

Mirosława Gałęcka  
Patrycja Szachta

## KYBERKOMPACT – ZNACZENIE NOWOCZESNEJ DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ PRZEWODU POKARMOWEGO

### KYBERKOMPACT – THE IMPORTANCE OF MODERN MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTIC OF GASTROINTESTINAL TRACT

#### Streszczenie

Pod pojęciem badania KyberKompakt kryje się jakościowa i ilościowa ocena wybranych bakterii niepatogennych i grzybów w przewodzie pokarmowym. W analizie nie są oceniane drobnoustroje chorobotwórcze, a jedynie bakterie fizjologicznie bytujące w ludzkim przewodzie pokarmowym. Drobnoustroje oceniane są w ramach jednej z trzech grup – bakterii ochronnych, immunostymulujących lub proteolitycznych – wyodrębnionych ze względu na posiadane właściwości i cechy biochemiczne. Liczebność mikroorganizmów w kale pacjenta odnoszona jest do ogólnie przyjętych norm. Badanie KyberKompakt umożliwia częściową ocenę ekosystemu jelitowego pacjenta i pośrednie wnioskowanie o równowadze mikrobioty.

#### Summary

KyberKompakt diagnostic allow to qualitative and quantitative assessment of selected bacteria and fungi in the gastrointestinal tract. Pathogenic microorganisms are not evaluated in the analysis, only bacteria physiologically dwelling in the human gastrointestinal tract. Analyzed organisms are evaluated in one of three groups: protection, immunostimulatory or proteolytic microflora, separated by virtue of its properties and biochemical characteristics. The number of microorganisms in the patient's feces is referred to the generally accepted standards. KyberKompakt provides a partial assessment of the patient's intestinal ecosystem and indirect inference about the microbiota balance.

#### Słowa kluczowe/Key words

KyberKompakt ▶ KyberStatus ▶ KyberMyk ▶ posiew mikrobiologiczny ▶ bakterie jelitowe  
KyberKompact ▶ Kyberstatus ▶ Kybermyk ▶ microbiological culture ▶ intestinal bacteria

Charakteryzowane w niniejszej pracy badanie KyberKompakt to ilościowa i jakościowa analiza wybranych rodzajów bakterii bytujących fizjologicznie w przewodzie pokarmowym człowieka, na podstawie badania próby kału. W ramach analizy nie testuje się bakterii chorobotwórczych, a jedynie drobnoustroje autochtoniczne, pełniące różnorakie funkcje w ludzkim ustroju, zarówno pozytywne jak i potencjalnie szkodliwe [1]. Ocenia się następujące drobnoustroje wskaźnikowe:

- ▶ Beztlenowce z rodzaju *Bacteroides* i *Bifidobacterium*
- ▶ Bakterie z rodzaju *Enterococcus* i pałeczki z gatunku *E. coli*.
- ▶ Potencjalnie patologiczną formę *E. coli* tzw. postać *biovare*
- ▶ beztlenowe laseczki z rodzaju *Clostridium*
- ▶ pałeczki kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*, w tym produkujące nad-tlenek wodoru
- ▶ wstępne różnicowanie innych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp.,

*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp.) oraz z rodzaju *Pseudomonas*.

#### ▶ Całkowitą liczbą bakterii

W stanie zachowanej homeostazy ekosystemu jelitowego, bakterie korzystne stanowią dominującą jego część i utrzymana jest przewaga procesów korzystnych dla funkcjonowania ludzkiego organizmu. Zaburzenie owej równowagi i nadmierne namnożenie drobnoustrojów potencjalnie patogennych może prowadzić do zaburzenia funkcjonowania przewodu pokarmowego i całego organizmu, między innymi na drodze syntezy substancji genotoksycznych, karcinogennych czy mutagennych [2]. Wykonanie analizy KyberKompakt umożliwia pośrednie wnioskowanie o stanie mikrobioty jelitowej, a w stanie dysbiozy wdrożenie odpowiedniej terapii probiotykami bądź prebiotykami [3].

Z uwagi na specyfikę badania KyberKompakt, celowym będzie – tytułem wstępu – krótkie zaprezentowanie funkcji i składu ekosystemu jelitowego, którego poszczegól-

dr n. med.  
**Mirosława Gałęcka**  
dr n. biol. **Patrycja Szachta**  
Instytut Mikrobiologii  
w Poznaniu  
Adres do korespondencji:  
Mirosława Gałęcka

ne komponenty składowe oceniane są w prezentowanej metodzie.

