

# FORMAREA ȘI STRUCTURA MICROFLOREI INTESTINALE

**Prof. Dr. Sorin Buzinschi**

*Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania, Brașov*

## REZUMAT

Populația bacteriană a tractului digestiv matur este cuprinsă în principal în 2 încrengături: *Bacteroidetes* și *Firmicutes*. Formarea microbiotei intestinale parcurge o evoluție stadială. Colonizarea bacteriană se consideră recentă să înceapă în utero. Prezența bacteriilor în țesutul placentar, în membranele fetale, lichidul amniotic și în sângele cordonului ombilical la feți și nou-născuți sănătoși sugerează contactul precoce cu lumea bacteriană ca prim pas de instrucție imunologică. Colonizarea tractului digestiv este continuată și amplificată după naștere. Nașterea pe cale vaginală induce o populare intestinală care reflectă structura florei vaginale materne. Microbiota intestinală a născuților prin cezariană este dominată de flora cutanată și orală maternă, însă cuprinde și ecosistemul cutanat al personalului medical și germeni provenind de pe suprafețe. Laptele matern conține bacterii vii provenind din ductele mamare, areolă, dar mai ales din intestinul matern, acesta fiind o sursă de colonizare naturală a intestinului neonatal. Popularea bacteriană fiziologică a intestinului modulează expresia genelor epitelului pentru toleranță imunologică, furnizează nutrimente gazdei și contribuie la maturarea imunității sistemice.

**Cuvinte cheie:** intestin, bacterii, colonizare, imunitate

Corpul uman și patrimoniul sau microbial sunt componente ale unui imens ecosistem în care populația bacteriană conține de 100 ori mai multe gene și de 10 ori mai multe celule decât cele umane (1,2). Bacteriile sunt organisme monocelulare procariote la care materialul genetic nu este protejat de o membrană nucleară. Față de eucariote, ele se diferențiază prin prezența următoarelor componente: perete celular și membrană plasmatică, citoplasmă în stare coloidală, ribozomi (sinteză proteică), informație genetică într-un cromozom circular (nucleozom) și plasmide (conțin ADN dublu catenar), multiplicare de obicei prin diviziune directă. Din punct de vedere taxonomic se diferențiază prin marile domenii, încrengături (phylum), clase, ordine, familii, genuri, specii și subspecii (2). În practică această ierarhie taxonomică nu este funcțională. În textele științifice vom găsi mai degrabă referiri la specii sau subspecii bacteriene, fiind evitată derularea unui lung lanț de ranguri taxonomice. Cel puțin pentru tractul digestiv sunt importante 2 încrengături: *Bacteroidetes* și *Firmicutes*. Acestea constituie flora dominantă în populațiile de tip vesitic; alte încrengături dețin în jur de 10% din microbiom (*Proteobacteria* – 4,5%), în proporții mici ge-

nul *Escherichia*, *Helicobacter* și *Actinobacter* (3). Colonizarea microbială normală a corpului uman este dependentă de condițiile mediului chimic local, de gradul de oxigenare, de aportul nutritiv al țesutului gazdă și de intervenția sistemului imun. Unele specii proliferază folosind condițiile de nutriție locală, aderă în nișele diferitelor organe și prin succesiunea lor constituie baza unor populații stabile. În totalitate, microorganismele care colonizează suprafețele și unele cavități ale organismului formează microbiota indigenă. Formarea microbiotei intestinale parcurge o evoluție stadială. Putem descrie o etapă prenatală, perioada alimentației exclusive la san sau prin formule de lapte, modificările microflorei după introducerea alimentației solide și formarea microbiotei stabile.

## Colonizarea bacteriană in utero

Conform opiniilor acceptate, mediul amniotic este considerat steril în cazul sarcinilor normale, la termen. În lumea animală însă, transmiterea microbiomului matern la făt este considerată un fenomen comun. Transmiterea verticală a microbiomului matern uman în placentă și în meconiul fetal sugerează că procesul de colonizare începe înaintea naș-

Adresa de corespondență:

Prof. Dr. Sorin Buzinschi, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania, Bulevardul Eroilor 29, Brașov

