

Utilidad del *Bifidobacterium lactis* en la prevención de la translocación bacteriana en el intestino corto experimental*

N. García-Urkia¹, A.B. Asensio¹, I. Zubillaga Azpiroz¹, P. Zubillaga Huici³, C. Vidales¹, J.M. García-Arenzana⁴, P. Aldazábal¹, I. Eizaguirre²

¹Unidad Experimental. ²Servicios de Cirugía Pediátrica. ³Pediatría. ⁴Microbiología. Complejo Hospitalario Donostia. San Sebastián.

RESUMEN: La translocación bacteriana (TB) constituye el principal foco de atención en los procesos infecciosos que acompañan al síndrome del intestino corto (SIC). La pérdida de tejido intestinal inmunocompetente, la alteración de la motilidad y el sobrecrecimiento bacteriano, favorecen la aparición de TB.

El empleo de probióticos ha sido recomendado en diversas situaciones patológicas, como el tratamiento y prevención de diarreas agudas, alergia alimentaria, alteraciones inmunitarias, procesos inflamatorios intestinales, aumento de los niveles séricos de colesterol y prevención de la formación de tumores intestinales.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el posible efecto beneficioso de un probiótico en el intestino corto experimental.

Treinta y dos ratas adultas Wistar fueron divididas en dos grupos:

Grupo A (n = 14): Grupo control con resección del 80% del intestino delgado, libre acceso a comida y agua, y 10 días de seguimiento.

Grupo B (n = 18), como el grupo A, incluyendo la administración oral diaria de $7,8 \times 10^9$ UFC de *Bifidobacterium lactis* en 1 ml de agua estéril.

Tras el sacrificio, se recogieron muestras de sangre portal, sangre periférica y ganglio linfático mesentérico (GGL) para cultivo microbiológico. Se consideró la existencia de TB ante la presencia de microorganismos gram (-) en alguno de los cultivos.

La incidencia de TB ha sido del 93% en el grupo A, y del 44% en el grupo B (p < 0,001). La reducción del riesgo relativo (RRR) es 0,52 (IC al 95% de 0,23-0,81) y el número necesario a tratar (NNT) es 2 (IC al 95% de 1-5).

En conclusión, la resección intestinal está asociada a una alta incidencia de TB y ésta incidencia se ve disminuida por la administración oral diaria de *Bifidobacterium lactis*.

PALABRAS CLAVE: Probiótico; *Bifidobacterium lactis*; Translocación bacteriana.

Correspondencia: Iñaki Eizaguirre, Plaza del Deporte 8, 3º A, 20009 San Sebastián.

*Presentado en el XL Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica, en Sevilla, en mayo de 2001. Trabajo realizado con una Ayuda de Investigación de Nestlé España, S.A.

Recibido: Mayo 2001

Aceptado: Septiembre 2001

PROBIOTIC SUPPLEMENTATION REDUCES THE RISK OF BACTERIAL TRANSLOCATION IN EXPERIMENTAL SHORT BOWEL SYNDROME

ABSTRACT: Background. Probiotics are live organisms that survive passage through the gastrointestinal tract and have beneficial effects on the host. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* have been recommended in cholesterol lowering, acute diarrhea, prevention of cancer or inflammatory bowel disease.

On the other hand, after massive bowel resection bacterial overgrowth is frequent and favours the occurrence of bacterial translocation (BT). The possible beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* (BL) administration on BT in experimental short bowel syndrome (SBS), have not been investigated.

Aim. To test the hypothesis that BL administration decreases BT in SBS in animals fed orally.

Methods. Thirty-two adult Wistar rats fed orally with standard rat chow and tap water «ad libitum» were maintained in individual metabolic cages for ten days after 80% gut resection from the duodeno-jejunal angle to 10 cm above the cecum and divided in two groups:

- Group A (n = 14): served as control.

- Group B (n = 18): daily 7.8×10^9 CFU *Bifidobacterium lactis* administration, after orogastric intubation.

At the end of the experiment they were sacrificed and mesenteric lymph nodes (MLN), and peripheral and portal blood specimens were recovered and cultured. Bacterial identification in blood was made by conventional methods and MLN culture was considered positive with a growth over 100 CFU/g.

Results. Bacterial translocation was detected in 93% of Group A rats. The incidence of BT in Group B was 44%. The relative risk reduction (RRR) was 0.52 (95% confidence interval 0.23-0.81) and the number needed to treat (NNT) was 2 (95% confidence interval between 1-5).

