujících plazmocytů lamina propria mucosae a zvýšením produkce interleukinu 6.

Dendritické buňky obsažené ve stěně střevní hrají důležitou roli v monitorování střevního obsahu. Jejich dlouhé výběžky zasahují do střevního lumen, probíhají mezi pevně spojenými epiteliálními buňkami, aniž by došlo k porušení slizniční bariéry. Tímto způsobem jsou komensální bakterie neustále monitorovány a dávají podnět k indukci regulujících T buněk [9]. Tyto T lymfocyty jsou nezbytné pro indukci ústní tolerance proti neškodným komponentům stravy a vyrovnávají prudké odpovědi buněk Th1 a Th2, které jsou spojovány se zánětlivými nebo autoimunitními,

resp. alergickými chorobami [14]. Také se předpokládá, že komensální mikrobióta ovlivňuje i tvorbu protilátek periferními B lymfocyty, a tak může pomáhat při ochraně hostitele proti nezvaným patogenům [10]. Riziko bakteriální infekce stoupá u imunokompromitovaných osob, a tedy i u nemocných s jaterní cirhózou, mimo jiné právě v souvislosti s alterací jejich fyziologické trávicí mikrobióty.

Kolonizace střeva mikrobiální flórou po narození má kritický význam pro vytvoření orální tolerance. Tento proces se však realizuje po narození zcela nahodilým způsobem a je známo, že v časných stádiích vývoje imunitního systému u novorozence je odpověď na antigeny prostředí vychýlena ve prospěch Th2 cytokinového profilu, který je typický pro alergická onemocnění. Nedostatečná postnatální expozice střeva mikrobióte, nutná pro vyvážené vyvrátní imunitního systému do neatopického stavu, se považuje za pravděpodobnou příčinu výrazného zvýšení atopických onemocnění ve vyspělých zemích. K úpravě tohoto stavu přichází v úvahu řízená časná postnatální expozice probiotickým kmenům [4,20].

Finanční podpora výzkumným záměrem MŠMT MSM 6198959223 a grantem Interní grantové agentury MZ ČR č. NR 9116-3

References/Literatura

1. Bäckhed F, Ding H, Wang T et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(44): 15718–15723.
2. Fixa B, Komárková O. Mikroflóra trávicího ústrojí za fyziologických a některých patologických podmínek. In: Mařatka Z (ed). *Aktuality v gastroenterologii*. Praha: AZ Servis 1994: 57–82.
3. Floch MH, Katz J, Conn HO. Qualitative and quantitative relationships of the fecal flora in cirrhotic patients with portal systemic encephalopathy and following portocaval anastomosis. *Gastroenterology* 1970; 59(1): 70–75.
4. Frič P. Probiotika a prebiotika – renesance terapeutického principu. *Postgraduální medicína* 2005; 7(5): 472–477.
5. Gibson GR, Rastall RA. When we eat, which bacteria should we be feeding? *ASM News* 2004; 70: 224–231.
6. Hooper LV, Wong MH, Thelin A et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291(5505): 881–884.
7. James SP. Gastrointestinal lamina propria T-cells. *Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press 1999.
8. Kelly D, Campbell JI, King TP et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004; 5(1): 104–112.
9. Kelly D, Conway S, Aminov R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol* 2005; 26(6): 326–333.
10. Lanning D, Rhee KJ, Knight K. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol* 2005; 26(8): 419–425.
11. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(31): 11070–11075.
12. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(5): 1035S–1045S.
13. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(6): 478–485.
14. Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(6): 407–419.
15. McGhee JR, Lamm ME, Strober W. Mucosal immune responses: an overview. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press 1999.
16. Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* 2004; 12(12): 562–568.
17. Oufir LE, Barry JL, Flourié B et al. Relationships between transit time in man in vitro fermentation of dietary fiber by fecal bacteria. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54(8): 603–609.
18. Saavedra JM, Tschernia A. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *Br J Nutr* 2002; 87 (Suppl 2): S241–S246.
19. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31: 107–133.
20. Timmerman HM. Multispecies probiotics: composition and functionality. PhD Thesis, Utrecht: Universiteit Utrecht 2005.
21. Van der Waaij D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol* 1989; 43: 69–87.
22. Van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk-van der Wees. Colonization resistance of the digestive tract and the spread of bacteria to the lymphatic organs in mice. *J Hyg (Lond)* 1972; 70(2): 335–342.
23. Verhoef-Verhage LA et al. A guide to the intestinal microflora. Inside story. Utrecht 1996: 11–46.
24. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 1983; 72(3): 317–321.
25. Zbořil V. Zánětlivá onemocnění střevní stěny. *Sanguis* 2000; 6(6): 22–27.
26. Zbořil V. Mikroflóra trávicího traktu – klinické souvislosti. Praha: Grada Publishing 2005.
27. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal microflora. *Med Clin North Am* 1982; 66(3): 557–574.

Correspondence to/

Adresa pro korespondenci:

Jana Juránková, MD

Department of Clinical Microbiology

University Hospital Brno

Jihlavská 20

625 00 Brno

Czech Republic

e-mail: jjurankova@fnbrno.cz