

Analýza dysbiózy - neinvazívna diagnostika pri gastrointestinálnych problémoch



Zdroj obrázku: envatoelements

Fyziológia a úlohy črevnej mikrobioty

Gastrointestinálna mikrobiota je komplexné spoločenstvo mikroorganizmov, ktoré kolonizujú tráviaci trakt a zohrávajú dôležitú úlohu v zdraví a pohode zvierat. Pozostáva z 99 % z anaeróbných bakteriálnych druhov, ktoré rastú v neprítomnosti kyslíka a patria napr. k bakteriálnym kmeňom Firmicutes, Proteobacteria a Fusobacteriota. Presné zloženie črevnej mikrobioty sa však u jednotlivcov líši, mení sa v priebehu života a je silne ovplyvnené faktormi, ako sú strava, choroby, lieky a podmienky prostredia. Zdravá črevná mikroflóra podporuje trávenie, imunitný systém, tvorbu vitamínov a mastných kyselín s krátkym reťazcom (SCFA) a obranu proti patogénnym zárodkom. Jednotlivé bakteriálne kmene sú úzko prepojené, vzájomne na seba pôsobia, čo sa označuje ako cross feeding, a vytvárajú vlastný silne prepojený ekosystém.

Tento ekosystém črevnej mikrobioty možno považovať za prvú úroveň črevnej bariéry. Už len svojou prítomnosťou a metabolickou aktivitou bráni kolonizácii patogénmi a znižuje ich množenie (rezistencia voči kolonizácii). Následná vrstva hlienu a črevná sliznica poskytujú ďalšiu mechanickú bariéru proti cudzím choroboplodným zárodkom a antigénom. Bunky črevného epitelu sú navzájom spojené tesnými spojmi („tight junctions“, spojenie bunka-bunka), takže k prenosu látok dochádza tam, kde je sliznica neporušená, veľmi selektívne. Ako tretia úroveň črevnej bariéry hrá dôležitú úlohu lymfoidné tkanivo asociované s črevom (GALT). Už len existencia črevnej mikroflóry prispieva k udržaniu obrannej imunologickej bariéry proti cudzorodým zárodkom prostredníctvom neustáleho tréningu GALT. Okrem toho sú patogény aktívne potláčané stimuláciou syntézy antimikrobiálne aktívnych peptidov, ako sú β -defenzíny a imunoglobulíny. Znížená bariérová funkcia, napr.

v dôsledku bakteriálnej nerovnováhy, môže okrem iného viesť k prenosu antigénov, endotoxínov, centrálne aktívnych metabolitov z črevného lúmenu do krvného obehu, čo iniciuje alebo zosilňuje rôzne patomechanizmy.

Následky a diagnostika dysbiózy

Dysbióza mikrobioty je narušenie rovnováhy medzi rôznymi druhmi baktérií, ktoré môže viesť k zníženiu diverzity, zvýšenému počtu potenciálne škodlivých baktérií a zmenenej funkcii mikrobioty. Môže byť vyvolaná alebo podporená rôznymi faktormi, ako je stres, zmeny stravovania, antibiotická liečba, infekcie alebo chronické črevné ochorenia. Okrem toho, v prítomnosti existujúcich gastrointestinálnych symptómov môže dysbióza viesť k rýchlemu zhoršeniu klinických symptómov. Analýza dysbiózy napr. pomocou kvantitatívnej PCR (materiál vzorky: faeces) môže byť preto užitočným diagnostickým nástrojom na posúdenie rozsahu črevnej dysfunkcie a na umožnenie cielej terapie.

Klinické symptómy, ktoré indikujú analýzu dysbiózy, zahŕňajú (ale nie sú obmedzené na):

- chronické a akútne zápalové ochorenia čriev
- flatulencia, hnačka, konstipácia
- syndróm prerastania tenkého čreva (SIBO), syndróm dráždivého čreva
- maldigescia, malabsorpcia, deficity mikroživín
- krmivové intolerancie, alergie
- svrbenie, ekzém
- vypadávanie srsti.

Keďže klinický obraz a príznaky nemožno vysledovať späť k jedinému bakteriálnemu kmeňu alebo druhu, diagnostika sa zameriava na meranie celých funkčných bakteriálnych skupín. Zo štúdií boli u psov a mačiek identifikované niektoré baktérie a bakteriálne skupiny, ktoré možno použiť ako markerové baktérie pre dysbiotický stav čreva. **Detekcia markerových baktérií molekulárne biologickými metódami** môže poskytnúť informácie **o rezistencii voči kolonizácii**. Na druhej strane, pozorovanie jednotlivých funkčných bakteriálnych skupín, ako sú baktérie tvoriace SCFA alebo baktérie chrániace sliznicu, môže umožniť vyvodiť závery