### Rola ekosystemu jelitowego

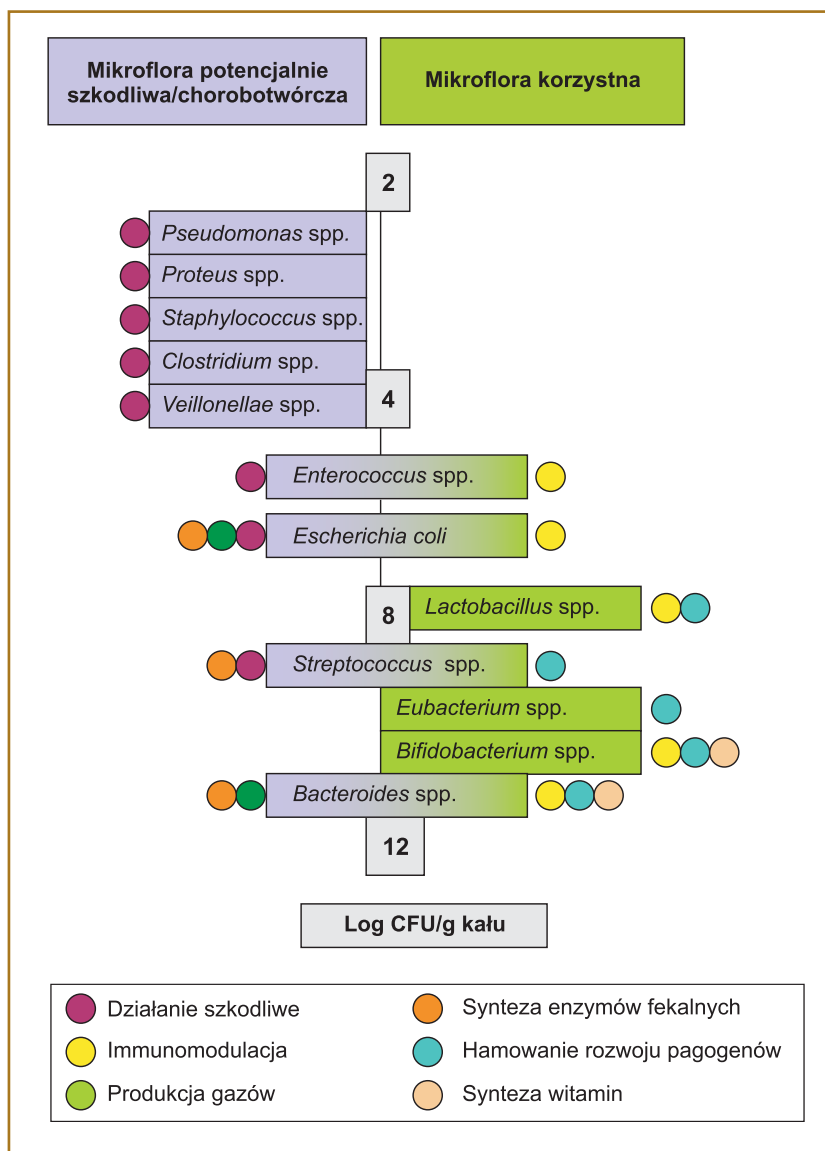
Przewód pokarmowy człowieka, szczególnie jelito grube, jest miejscem bytowania olbrzymiej ilości mikroorganizmów, reprezentujących różne gatunki i rodzaje. O niezwykle znaczeniu i zróżnicowaniu owych bakterii endogennych świadczą choćby opisujące je liczby. W samym tylko jelicie grubym, będącym optymalną niszą dla rozwoju większości bakterii autochtonicznych (własnych) gospodarza występuje nawet do 500 gatunków bakterii, w przybliżonym stężeniu  $10^{14}$  bakterii/g kału. To wielkie bogactwo mikrobiontów stanowi nawet do 50% treści jelita grubego. Biomasa zasiedlający przewód pokarmowy ma masę około 1,5 kg, i może zawierać nawet 100 razy większą liczbę genów, aniżeli genom człowieka, będącego swoistym „gospodarzem” [4]. Tak istotna „obfitość” ewolucyjna wynika z mnogości funkcji pełnionych przez bakterie jelitowe. Celowym jest więc omówienie poszczególnych etapów rozwoju systemu bakterierynego w jelicie, jego znaczenia dla zdrowia oraz nowoczesnych metod oceny dysbiozy bakterieryjnej w jelicie.

Pierwszy kontakt człowieka ze światem mikroorganizmów ma miejsce w trakcie porodu, jako że płód jest jałowy. Noworodek nabywa więc określone rodzaje drobnoustrojów zależnie od typu porodu. W optymalnych warunkach porodu naturalnego są to drobnoustroje fizjologicznie kolonizujące drogi rodne matki. W przypadku dzieci rodzonych cesarskim cięciem, pożądany kontakt z bakteriami pochwowymi zostaje niestety pominięty, a pierwszymi drobnoustrojami kolonizującymi organizm dziecka są bakterie pochodzenia szpitalnego, przenoszone z rąk personelu medycznego, inkubatora etc. Pierwsze bakterie, które zasiedlą jałowy przewód pokarmowy noworodka mają istotny wpływ na późniejszy przebieg kolonizacji bakterieryjnej. Gdy dziecko jest rodzone siłami natury, a następnie karmione piersią skład ekosystemu jelitowego jest optymalny. W konsekwencji mikrobiota z powodzeniem realizuje szereg funkcji i procesów warunkujących zachowanie zdrowia i prawidłowy rozwój dziecka. Istnieje związek pomiędzy zaburzeniem jakościowym i ilościowym ekosystemu jelitowego, a rozwojem i podtrzymaniem takich chorób, jak: alergie i choroby atopowe,