E-mail: buzinschis@gmail.com

terii. Odată cu dezvoltarea neurologică fătul înghite lichid amniotic, în special în al 3-lea trimestru de sarcină, ceea ce constituie începutul colonizării. Prezența bacteriilor în țesutul placentar, în membranele fetale, în lichidul amniotic și în sângele cordonului ombilical la feți și nou-născuți sănătoși, fără semne de infecție sau inflamație, sugerează contactul precoce cu lumea bacteriană ca prim pas de instrucție imunologică (4,5). Flora microbială din 320 specimene placentare recoltate steril a fost investigată prin secvențierea genetică 16SrRNA în corelație cu investigații similare ale microflorei gravidelor din cavitatea orală, piele, căi respiratorii (nazal), vaginală, și ale microbiomului intestinal de către Aagard et al. (4). Autorul specifică biomasa scăzută a microbiomului placentar (0,002 mg ADN bacterian extras la 1 g țesut placentar). Profilul nișei microbiomului placentar studiat a cuprins genul *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* și *Fusobacterii*, tulpini comensale nepatogene (4,5). Paradigmele curente consideră că majoritatea infecțiilor intrauterine soldate cu nașteri premature își au originea în tractul genital inferior prin ascensionarea germenilor în mediul steril intrauterin. Cu toate acestea numeroase clase bacteriene detectate local nu au provenit din tractul urogenital, ci au reprezentat specii comensale din cavitatea orală a gravidei (4). Unii dintre acești germeni ca *Fusobacterium nucleatum* (oral anaerob Gram -) transmis hematogen, funcționează ca un deschizător de drum pentru alți comensali comuni ca tulpini de *E coli*. Dintre speciile bacteriene identificate în placenta, *E coli* a fost, surprinzător, printre tulpinile cele mai abundente. Într-o trecere în revistă a datelor care arată transmiterea materno-fetală a comunităților bacteriene, Keeler și Weilkamp (6) au evidențiat colonizarea bacteriană comensală a meconiului la 2 ore după naștere chiar înainte de alimentație și prezența populației microbiene în segmentele de intestin rezececat imediat după naștere în cazul unor malformații. Bacteriile comensale din lichidul amniotic înghițit contribuie la maturarea intestinului fetal, la dezvoltarea sistemului imun și la protecția prin competiție față de potențialii patogeni.

Popularea bacteriană uterină în condiții fiziologice înafara sarcinii poate fi împărțită între germeni rezidenți, „turiști” și invadatori. Unele date infirmă existența unei populații stabile uterine care ar avea rol în menținerea homeostaziei locale (12). În cursul sarcinii, în opoziție cu paradigma mediului uterin steril, tehnicile de identificare moleculară a comunităților bacteriene au evidențiat achiziția unui microbiom care, așa

cum s-a arătat, contribuie la stabilirea unor relații imune, structurale și metabolice cu gazda. Unele opinii consideră ipoteza colonizării intrauterine insuficient fondată prin limitarea metodelor moleculare la studiul biomasei minimale, lipsa unui control adecvat al contaminării și incapacității de a dovedi viabilitatea bacteriană.

Prezența abundentă a bacteriilor în lichidul amniotic provoacă corioamniotita, creșterea locală a leucocitelor, a citochinelor proinflamatorii, fiind identificată ca o cauză pentru nașterea prematură (7). Bacteriile care produc infecții vaginale, urinare sau ale lichidului amniotic declanșează producția peptidelor antimicrobiene și a citochinelor care sunt implicate în nașterea prematură și/sau ruperea precoce a membranelor. Cu toate că infecțiile sunt factorii declanșatori importanți, modificarea cascadei inflamatorii prin polimorfisme ale genelor TLR4, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-1ra, TNF- $\alpha$  poate fi considerată una dintre premisele genetice ale nașterii premature (8). Creșterea severității prematurității se corelează cu nivelul ridicat al citochinelor proinflamatorii în lichidul amniotic, cu dezvoltarea abundentă a microbiotei în meconium și cu structura comunității microbiene (9). Tulpinile de *Enterobacter*, *Enterococcus* și *Lactobacillus* sunt corelate negativ cu vârsta gestațională din cauza răspunsului inflamator pe care îl declanșează (9).

Metodele tradiționale de identificare a germenilor prin culturi oferă date incomplete asupra populațiilor bacteriene ale microbiomului uman. Tehnicile metagenomice și tehnologia de secvențiere a revoluționat înțelegerea noastră asupra populațiilor microbiene. Secvențierea unei gene ribozomale (16SrRNA) specific conservată la procariote (bacterii) permite diferențierea între specii și identificarea unora care nu au putut fi cultivate. Deși paradigmele curente consideră că infecțiile intrauterine care provoacă nașteri premature sunt datorate germenilor din tractul genital inferior, în baza noilor tehnologii agenții cel mai frecvent identificați sunt comensali din cavitatea orală (*Fusobacterium nucleatum*, Gram -, anaerob și alții), transmiși pe cale hematogenă.