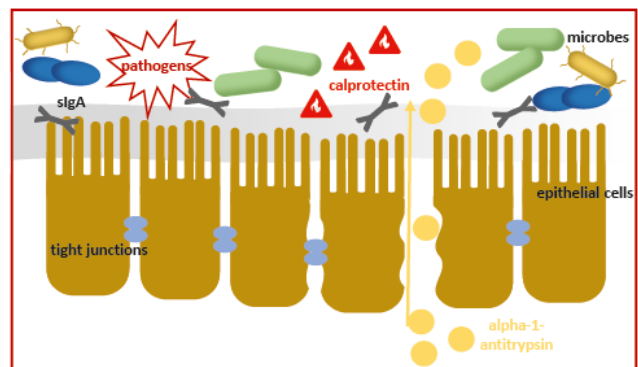
o stave hlienovej vrstvy a zásobe energie črevných epiteliálnych buniek.

Avšak je potrebné si uvedomiť, že príčiny dysbiózy môžu byť veľmi rôznorodé a narušenie bakteriálnej rovnováhy má priamy vplyv na bariérovú funkciu črevnej steny. Stanovenie ďalších parametrov teda môže byť užitočné pri podrobnejšom pohľade na stav črevnej bariéry (obrázok 1).

Biomarkery trusu na hodnotenie črevnej sliznice a schopnosti trávenia

Okrem markerových baktérií môžu profil dysbiózy doplniť nasledujúce biochemické parametre:

- **Kalprotektín** je vhodný ako zápalový marker v diferenciálnej diagnostike pri mnohých ochoreniach tráviaceho traktu (napr. IBD alebo iné zápalové ochorenia čriev). Rovnako tak sa dá použiť na sledovanie priebehu terapie a detekciu recidív týchto ochorení.
- **Alpha-1-antitrypsín** môže byť použitý ako marker straty bielkovín črevom. Musíme však poznamenať, že nejde o marker špecifický pre zápalové ochorenie čriev (IBD). Zvýšené hladiny sa vyskytujú pri ďalších gastrointestinálnych alebo systémových ochoreniach, ktoré majú za následok zvýšenú priepustnosť čriev („leaky gut“).
- Koncentrácia psej **pankreatickej elastázy 1** priamo odráža exokrinnú funkciu pankreasu. Nedostatok pankreatickej elastázy môže viesť k tráviacim problémom a malnutícii. Nízka hodnota v truse naznačuje nedostatočnú produkciu tráviacich enzýmov. Znížená efektívnosť trávenia pred slepým črevom tiež vedie k zvýšenému prechodu tukov a bielkovín do hrubého čreva.



Obr. 1: Porušená črevná bariéra stráca svoju ochrannú funkciu voči patogénom a cudzorodým látkam

Zdroj obrázka: Laboklin

To posúva prostredie v prospech potenciálne škodlivých baktérií a môže podporovať rozvoj dysbiózy.

Ďalší biomarker, **sekretorické IgA (slgA)**, môže poskytnúť informácie o záťaži črevnej sliznice a je novo ponúkaný v profile dysbióza pre psov a mačky od 01.07.2023.

Význam a funkcia slgA

Protilátky slgA, ktoré sa nachádzajú predovšetkým na slizniciach, slúžia ako prvá línia obrany proti patogénom, ktoré sa môžu dostať cez dýchacie cesty, gastrointestinálny trakt alebo kožu. Ako dôležitá zložka GALT sa viažu na potenciálne škodlivé baktérie alebo antigény, čím im bránia prichytiť sa alebo poškodiť črevnú stenu.

Vzťah medzi črevným mikrobiómom a slgA ešte nie je úplne objasnený, ale mikrobiota má vplyv na GALT, a tým aj na tvorbu a funkciu slgA. Na jednej strane podporuje dozrievanie a aktiváciu plazmatických buniek, ktoré produkujú slgA. Na druhej strane slgA moduluje zloženie a aktivitu črevnej mikrobioty selektívnou väzbou alebo inhibíciou určitých mikróbov. Vzniká tak symbiotický vzťah, ktorý je dôležitý pre udržanie črevnej bariéry a slizničnej imunity.

slgA je dôležitým diagnostickým markerom pre rôzne ochorenia gastrointestinálneho traktu, ako je chronická zápalová enteropatia alebo „leaky gut“ syndróm. Stanovenie slgA v truse môže poskytnúť informácie o funkčnej kapacite a imunitnom systéme asociovaným s črevom.

- **Znížená detekcia slgA** môže naznačovať poškodenie črevnej bariéry a oslabenie lokálneho imunitného systému. To môže byť spojené so zvýšenou náchylnosťou na črevné ochorenia, zvýšenou citlivosťou na infekcie, alergickými reakciami alebo imunosupresívnymi stavmi.