zmniejszenie odporności, nieswoiste zapalenie jelit i szereg innych dolegliwości [5]. Szacuje się, iż wzrost liczby cesarskich cięć, rezygnacja z naturalnego karmienia jak również nadużywanie antybiotyków, (czyli czynniki silnie ingerujące w skład mikrobioty jelitowej), mają związek ze wzrostem występowania chorób cywilizacyjnych, takich jak: alergia, astma, nowotwory, otyłość itd. W opublikowanym w 2013 roku badaniu, autorstwa Azad MB wsp. wykazano istotne zaburzenia w ekosystemie jelitowym dzieci rodzonych cesarskim cięciem i karmionych mieszankami mlekozastępczymi, w porównaniu z ich rówieśnikami karmionymi i rodzonymi naturalnie. Skład bakterii jelitowych u dzieci rodzonych cesarskim cięciem różnił się znacznie od tych, które były rodzone siłami natury. Należy zaznaczyć, iż zaburzenia bakterieryjne były silniejsze u dzieci karmionych mieszankami mlekozastępczymi. Jak zaznaczają autorzy badania, zaburzenia w obrębie mikrobioty są czynnikiem wywierającym długofalowy wpływ na późniejszy stan zdrowia. Dzieci rodzone drogą cesarskiego cięcia są bowiem bardziej narażone na wystąpienie astmy, cukrzycy typu 1 czy otyłości [6]. Korzystny wpływ na ekosystem jelitowy ma z pewnością karmienie dziecka piersią, gdyż dochodzi do kolonizacji przewodu pokarmowego oseska przez pożądane bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. Co więcej, zawartość naturalnych substancji prebiotycznych w mleku matki (tzw. czynnik bifidogenny) stymuluje wzrost prozdrowotnych bakterii kwasu mlekowego w jelicie [6]. Układ bakterii jelitowych kształtuje się stopniowo, z wdrażaniem pokarmów stałych i dalszą zmianą diety. Szacuje się, iż około 5–7 roku życia dziecka następuje pełna stabilizacja mikrobioty jelitowej [7, 8].

W stanie zachowanej homeostazy organizmu, w obrębie mikrobiota dominują mikroorganizmy o pożądanych dla organizmu właściwościach. Tworzą one w miarę stały układ jakościowy i ilościowy. Zaznaczyć należy, że drobnoustroje autochtoniczne stanowią jedyny czynnik bakterieryjny, który jest tolerowany przez ludzki układ odpornościowy i który nie wywołuje aktywacji odpowiedzi immunologicznej. Występujące na powierzchni *Procarvota* (np. na powierzchni komórek bakterieryjnych) ligandy o charakterystycznej strukturze, łącząc się ze swoistymi receptorami w ludzkim organizmie, wywołują bowiem ostrą, wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Eliminacja bakterii czy też wirusów jest nadrzędnym i priorytetowym

**Drobnoustroje autochtoniczne stanowią jedyny czynnik bakterieryjny, który jest tolerowany przez ludzki układ odpornościowy i który nie wywołuje aktywacji odpowiedzi immunologicznej.**



▲ Ryc. 1. Uogólniony schemat układu mikroflory jelitowej człowieka i jej wpływ na organizm człowieka wg Roberfroid [12].

zadaniem naszego układu odpornościowego. Wyjątek stanowią jedynie bakterie autochtoniczne, których obecność nie tylko nie aktywuje sił odpornościowych organizmu, lecz jest wręcz niezbędna dla prawidłowego dojrzewania układu immunologicznego [9]. To właśnie owe drobnoustroje są pierwszymi antygenami, z którymi komórki tkanki limfatycznej jelita GALT (ang: gut-associated lymphoid tissue) mają kontakt i na których przechodzą swoje „szkolenie”. Ekosystem jelitowy nie aktywuje rozwoju stanu zapalnego w jelicie, lecz stale „trenuje” komórki odpornościowe, dzięki czemu są one przygotowane do odpowiednio szybkiej eliminacji patogenów wnikających do ustroju. Widać więc, iż drobnoustroje gospodarza odgrywają istotną rolę odpornościową, stymulując bezustannie układ immunologiczny. Na tym nie kończy się ich znaczenie i rola w ludzkim ustroju. Szczepy autochtoniczne, zwłaszcza z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobac-*

*terium* pobudzają komórki immunokompetentne do produkcji sIgA, przywracając równowagę limfocytów Th1: Th2, na korzyść wytwarzania cytokin przeciwzapalnych oraz nasilają aktywność makrofagów. Bakterie jelitowe odgrywają istotną rolę w procesach trawienia spożywanych przez nas pokarmów, przekształcając jednocześnie substancje toksyczne czy też potencjalnie rakotwórcze w nieszkodliwe. Kolejną korzyścią dostarczaną przez owe drobnoustroje, jest synteza witamin z grupy B czy K [5].

Gdy w przewodzie pokarmowym panuje równowaga, obecność bakterii jelitowych jest czynnikiem zapobiegającym kolonizacji i inwazji drobnoustrojów chorobotwórczych. Jest to dość prosta zależność – bakterie autochtoniczne wykorzystują dostępne miejsca wiązania z nabłonkiem jelitowym oraz sprawnie wykorzystują obecne w środowisku składniki pokarmowe. Dzięki temu patogeny nie znajdują korzystnych warunków do adhezji i rozwoju. Kolejną funkcją mikroorganizmów w jelicie jest wytwarzanie substancji cytoprotekcyjnych względem komórek nabłonka, takich jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, zwłaszcza kwas masłowy czy poliamid. Bakterie autochtoniczne stymulując syntezę mucyny, zapewniają odpowiednią warstwę śluzu i przyczyniają się do utrzymania ciągłości bariery jelitowej [10,11].

### Dysbioza bakteryjna i jej wpływ na zdrowie

Bogactwo pełnionych przez ekosystem jelitowy funkcji sprzyja utrzymaniu homeostazy organizmu, a co za tym idzie – zachowaniu zdrowia. Wszystkie drobnoustroje obecne w jelicie człowieka można podzielić ze względu na korzystne, bądź szkodliwe, za względu na oddziaływanie na makroorganizm (ryc. 1). Zaburzenie równowagi jakościowej i ilościowej mikroflory jelitowej nosi nazwę dysbiozy bakteryjnej.