Conclusion. Administration of *Bifidobacterium lactis* reduces the incidence of BT in adult Wistar rats, after 80% gut resection.

KEY WORDS: Probiotics; *Bifidobacterium lactis*; Bacterial translocation.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos producen un efecto favorable para la salud humana⁽¹⁾.

Concretamente, algunas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, han sido recomendadas en diversas situaciones patológicas⁽²⁾.

El intestino corto es un problema de difícil solución en ocasiones. Sabemos que en su pronóstico influyen tanto la longitud del intestino restante, como la presencia o ausencia de la válvula ileocecal (VIC). Y también es cierto que perdemos muchos pacientes por infección, sepsis a gram (-) debida al paso de gérmenes intestinales a través de una barrera que es insuficiente, es decir, debido a la translocación bacteriana (TB), que se ve favorecida en estos pacientes por varias circunstancias: dismotilidad, sobrecrecimiento bacteriano, pérdida de tejido linfoide asociado al intestino (GALT), empleo de nutrición parenteral, atrofia de la mucosa, etc.⁽³⁻⁵⁾.

Con estas bases establecimos la hipótesis de que la administración de probióticos podría tener un efecto beneficioso sobre la TB, al actuar sobre la flora intestinal, alterada en estos pacientes.

El objetivo del presente trabajo ha sido, pues, determinar el efecto protector de la administración oral de probióticos frente a la TB, en un modelo de intestino corto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Treinta y dos machos adultos Wistar [CRL:(WI). BR. Criffa, Barcelona, España] de entre 225 y 275 g, criadas y mantenidas en nuestras instalaciones de acuerdo con la legislación vigente⁽⁶⁾ fueron asignadas a dos grupos:

Grupo A (n = 14): grupo control con resección del 80% del intestino delgado (desde 10 cm más allá del ángulo de Treitz hasta 10 cm antes de la válvula ileocecal) y libre acceso a comida y agua (A04 diet, Panlab, Barcelona, España).

Grupo B (n = 18), como el grupo A, incluyendo la administración oral diaria de $7,8 \times 10^9$ UFC de *Bifidobacterium lactis* (cedidas por Nestlé España, S.A.) (BL) en 1 ml de agua estéril.

Los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas individuales y fueron observados durante diez días, registrándose diariamente el peso, las ingestas y pérdidas y el estado general.

Al final del estudio los animales fueron anestesiados con cocktail i.m. de Atropina 0,1 mg/kg (Atropina® B. Braun Medical, S.A.), Ketamina 60 mg/kg (Ketolar® Parke-Davis) y Diacepam 3 mg/kg (Valium® Roche), y sacrificados en condiciones estériles mediante punción portal y cardíaca. Se tomaron muestras de sangre portal, sangre periférica y ganglios linfáticos mesentéricos para cultivo microbiológico.

Las muestras de sangre portal (1 mL) y periférica (1 mL) se inocularon en frascos de hemocultivo (Bacter, Benton-Dickinson, Maryland, USA) e incubaron en un sistema automático de hemocultivo (Bacter 9240, Benton Dickinson, Maryland, USA) durante 7 días. Las muestras de ganglios linfáticos mesentéricos se mezclaron en una cantidad igual de

Tabla I Animales con cultivo positivo en los diferentes territorios

	Ganglio Mesentérico		Sangre Periférica		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Grupo A N: 14	13	(93%)	4	(29%)	13	(93%)
Grupo B N: 18	8	(50%)	3	(17%)	8	(44%)

solución salina estéril, se homogeneizaron y sembraron con asa calibrada de 0,1 mL en placas de agar soja tripticasa con sangre de caballo, agar manitol y agar MacConkey. Las placas se incubaron durante 48 horas a 35°C.

La identificación bacteriana se realizó por métodos convencionales: catalasa, coagulasa, bilisesculina para gram (+) y mediante galería de identificación para Enterobacterias (Api 20E, Merieux, Francia) en gram (-).

El cultivo de sangre tanto portal como periférica, se consideró positivo de forma cualitativa. En el caso de los GGLL se consideró cultivo positivo un crecimiento ≥ 100 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo.

La TB se definió como la presencia de gérmenes entéricos gram (-) en cualquiera de los territorios observados.