- **Zvýšené slgA** môžu naznačovať určité zaťaženie črevného imunitného systému, ktoré môže byť spôsobené akútnym alebo chronickým zápalom črevnej sliznice. Medzi možné stavy patria kolitída, IBD alebo parazitóza.

Stanovenie slgA v truse je jednoduchá a neinvazívna metóda na posúdenie lokálneho

imunitného stavu v čreve. Na stanovenie správnej diagnózy by sa však malo vždy interpretovať v kombinácii s inými klinickými a laboratórnymi parametrami.

Prípadová štúdia

„Leila“ je 8-ročná boxerka, ktorá už niekoľko mesiacov trpí opakovanými hnačkami (obrázok 2), plynatosťou a stratou apetítu.

Z trusu sa realizovalo vyšetrenie profilu dysbiózy. Analýza odhalila zvýšené hladiny slgA a kalprotektínu. To svedčí o zápale črevnej sliznice, ako aj o silnom strese lokálneho imunitného systému. Analýza markerových zárodok odhalila zníženú diverzitu mikrobiómu. Intestinálne skóre 5,0 bolo v abnormálnom rozsahu, čo indikuje dysbiotický stav. Bližší pohľad na skupiny markerových baktérií odhalil mierne až silné zníženie referenčných hodnôt *F. prausnitzii*, *Turicibacter* spp. a *Blautia* spp. Tieto druhy patria do kmeňa Firmicutes a zohrávajú kľúčovú úlohu v zásobovaní buniek črevného epitelu energiou ako producenti alebo recyklátori SCFA.



Obr.2: Sučka Leila a jej trus

Zdroj obrázka: Dr. Jennifer Scherzer

Proteobaktéria *E. coli*, na druhej strane, bola zvýšená v porovnaní s referenčným rozsahom. Toto pozorujeme u psov v súvislosti s gastrointestinálnymi poruchami. Okrem vytesnenia baktérií chrániacich sliznicu môže k podráždeniu črevnej sliznice prispieť silný imunogénny účinok a škodlivé metabolity. Ďalej je črevné prostredie posunuté v prospech patogénov.

Prechodom na ľahko stráviteľné krmivo s prídavkom prebiotík možno podporiť rast slizničných ochranných baktérií a zároveň zabrániť šíreniu škodlivých baktérií. Tento účinok možno ešte zvýšiť dodatočným užívaním probiotík. Enterocyty sú tak opäť lepšie zásobené energiou a znižujú sa následky podráždenia škodlivými metabolitmi baktérií.

V prípade potreby možno terapiu doplniť pridaním protizápalových liečiv.

Dysbióza profil - výsledok	
Endoparazity a mykológia	➔
Pankreatická elastáza	➔
alpha-1-antitrypsin	➔
Kalprotektín	➔
slgA	⬆
Intestinálne skóre	5,0
Celkový počet baktérií	➔
<i>E.coli</i>	⬆
<i>F. prausnitzii</i>	⬇
<i>Fusobacterium</i> spp.	➔
<i>Blautia</i> spp.	➔
<i>Tricibacter</i> spp.	⬇
<i>C. hiranonis</i>	➔

Obr. 3: Výsledok dysbióza profilu u sučky Leily. Zelené šípky zodpovedajú referenčným hodnotám resp. nevykazujú pozoruhodnosti. Žlté šípky naznačujú mierne zvýšenie alebo zníženie v porovnaní s referenčnými hodnotami a červené šípky naznačujú výrazné zmeny.

Zdroj obrázka: Laboklin

Dr. Jennifer Scherzer

Ďalšia literatúra

Tress U, Suchodolski JS, Williams DA, Steiner JM. Development of a fecal sample collection strategy for extraction and quantification of fecal immunoglobulin A in dogs. *Am J Vet Res.* 2006 Oct;67(10):1756-9. doi: 10.2460/ajvr.67.10.1756.

Peters IR, Calvert EL, Hall EJ, Day MJ. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Sep;11(5):841-8. doi: 10.1128/CDLI.11.5.841-848.2004.

Grellet A, Heilmann RM, Polack B, Feugier A, Boucraut-Baralon C, Grandjean D, Grützner N, Suchodolski JS, Steiner JM, Chastant-Maillard S. Influence of Breed Size, Age, Fecal Quality, and Enteropathogen Shedding on Fecal Calprotectin and Immunoglobulin A Concentrations in Puppies During the Weaning Period. *J Vet Intern Med.* 2016 Jul;30(4):1056-64. doi: 10.1111/jvim.14255.

AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, Markel M, Lidbury JA, Steiner JM, Serpedin E, Suchodolski JS. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017 Nov 1;93(11). doi: 10.1093/femsec/fix136.