Nieprawidłowe stosunki bakteryjne w jelicie predysponują do rozwoju licznych chorób. Dysbiozę bakteryjną obserwuje się u pacjentów alergicznych, z astmą, dolegliwościami ze strony przewodu pokarmowego, z nawracającymi infekcjami górnych dróg oddechowych, lecz także układu moczowo-płciowego i pokarmowego. Zniesienie równowagi ekosystemu jelitowego raportowane było wielokrotnie w nieswoistych zapaleniach jelit czy w zespole jelita nadwrażliwego [13]. Coraz częściej mówi się, iż ekosystem jelitowy stanowi odrębny

„organ” naszego organizmu, wpływający na niemal wszystkie procesy życiowe, będący w konsekwencji jednym z głównych gwarantów zachowania zdrowia. Niestety styl życia współczesnego człowieka wybitnie nie sprzyja zachowaniu równowagi mikrobioty jelitowej. Nieracjonalna antybiotykoterapia, stres psychiczny, spożywanie żywności przetworzonej, wzbogaconej w konserwanty i inne dodatki, przebyte infekcje bakteryjne czy wirusowe, radioterapia czy chemioterapia, alkohol spożywany w nadmiernych ilościach – są to jedynie wybrane czynniki znoszące równowagę ekosystemu jelitowego.

### Probiotykoterapia

Coraz większą popularnością, zarówno w środowisku lekarskim, jak i wśród samych pacjentów, cieszą się więc preparaty probiotyczne. Probiotyki zawierają określone szczepy bakteryjne, o udowodnionym korzystnym wpływie na ludzkie zdrowie. Na rynku aptecznym spotkać można zarówno preparaty jednoszczepowe jak i wieloszczepowe, oparte najczęściej o bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Są one powszechnie stosowane w trakcie, lub po przebytej antybiotykoterapii. Niestety szczepy probiotyczne nie mają zdolności permanentnej kolonizacji nabłonka jelita, mimo iż tego typu cecha jest im powszechnie przypisywana. Owe bakterie probiotyczne, mimo posiadania pożądanych cech, właściwych także dla bakterii endogennych, działają w obrębie jelita jedynie w trakcie przyjmowania preparatu probiotycznego. Ich rolą jest bowiem przede wszystkim zmiana warunków panujących w jelicie na korzystniejsze dla rozwoju bakterii autochtonicznych gospodarza. Należy również pamiętać, iż nie wszystkie szczepy probiotyczne wykazują analogiczne działanie, a w konsekwencji ich skuteczność w leczeniu i profilaktyce określonych jednostek chorobowych będzie różna. Przykładowo, szczep *Lactobacillus rhamnosus* GG wydaje się skuteczny w profilaktyce atopowego zapalenia skóry, lecz nie wykazał się żadną efektywnością w podtrzymaniu remisji u pacjentów z nieswoistą chorobą zapalną jelit. U tych ostatnich, konkretnie u chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, jedynym skutecznym szczepem probiotycznym okazał się być *Escherichia coli* Nissle 1917 [14]. Z tego względu probiotykoterapia, jako metoda leczenia, powinna charakteryzować się zindywidua-

lizowanym podejściem, zarówno do jednostki chorobowej, jak i do osoby samego pacjenta. Rośnie więc zainteresowanie możliwościami identyfikacji zespołu drobnoustrojów jelitowych jako całości oraz analizy jakościowych i ilościowych zależności pomiędzy bakteriami zasiedlającymi przewód pokarmowy.

### Metody oceny ekosystemu jelitowego

Ocena wzajemnych interakcji i oddziaływań pomiędzy poszczególnymi składowymi ekosystemu jelitowego wydaje się w chwili obecnej narzędziem niezbędnym dla identyfikacji przyczyn licznych jednostek chorobowych i podjęcia odpowiedniego leczenia celowanego.

Obecnie dla oceny mikrobioty jelitowej, stosuje się dwie podstawowe metody: tradycyjny posiew mikrobiologiczny i analizę genetyczną. Analizy genetyczne, wykorzystują głównie metodę PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy) z amplifikacją 16SrRNA bakteryjnego lub z elektroforezą z gradientem denaturującym DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*. Rzadziej bazuje się na technice FISH (fluorescencyjną hybrydyzację *in situ*) lub metodzie mikromacierzy DNA. Nowoczesnym kierunkiem rozwoju mikrobiologii ekosystemu jelitowego jest metagenomika, czyli skanowanie mikrobiomu na drodze sekwencjonowania bibliotek genomowych. Do zalet metod molekularnych należy z pewnością możliwość oceny większej ilości gatunków bakteryjnych, których nie można zidentyfikować metodą tradycyjnego posiewu mikrobiologicznego. Analiza genów kodujących 16SrRNA wykonana w 2005 roku przez National Institute of Health GenBank wykazała, iż z ponad 1800 zidentyfikowanych sekwencji bakteryjnych, wywodzących się z ludzkiego przewodu pokarmowego, niemal 93% bakterii nie można było zidentyfikować metodami tradycyjnej hodowli mikrobiologicznej [15]. W związku z powyższym, metoda genetyczna uważana jest za złoty standard oceny mikroflory jelitowej. Należy jednak zaznaczyć, iż ona także nie jest pozbawiona ograniczeń. Przykładowo, w wyniku PCR uwzględniane są także szczepy martwych bakterii, które wpłynąć mogą na zafałszowanie wyniku. Uniemożliwia to przykładowo rzeczywistą ocenę liczebności żywych bakterii prozdrowotnych, wywierających efekt na drodze inhibicji kompetytywnej czy produkcji bakteriocyn [10].