Sistemului imunitar îi revine rolul de a controla dezvoltarea microbiotei în perioada perinatală pentru ducerea la termen a sarcinii și pentru controlul antigenilor în vederea constituirii stării de imunotoleranță.

### Microbiomul intestinal neonatal

Colonizarea tractului digestiv inițiată din viața intrauterină este continuată și amplificată cu rapidi-

tate după naștere. Numeroși factori determină compoziția microbiotei în primele etape de viață: tipul de naștere (vaginală/cezariană), alimentația naturală/artificială, mediul, igiena și utilizarea de antibiotice. Microbiota vaginală suferă modificări importante în cursul sarcinii. Deși compoziția tulpinilor bacteriene izolate diferă în unele studii, microbiomul vaginal apare a fi dominat de specii ca *Lactobacillus*, *Clostridium* și *Actinomicetes* (4,5,10). Între acestea, tulpinile de *Lactobacillus* prin producția de acid lactic scad pH-ul local (sub 4,5) cu efect protector față de colonizarea cu alte specii, în special patogene (10). Reducerea diversității microbiene intestinale a gravidei în trimestrul 3 de sarcină comparativ cu primul sugerează modificări similare cu cele din sindromul metabolic în care obezitatea și rezistența la insulină au fost corelate cu structura microbiotei intestinale (11). În opoziție cu efectele negative ale obezității, creșterea adipozității și scăderea sensibilității la insulină sunt benefice în sarcină deoarece furnizează mai multă glucoză pentru făt și pregătesc corpul pentru solicitările energetice ale lactației (11). Nașterea pe cale vaginală induce o colonizare intestinală care reflectă structura florei vaginale materne, dominată de specii de *Lactobacillus* și *Prevotella* primele deținând 50% din întregul ecosistem bacterian (12). Alături de flora vaginală, flora fecală maternă contribuie la diversitatea colonizării cu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *E coli* și *Enterococcus*. În prima săptămână de viață, microbiomul nou-născutului la termen este colonizat rapid cu specii din încregătura *Actinobacteria* (incluzând *Bifidobacterium*), *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* și mai puțin *Firmicutes* (4,13). În cazul nașterilor premature sub 1.200 g microbiomul intestinal este dominat de genul *Firmicutes* și *Tenericutes* și mai puțin de *Actinobacteria* (4,5).

Ecologia intestinală la prematuri se caracterizează prin densitatea mică a germenilor și a diversității în funcție de tipul nașterii, spitalizare și modul de alimentație. Acest aspect nu este lipsit de importanță deoarece **colonizarea primară a intestinului este prima lecție de imunitate a copilului**. Colonizarea cu germeni materni permite o comunicare cu aceștia, exprimarea unor gene în epiteliul intestinal și inițierea circuitelor imune. Spre deosebire de nașterile pe cale vaginală, microbiota intestinală a născuților prin intervenție cezariană este dominată de flora cutanată și orală maternă prin *Propionibacterium*, *Corynebacterium* și *Streptococcus* (10), cu o colonizare scăzută cu anaerobi ca *Bacteroides* și *Bifidobacterium* (13). În microbiomul acestora se mai reflectă și ecosistemul cutanat

al personalului medical, colonizarea microbiană a suprafețelor etc ceceea generează riscul popularii intestinale cu germeni rezistenți la antibiotice. În populația lor intestinală s-a identificat o proporție ridicată de gene bacteriene de rezistență la antibiotice. Tulpinile meticilino-rezistente de *Staphylococcus aureus* [MRSA] (prezent la 64-82% dintre aceștia) ar explica prezența infecțiilor cutanate cu acest germene (10). Tratamentul cu antibiotice înainte sau în cursul nașterii modulează ecosistemul intestinal neonatal prin modificarea raportului dintre germenii Gram + și cei Gram - și posibil prin inducția rezistenței bacteriene la antibiotice. Polimorfismul colonizării intestinale poate explica diferențele mari între studiile publicate privind structura, ponderea și evoluția microbiotei neonatale. Primele bacterii colonizatoare structurează expresia genelor în celulele epiteliului intestinal creându-și un habitat favorabil în detrimentul următorilor locuitori (13). Este important de subliniat că flora constituită la naștere influențează diversitatea și funcționarea microbiomului intestinal luni, ani după naștere sau chiar compoziția florei la adulți.