Todas las variables se describieron por métodos estadísticos comunes. Las comparaciones entre grupos se realizó mediante los Test Chi-cuadrado, con la corrección de Yates y «t» de Student o «U» de Mann-Whitney. En todo el estudio se acepta una $p < 0,05$ como nivel de significación estadística. Se calculó la reducción del riesgo relativo (RRR) dividiendo la diferencia entre las tasas de TB entre los grupos A y B por la tasa de infección en el grupo B y el número de animales que habría que tratar para evitar un resultado desfavorable (número necesario a tratar, NNT) calculando el inverso de la reducción del riesgo absoluto (RRA)⁽⁷⁾.

RESULTADOS

La evolución de los pesos en cada grupo durante los 10 días que duró el experimento se muestra en la figura 1. En ambos grupos es apreciable una pérdida de peso postoperatorio, que comienza a corregirse el 2º día en el grupo B (con suplemento de BL), frente al 4º día en el grupo A (control).

La ganancia ponderal a lo largo del estudio fue superior ($3,52 \text{ g} \pm 18,75$) en el modelo con suplemento probiótico (grupo B), frente al grupo A (control) ($-7,87 \text{ g} \pm 16,57$) ($p = 0,07$).

La incidencia de TB se muestra en la tabla I, incluyendo el número total de animales y el porcentaje en cada uno de los territorios observados, a nivel local (sangre portal y ganglio mesentérico) y a nivel sistémico (sangre periférica), así como la TB total.

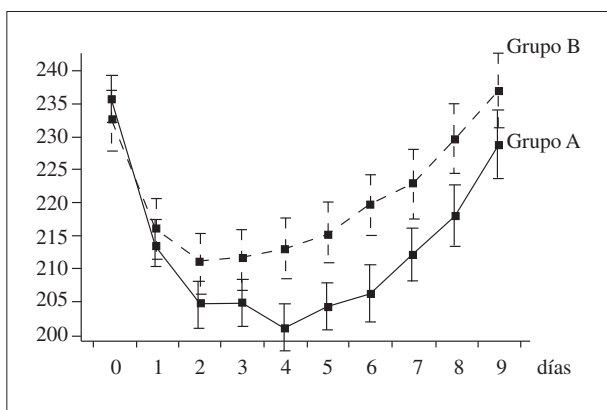


Figura 1. Evolución ponderal de los dos grupos.

La incidencia de TB fue del 93% en el grupo A, y del 44% en el grupo B ($p < 0,001$). La reducción del riesgo relativo (RRR) fue 0,52 (IC al 95% de 0,23-0,81) y el número necesario a tratar (NNT), 2 (IC al 95% de 1-5), lo que indica que el riesgo de tener TB disminuye un 52% si se administran BL, y que sería necesario tratar dos animales con BL para que uno quede libre de TB.

Analizando separadamente por territorios la TB en los grupos A y B, a nivel local (sangre portal y ganglio mesentérico) las diferencias han sido igualmente significativas ($p < 0,001$), con un 93% y 50%, respectivamente. A nivel sistémico han sido de un 29% y 17%, mayor en el grupo control aunque sin presentar diferencias significativas.

Los cultivos realizados en nuestro estudio fueron 96, de los cuales 33 resultaron positivos como indicadores de TB. El germen más frecuentemente encontrado ha sido *Escherichia coli* (61%), seguido de *Proteus mirabilis* (12%), *Enterococcus faecalis* (6%), *Enterobacter cloacae* (6%). En el 15% restante se engloban diversas Enterobacterias, no encontrándose ningún microorganismo anaerobio.

DISCUSIÓN

Se considera probiótico un microorganismo si reúne una serie de condiciones: origen humano, no patógeno, alta resistencia al paso por el intestino, capacidad de adherirse a las mucosas y prevenir la adhesión de otros microorganismos patógenos y ejercer efectos positivos sobre la respuesta inmune y la salud humana⁽¹⁾.

Algunas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se han recomendado en el tratamiento y prevención de diarreas agudas, alergia alimentaria, alteraciones inmunitarias, procesos inflamatorios intestinales, aumento de los niveles séricos de colesterol, enterocolitis necrotizante neonatal y prevención de la formación de tumores intestinales^(2, 8).

El mecanismo a través del cual actúan los probióticos no es bien conocido. En este sentido se han señalado: produc-

ción de sustancias que inhiben el crecimiento bacteriano⁽⁹⁾, inhibición competitiva de la adhesión bacteriana⁽¹⁰⁾, consumo competitivo de nutrientes y modificación de los receptores de toxinas a través de mecanismos enzimáticos y estimulación de la respuesta inmune⁽¹¹⁾.