**Obecnie dla oceny mikrobioty jelitowej, stosuje się dwie podstawowe metody: tradycyjny posiew mikrobiologiczny i analizę genetyczną.**

Podobnie efekt dają ewentualne błędy w trakcie łańcuchowej reakcji polimerazy. Co więcej, wykrywalność sekwencji metodą PCR maleje wraz z liczebnością bakterii w badanym materiale, choć należy zaznaczyć, iż nie wpływa to na fakt bardzo wysokiej czułości opisanego metody. Identyfikacja nowych gatunków jest również trudna, przede wszystkim z uwagi na konieczność ustalenia optymalnych warunków hybrydyzacji, co jest zadaniem trudnym. Z kolei metoda FISH sprawdza się jedynie dla identyfikacji bakterii o stosunkowo niewielkiej liczbie rybosomów [16]. Koszt technik molekularnych jest również znacznie wyższy aniżeli tradycyjnego posiewu, co znacznie utrudnia powszechne wdrożenie tej metody do standardowej diagnostyki laboratoryjnej. Nie można jednak umniejszać znaczenia technik genetycznych w ocenie złożoności ekosystemu jelitowego, jak również wzajemnych interakcji pomiędzy bakteriami bytującymi w śluzie, w świetle jelita oraz związanych z błoną śluzową nabłonka.

Łatwiej dostępną, tańszą, a przez to tradycyjnie wykorzystywaną metodą oceny mikrobiologicznej jest tradycyjny posiew kału. Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego skolonizowane są różnymi drobnoustrojami. Dla oceny całości ekosystemu jelitowego należałoby więc ocenić materiał pochodzący z różnych rejonów jelita, czyli biopaty, kał oraz śluz. Tego typu całościowa ocena wiązałaby się jednak z koniecznością wykonania inwazyjnych zabiegów endoskopowych. Przyjmuje się więc, iż posiew kału odzwierciedla ekosystem bakteryjny jelita grubego, czyli głównej niszy bakteryjnej w ludzkim organizmie. Najczęściej wykonywanym posiewem mikrobiologicznym jest hodowla w kierunku bakterii chorobotwórczych. O ile metoda ta jest niezbędnym elementem diagnostyki rozlicznych chorób, nie odzwierciedla w żaden sposób stosunków jakościowych i ilościowych mikrobiontów w jelicie.

### **KyberKompakt jako metoda oceny ekosystemu jelitowego**

Ciekawym i nowatorskim rozwiązaniem jest badanie opracowane w Institute für Micrologie w Herborn, nazwana KyberKompakt. Jego celem jest oszacowanie zależności ilościowych i jakościowych określonych grup bakterii, pełniących w jelicie określone

funkcje, zarówno korzystne jak i potencjalnie szkodliwe.

Pierwszym etapem badania, jeszcze przedlaboratoryjnym, jest prawidłowe pobranie materiału – z 8 różnych miejsc po przemieszaniu kału po oddaniu, w celu ujednoczenia próby. Materiał umieszcza się w jałowych, szczelnie zamykanych pojemniczkach. Jest on stabilny do 3 dni od pobrania. Należy przechowywać go w chłodnym miejscu do czasu dostarczenia do laboratorium.

Do badań laboratoryjnego pobiera się 0,25 g kału. Materiał ten umieszcza się w 2,250 ml jałowej soli fizjologicznej (rozcieńczenie  $10^{-1}$ ). Po wymieszaniu, wykonuje się szereg rozcieńczeń w soli fizjologicznej. W celu oznaczenia ilościowego i jakościowego wybranych bakterii stosuje się szereg wybiórczo-różnicujących i namnażających podłoży, na które posiewa się określoną objętość zawiesin kału. Hodowle prowadzi się w odpowiednich warunkach – dla całkowitej liczby bakterii, bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* – inkubacja trwa 48 godzin w  $37^{\circ}\text{C}$  w warunkach bez-tlenowych. Dla pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* hodowle prowadzi się w warunkach o podwyższonym stężeniu  $\text{CO}_2$ , przez 48 godzin w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Bakterie z rodzaju *Enterococcus*, pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczki z rodzaju *Pseudomonas* hoduje się w warunkach tlenowych przez 24 godziny w  $37^{\circ}\text{C}$ . Po określonym czasie inkubacji hodowle poddaje się identyfikacji i liczeniu.

W celu oznaczenia liczby grzybów drożdżopodobnych w 1 g kału, materiał umieszcza się w 2,5 ml roztworze trypsyny z dodatkiem 25  $\mu\text{l}$  antybiotyków (Penicylina i Streptomycyna) w celu zahamowania wzrostu bakterii. Tak przygotowaną próbę, po rozmieszczeniu na wytrząsarce, umieszcza się w komorze inkubacyjno-wytrząsającej w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  na 15 min w celu nadtrawienia resztek pokarmowych mogących uniemożliwić wzrost grzybom. Po tym czasie określoną objętość próby przenosi się do zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS) w celu przepłukania, a następnie wysiewa na 2 podłoża wzrostowe dla grzybów. Jedną płytkę z badaną próbą inkubuje się w  $37^{\circ}\text{C}$  przez 48 godzin, a drugą w temperaturze pokojowej przez ten sam okres czasu. Takie działanie pozwala odróżnić grzyby które są tylko pasażerami ze środowiska, a grzybami

potencjalnie chorobotwórczymi. W przypadku wzrostu grzybów przeprowadza się diagnostykę mikologiczną.