#### Alimentația naturală și colonizarea intestinală

Laptele uman asigură dezvoltarea optimă și sănătoasă a copilului. În afara de principiile alimentare care asigură nutriția sugarului în laptele matern se găsesc numeroase tipuri de oligozaharide, neutrofile, macrofage, celule T și B dar și bacterii vii. Unele dintre acestea provin din ductele mamare sau areolă, dar altele sunt componente intrinseci ale laptelui și provin din microbiomul intestinal matern (14-16). Observațiile că laptele matern nu este steril, chiar colectat aseptice, sprijină ideea că acesta este o sursă de colonizare bacteriană naturală a intestinului neonatal prin faptul că fragmente identice de ADN bacterian pot fi identificate în fecalele materne, sânge, lapte ca și în scaunele sugarilor (15). În cazul alimentației naturale transferul bacterian prin lapte reprezintă o modalitate de colonizare a intestinului neonatal cu o floră asemănătoare cu cea maternă realizându-se circulația germenilor prin circuitul entero-mamar-ental.

Transferul bacteriilor viabile sau materialul genetic al acestora este asigurat de celulele mononucleare materne atât în cursul sarcinii, cât și după naștere (6,14). Greutatea maternă influențează microbiota intestinală și compoziția florei transferate prin lapte (10). La femeile obeze gravide s-a constatat abundența tulpinilor de *S. aureus* în primele 6 luni de lactație și a celor de *Lactobacillus* în prima lună (10). Microbiomul matern este influențat de

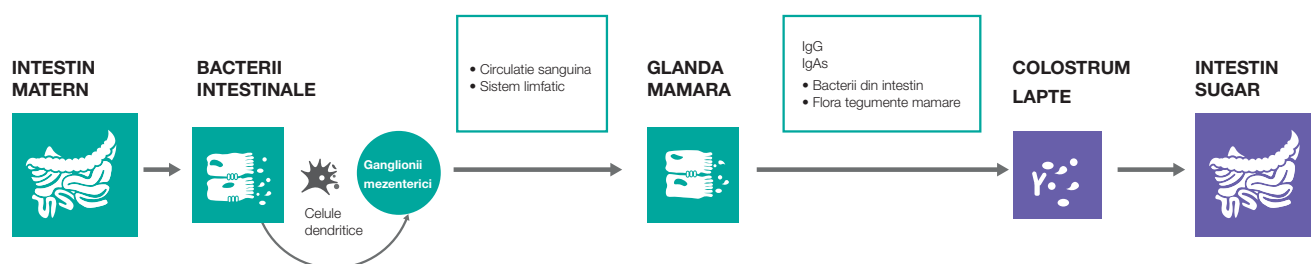


FIGURA 1. Transferul de informație imună de la intestinul matern la intestinul sugarului hrănit natural

factori genetici, imunologici, dietă și medicație, elemente care îi determină structura florei intestinale și configurația germenilor transferați la copil (6). Colonizarea intestinală a nou-născutului și sugarului mai este dependentă de tegumentele sânelui (pentru *Staphylococcus*, *Corynebacteria* și alte bacterii cutanate ca *Propionibacteria*), cavitatea orală maternă (*Fusobacterium nucleatum*, *Bregyella spp*, *Porphyromonas gingivalis etc*) (17). Într-un studiu pe 1.032 de sugari în vârstă de 1 lună Penders et al (18) au constatat că născuții prin cezariană au o microfloră intestinală săracă în *Bifidobacteria* și *Bacteroides*, fiind mai frecvent colonizați cu *Cl difficile* față de cei născuți pe cale vaginală. Sugarii alimentați exclusiv cu formule de lapte sunt mai frecvent colonizați cu *E coli*, *Cl difficile*, *Bacteroides* și *Lactobacillus*. Spitalizarea și prematuritatea cresc colonizarea tulpinilor de *Cl difficile* pe când tratamentul cu antibiotice scade populația de *Bifidobacteria* și *Bacteroides* (18). Diferențele dintre sugarii alimentați la sân și cei hră-

niți cu formule de lapte nu se rezumă la compoziția florei intestinale dar și la efectele protectoare pe care le exercită Tabelul 1.