Powyżej opisana procedura postępowania umożliwia określenie liczby i rodzajów wybranych bakterii wskaźnikowych oraz grzybów w odniesieniu do przyjętych wartości [12].

Zaznaczyć należy, iż w diagnostyce Kyber-Kompakt nie jest oznaczana pełna pula bakterii jelitowych. Tego typu szczegółowa diagnostyka nie jest możliwa nawet z wykorzystaniem metod genetycznych. Według ostrożnych szacunków nadal nie ma bowiem możliwości oceny *ex vivo* około 50% gatunków bakterii bytujących w ludzkim przewodzie pokarmowym [17]. Co więcej, ekosystem jelitowy każdego człowieka różni się dość znacznie. Tym niemniej pewna grupa bakterii, stanowiąca „trzon” mikrobioty jelitowej (core), pozostaje względnie stała u osób dorosłych. Są to bakterie z rodzaju *Bacteroides* i *Firmicutes* [17]. W badaniu KyberKompakt szczegółowo analizowane są właśnie owe drobnoustroje wspólne i charakterystyczne dla ludzkiego przewodu pokarmowego, o dość dobrze poznanych właściwościach. Badanie to umożliwia ocenę nie tylko jakościową, lecz także detekcję nieprawidłowości w liczebności poszczególnych drobnoustrojów. Jest to możliwe również dzięki wykonaniu serii odpowiednich rozcieńczeń pobranego kału. Wynik badania podawany jest jako ilość komórek bakteryjnych na gram kału, dzięki czemu można uzyskany wynik odnieść do ogólnie przyjętych norm, wskazujących zakres prawidłowej liczebności określonych rodzajów bakterii u dorosłego człowieka. Badanie to ze względu na technikę oraz dobór odpowiednich, opatentowanych podłoży wzrostowo-różnicujących pozwala nie tylko na określenie stosunków ilościowych i jakościowych bakterii wskaźnikowych egzystujących w jelicie człowieka, lecz umożliwia dodatkowo wykrycie pożądanych cech badanych drobnoustrojów, np. wytwarzanie nadtlenu wodoru przez pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*. Użycie enzymu trypsyny, nadtrawiającego cząsteczki pokarmu obecnego w kale w analizie mikologicznej, pozwala na oznaczenie rzeczywistej liczby grzybów drożdżopodobnych obecnych w jelicie człowieka.

Na badanie KyberKompakt składa się:

- ▶ badanie KyberStatus, czyli jakościowa i ilościowa ocena wybranych bakterii jelitowych,

- ▶ KyberMyk czyli jakościowa i ilościowa diagnostyka grzybów drożdżopodobnych oraz półilościowa diagnostyka grzybów pleśniowych w kale.

Bakterie analizowane w ramach badania KyberStatus analizowane są w obrębie trzech podgrup, wyodrębnionych w oparciu o wiążące właściwości wchodzących w ich skład drobnoustrojów. Wynik badania zawiera więc ocenę liczebności:

- ▶ **mikroflory ochronnej**

Analizowana jest obecność i liczebność bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Bacteroides*. Warty podkreślenia jest wykonywanie dodatkowej analizy pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*, produkujących nadtlenek wodoru, o szczególnie silnym antagonizmie względem bakterii chorobotwórczych. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* dominują w typowym ekosystemie jelitowym dorosłej, zdrowej osoby, osiągając liczebność około  $10^{11}$  komórek/g treści jelitowej. *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* również stanowią znaczącą część ekosystemu jelitowego, a ich prawidłowa, fizjologiczna liczebność oscyluje wokół wartości  $5 \times 10^8 - 10^{10}$ /g kału. Drobnoustroje wchodzące w skład grupy ochronnej w badaniu KyberKompakt stanowią niemal 90% biomasy jelita, co wskazuje na istotną ich rolę w utrzymaniu zdrowia. Opisywane bakterie to względne lub bezwzględne beztlenowce, przez co istnieje konieczność zachowania odpowiednio beztlenowych warunków podczas pobrania, transportu i posiewu kału.

Bakterie podgrupy ochronnej wykorzystywane są do produkcji preparatów probiotycznych, z uwagi na swe unikatowe właściwości – przeciwdziałanie kolonizacji jelita przez bakterie chorobotwórcze, stymulacji układu odpornościowego, uszczelnianie nabłonka jelita czy korzystną stymulację perystaltyki jelit [10, 11]. W trakcie fermentacji węglowodanów mikroorganizmy te wytwarzają szereg krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, będących substratem dla komórek nabłonka jelita. Wytwarzane metabolity uszczelniają barierę jelitową, dzięki czemu zmniejszają wtórną alergizację i przenikanie substancji potencjalnie szkodliwych ze światła przewodu pokarmowego do jelita. Rola bakterii zaliczanych do podgrupy ochronnej jest więc nie do przecenienia. Dodatkowo, drobnoustroje te korzystnie zakwaszają środowisko jelit, na

**W diagnostyce Kyber-Kompakt nie jest oznaczana pełna pula bakterii jelitowych. Tego typu szczegółowa diagnostyka nie jest możliwa nawet z wykorzystaniem metod genetycznych.**

drodze wytwarzania znacznej ilości kwasów organicznych. Niskie pH jest zaś niekorzystne dla rozwoju większości bakterii patogennych, stymuluje zaś wzrost mikrobiontów pożądaných. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* wykazują unikatowe właściwości antagonistyczne, hamując namnażanie drobnoustrojów prowadzących procesy gnilne i zapewniając odporność na kolonizację owymi patogenami (inhibicja kompetytywna). *Lactobacillus* spp. wykazuje dodatkową aktywność w stymulacji makrofagów.

Redukcja liczebności drobnoustrojów ochronnych, zaliczanych do grupy bakterii kwasu mlekowego, prowadzi często do występowania problemów żołądkowo – jelitowych (wzdęcia, biegunki, zaparcia) i ogólnego pogorszenia stanu zdrowia – jako, że bakterie te oddziałują wielowymiarowo na cały organizm [10, 11].

#### ► mikroflora immunostymulująca

Kolejną grupą bakterii analizowaną w ramach badania KyberStatus są drobnoustroje pobudzające komórki układu odpornościowego, czyli immunomodulujące [1]. W ramach tejże podgrupy oznaczana jest niepatogenna forma *Escherichia coli* oraz bakterie z rodzaju *Enterococcus*. Bakterie z gatunku *E. coli* stanowią znaczny procent mikrobioty jelitowej, tj. około 0,0001 do 0,001% całości ekosystemu. Mimo, iż drobnoustroje te są powszechnie utożsamiane z właściwościami chorobotwórczymi, w skład ekosystemu jelitowego wchodzi przede wszystkim szczepy niepatogenne, posiadające unikatową zdolność do stymulacji wszystkich komórek immunologicznych ludzkiego organizmu. Opisywane drobnoustroje aktywują makrofagi, komórki NK – *natural killers*, limfocyty T CD4 i T CD8, dzięki obecności lipidu A w części lipopolisacharydowej otoczki *E. coli*. W konsekwencji obserwowana jest wzmożona produkcja określonych cytokin. Uważa się, iż niepatogenne szczepy *E. coli*, dzięki swym unikatowym zdolnościom do immunomodulacji, zapobiegają kolonizacji i translokacji drobnoustrojów patogennych z przewodu pokarmowego. Dzięki zdolności do hamowania adhezji wirusów do powierzchni nabłonka, można im także przypisać właściwości przeciwwirusowe. Dodatkowo niepatogenne szczepy *E. coli* aktywują funkcje makrofagów, redukują odpowiedź prozapalną oraz modulują ak-

tywność immunologiczną w odpowiedzi na endotoksyny. Bakterie te nie tylko korzystnie wpływają na układ immunologiczny, lecz wykazują także zdolność do inaktywacji substancji toksycznych, takich jak nitrozaminy i inne. Podobne działanie wykazują bakterie z rodzaju *Enterococcus*. Ich pożądaný wpływ na układ immunologiczny odzwierciedla się chociażby w stymulacji produkcji sIgA czy też regulacji aktywności monocytów, za pośrednictwem cytokin IL – 1, IL – 6, IL – 4. Bakterie stymulują też dojrzewanie limfocytów B. Prowadzone przez kilkadziesiąt lat analizy wyników badań KyberStatus wykazały, iż redukcja liczebności drobnoustrojów immunostymulujących skorelowana jest istotnie ze zmniejszeniem odporności organizmu i w konsekwencji z występowaniem nawracających infekcji organizmu.

#### ► mikroflora proteolityczna

Do ostatniej analizowanej w ramach badania grupy bakterii należą drobnoustroje proteolityczne, o niepożądanych dla ludzkiego organizmu właściwościach [18]. W ramach tej podgrupy oznaczane są takie drobnoustroje jak potencjalnie patogenne, śluzowe szczepy *Escherichia coli*. Podobne działanie wykazują drobnoustroje z rodzaju *Klebsiella* *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* czy też *Proteus* w ramach podgrupy „innych bakterii proteolitycznych”. Bakterie z grupy KESCE w drodze swego metabolizmu wytwarzają także szereg substancji toksycznych, uszkadzających nabłonek jelita i wątrobę. Przy znacznej podaży białek w pożywieniu powodują one zwiększenie zasadowości środowiska, prowadząc w konsekwencji do obciążenia wątroby. Dodatkowo poszukuje się także niefermentujących pałeczek Gram-ujemnych z rodzaju *Pseudomonas*, których zwiększona liczba może mieć wpływ na progresję zmian zapalnych w obrębie jelit. Zwiększenie liczebności drobnoustrojów proteolitycznych prowadzi do wytwarzania nadmiernej ilości gazów w trakcie rozkładu białek, co jest częstokroć przyczyną problemów żołądkowo – jelitowych. W ramach mikroflory proteolitycznej w badaniu KyberStatus oznaczane są również bakterie z rodzaju *Clostridium*, wpływające na zwiększenie pH treści jelitowej, produkujące substancje szkodliwe oddziałujące na wątrobę i jelita. Szczepy *Clostridium* spp. wytwarzają dodatkowo enzymy powodujące przekształcenia połączeń

organicznych, powodując mutację komórek. Mikroflora proteolityczna stanowi więc istotne obciążenie dla organizmu, działając destrukcyjnie nie tylko na funkcjonowanie narządów, lecz także wykazując aktywność karcinogenną.