TABELUL 1. Diferențe între colonizarea intestinală a sugarilor alimentați natural vs. artificial și protecția imună oferită (13,18,19)

Sugari alimentați natural	Sugari alimentați artificial
Tractul digestiv este colonizat primar de <i>Bifidobacteria</i> , <i>Bacteroides</i>	Tractul digestiv este colonizat cu o floră diversă care conține <i>E coli</i> , <i>Cl difficile</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Prevotella</i> și <i>Lactobacillus</i>
Laptele uman conține numeroși factori antimicrobieni și imunomodulatori care limitează creșterea patogenilor, celule vii (neutrofile, macrofage, limfocite T și B)	Flora microbiană complexă; în proporție ridicată anaerobi facultativ/obligatoriu ca <i>Enterobacteria</i> , <i>Streptococcus</i> și <i>Cl difficile</i>

Colonizarea intestinală cu microbiota maternă este optimă în nașterea pe cale vaginală, la domiciliu și în condițiile alimentației naturale. În maternități și mai ales în spitale există șanse pentru coloni-

TABELUL 2. Microbiota intestinală la sugar și relația comensală sau simbiotică cu gazda sa. Trecere în revistă a speciilor considerate semnificative (10,13,19,20,21).

Specii din flora intestinală	Colonizare
<b>Bifidobacterii</b>	Colonizează abundent tractul digestiv al sugarilor mai ales prin <i>B bifidus</i> , <i>B breve</i> , <i>B infantis</i> . Sunt germeni Gram + anaerobi; se localizează în strânsă legatură cu stratul mucos al epitelului.
<b>Lactobacillus</b>	Germeni Gram + colonizează mai ales colonul. În intestinul nou-născuților provin din flora vaginală maternă și din laptele matern. <i>L acidophilus</i> , cea mai comună specie de <i>Lactobacillus</i> , urmează bifidobacteriilor ca importanță în intestinul sugarilor alimentați natural. Adeziunea la epitelul intestinal îi conferă proprietăți protectoare față de colonizarea cu patogeni.
<b>Clostridium</b>	Germeni Gram +, obligatoriu anaerobi, formatori de spori. Colonizează fiziologic tractul intestinal însă au capacitatea de a elabora exotoxine (A și B) fiind patogeni prin acestea și potențial patogeni prin formarea de spori. Dintre speciile de <i>Clostridium</i> , <i>Cl difficile</i> colonizează intestinul sugarului fără a produce efecte nocive în condiții normale. Majoritatea sugarilor colonizați cu <i>Cl difficile</i> sunt asimptomatici și prezintă anticorpi de tip IgG față de toxina A și B care le conferă o imunitate de lungă durată.
<b>Bacteroides</b>	Germeni Gram -, obligatoriu anaerobi, comensali și condiționat patogeni, dețin ~30% din masa bacteriană a intestinului. Prezintă relații mutuale cu gazda prin descompunerea substraturilor vegetale. Se dezvoltă abundent în tractul digestiv uman; consumul ridicat de proteine și grăsimi animale îi favorizează colonizarea pe când consumul predominant de carbohidrați favorizează dezvoltarea speciilor de <i>Prevotella</i> . <i>Bacteroides fragilis</i> , anaerob, în general comensal, face parte din flora colonică. Excretat în proporție de 0,5% din bacteriile prezente în scaun. Implicat în infecțiile cu anaerobi proveniți din flora intestinală.
<b>Escherichia coli</b>	Germeni Gram - facultativ anaerob, colonizează precoce intestinul sugarului. Laptele matern are efect protector față de acesta prin inhibiția colonizării. Unele specii sunt comensale, participă la sinteza vitaminei K și B, stimulează limfocitele să secrete IgA. Tulpini ca O157:H7, secretoare de verotoxina pot produce efecte severe ca enterită hemoragică și sindrom hemolitic uremic.

zarea diversă, cu influențe pe termen lung asupra microbiomului nou-născutului și sugarului. Odată cu diversificarea și introducerea alimentelor solide se produc schimbări în compoziția microbiotei intestinale prin dezvoltarea unor specii prevalente la adulți (*Bacteroidetes*, *Firmicutes* și *Clostridium*) (10). Modificările florei depind de evoluția substratului nutrițional, sursă pentru speciile comensale care extrag energie, produc vitamine, acizi grași cu catenă scurtă și aminoacizi.

Odată format, microbiomul intestinal stabilește relații simbiotice cu gazda sa prin prelucrarea substraturilor nedigerate, limitarea nutrimenților pentru patogeni și competiție de spațiu cu aceștia, formarea stării de toleranță imună între bacterii și sistemul imun, instrucția și dezvoltarea imunității sistemice. Tulburările de formare și menținere a microbiotei intestinale pot constitui factori de risc pentru patologia inflamatorie și metabolică a adultului.