W stanie zachowanej równowagi w przewodzie pokarmowym mikroflora korzystna i pożądana dla człowieka przeważa nad drobnoustrojami o właściwościach chorobotwórczych, przez co nie stanowią one większego zagrożenia dla zdrowia. Innymi słowy, w stanie zdrowia, ekosystem jelitowy działa „na korzyść” człowieka. Zadziałanie czynników szkodliwych, takich jak antybiotykoterapia, ekspozycja na substancje toksyczne i inne prowadzą do zniesienia bakteryjnej równowagi jakościowo – ilościowej i namnożenia drobnoustrojów chorobotwórczych [19]. Te zaś są silnie obciążające dla organizmu. Wspomnieć należy również, iż dysbioza bakteryjna sprzyja nadmiernemu namnożeniu grzybów drożdżopodobnych w przewodzie pokarmowym. W tym miejscu zaznaczyć należy, iż obecność drożdżaków w kale stwierdzana jest u ponad 60% społeczeństwa i nie stanowią one większego zagrożenia dla zdrowia, przy zachowaniu określonej liczebności. Szacuje się, iż  $10^3$  komórek grzyba/g kału jest jeszcze normą fizjologiczną. Przekroczenie tejże wartości stanowi wskazówkę o zwiększonej kolonizacji grzybiczej przewodu pokarmowego. Należy zaznaczyć, iż z uwagi na specyficzny typ wzrostu grzyba, jakościowy lub półilościowy posiew kału nie może dać wiarygodnej wskazówki odnośnie występowania drożdżaków w przewodzie pokarmowym (grzyby występują bowiem w kale w skupiskach). Z tego względu badanie KyberMyk, uzupełniające analizę KyberKompakt, ma na celu nie tylko jakościową, lecz także ilościową analizę występowania drożdżaków w kale. W ramach badania analizuje się więc liczebność grzybów w gramie kału oraz identyfikuje się obecne drożdżaki do gatunku.

W ramach badania KyberKompakt oceniane są również, inne anizeli mikrobiologiczne, aspekty kału, takie jak jego pH czy też konsystencja. Przykładowo, nieprawidłowe pH wpływać może negatywnie na proces trawienia i wchłaniania pokarmów, lub zwiększać ryzyko rozwoju drobnoustrojów potencjalnie chorobotwórczych. ■

#### Piśmiennictwo:

1. Enck P., Zimmermann K., Rusch K. i wsp.: *The Effects of Maturation on the Colonic Microflora in Infancy and Childhood. Gastroenterology Research and Practice* 2009, Article ID 752401.
2. Mroczyńska M., Gałęcka M., Szachta P. i wsp.:  *$\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -glucosidase activity in Stool Specimens of Children with Inflammatory Bowel Disease. PJM* 2013; 62: 319–25.
3. Samet A., Śledzińska A.: *Badanie ilościowej flory bakteryjnej jelita grubego (KyberStatus). IV Ogólnopolskie Warsztaty Naukowo-Szkoleniowe Sekcji Dermatologicznej PTA Słupsk – Ustka* 2008.
4. Hooper L. V., Gordon J. I.: *Commensal host-bacterial relationships in the gut. Science.* 2001; 292 (5519): 1115–18.
5. Ignys I., Piątkowska P., Cichy W.: *Probiotyki i prebiotyki w żywieniu i leczeniu dzieci. Padiatria Polska* 2008; 83: 68–75.
6. Azad M. B., Konya T., Maughan H. i wsp.: *Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. CMAJ,* 2013; 185:5.
7. Tannock G. W.: *A fresh look at the intestinal microflora.* (w:) *Probiotics: A critical review.* red. Tannock G., Horizon Scientific Press, UK, 1999, 5–14.
8. Tannock G. W.: *Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics.* *Int. Dairy J.,* 1998, 8, 527–33.
9. Sansonetti P. J.: *War and peace at mucosal surfaces.* *Nat Rev Immunol* 2004, 4, 953–64.
10. Gawęcki W., Libudzisz Z.: *Mikroorganizmy w żywieniu i żywności,* WAR 2006 Poznań.
11. Fooks L. J., Fuller R., Gibson G. R.: *Prebiotics, probiotics and human gut microbiology.* *Int. Dairy J.,* 1999, 9, 53–61.
12. Roberfroid M., Gibson G.: *Dietary modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics.* *J Nutr* 1995, 125, 1401–12.
13. Cummings J. H.: *The large intestine in nutrition and disease.* Ed. by the Institute Danone, 1997, 1, 155.
14. Ewaschuk J. B., Dieleman L. A.: *Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases.* *World J Gastroenterol.* 2006 Oct 7, 12 (37), 5941–50.
15. Wagner M., Horn M., Daims H.: *Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterization of prokaryotes.* *Curr. Opin. Microbiol.,* 2003, 6, 302–9.
16. Stenka I.: *Wybrane aspekty stosowania probiotyków.* *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2011, 41, 97–108.
17. Olszewska J., Jaguszyn-Krynicka E. K., Human Microbiome Project. *Mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka.* *Post Mikrobiol* 2012, 51 (4), 243–56.
18. Karovicova J., Kohajdova Z.: *Biogenic Amines in Food;* *Chem. Pap.* 2005, 59 (1) 70–79.
19. Weichselbaum E.: *Probiotics and health: a review of the evidence,* *Nutr. Bull.* 2009, 34 (4), 340–44.

data przyjęcia pracy – 9.09.2013  
data akceptacji – 10.10.2013