Estos mecanismos de acción están siendo investigados tanto en estudios en humanos como en modelos animales. En estos últimos, las modificaciones introducidas por la adición de probióticos, pueden investigarse a través del estudio de los cambios cuantitativos y cualitativos de la microflora intestinal, por su influencia a nivel histológico en órganos lesionados de forma controlada o sobre la TB inducida por medio de diferentes técnicas⁽¹²⁾.

En una revisión reciente, Macfarlane y cols.⁽¹³⁾ postulan que cuando se altera la microflora intestinal que nos protege contra la patogenicidad de microorganismos y además estimula la respuesta inmune, algunas cepas *Bifidobacterium* ayudan al mantenimiento de la funcionalidad de la barrera intestinal, a través de la estimulación de esta microflora.

El empleo de probióticos en el intestino corto en Pediatría es, por el momento, limitado. La única experiencia publicada⁽¹⁴⁾ se refiere a la adición de *Lactobacillus* en niños afectados de SIC en los que se consiguió frenar el sobrecrecimiento bacteriano.

Sin embargo, a nivel experimental la experiencia es mayor. Mangiante y cols., en un modelo de TB asociada a pancreatitis, tras ligadura del conducto común biliopancreático en ratas Lewis adultas, consiguen disminuir significativamente los cultivos positivos de ganglio mesentérico tras administración de *Lactobacillus Plantarum*⁽¹⁵⁾. Con el mismo probiótico se ha logrado también reducir la TB inducida en ratas Sprague Dawley, tras fallo hepático secundario a administración intraperitoneal de D-galactosamina⁽¹²⁾.

En un modelo de TB en el conejo recién nacido se pudo constatar el beneficio de la administración de *Lactobacillus GG* sobre la colonización del intestino delgado y sobre la propia TB⁽¹⁶⁾.

La TB es un fenómeno frecuente en el SIC. Sabemos que en la rata no manipulada una TB de entre 5-10% puede considerarse como normal^(17, 18) y, sin embargo, tras la resección de una buena parte del intestino surgen circunstancias que favorecen la TB, como son la dismotilidad intestinal, el sobrecrecimiento bacteriano y la pérdida de tejido intestinal inmunocompetente, entre otros^(3, 5, 19).

En nuestro estudio hemos utilizado un modelo conocido de resección intestinal que en trabajos previos presenta una alta incidencia de TB⁽¹⁸⁾. Nuestros resultados presentan una incidencia de TB total en el grupo control del 93%, que se reduce significativamente en el grupo con administración oral diaria de *Bifidobacterium lactis* al 44%. Por ello, el que más de la mitad de los animales tratados con el probiótico se vean libres de translocación, quiere decir que la protección del probiótico frente a la TB en este modelo de intestino corto experimental es de gran importancia. Analizando por te-

ritorios, hay que mencionar que esta situación se reproduce a nivel local (ganglio linfático mesentérico y sangre portal). A nivel sistémico (sangre periférica), la TB también disminuye de un 29% a un 17%, lo que, aun no siendo significativo, es también de gran importancia, debido a que en este caso, los gérmenes han atravesado los filtros hepático y linfático y el riesgo de sepsis es mayor.

Nuestros resultados también muestran que la ganancia ponderal ha sido superior tras la utilización del probiótico, aunque sin diferencias estadísticamente significativas y que la recuperación de la curva de peso ha sido más rápida en el grupo con probiótico. Existiendo a este respecto estudios que demuestran como algunas cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* previenen la pérdida de peso en algunas situaciones similares⁽²⁰⁾.

Podemos concluir que la resección intestinal está asociada a una alta incidencia de TB y que los índices de translocación son significativamente menores con la administración oral diaria de *Bifidobacterium lactis*.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Marian Ostariz y Miguel Fermín su inestimable trabajo de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Peña Quintana L, Serra Majem L. Uso de probióticos, prebióticos y simbióticos en patología humana: efectos preventivos y terapéuticos. *Pediatrka* 2000;**20**:9-19.
- De Roos NM, Katan MB. Effect of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 2000;**71**:405-411.
- Meehan JJ, Georgeson KE. Prevention of liver failure in parenteral nutrition-dependent children with short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 1997;**32**:473-475.
- Pierro A, Van Saenne HFK, Donell SC, Hughes J, Ewan C, Nunn AJ y cols. Microbial translocation in neonates and infants receiving long-term parenteral nutrition. *Arch Surg* 1996;**131**:176-179.
- Weber TR. Enteral feeding increases sepsis in infants with short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 1995;**43**:533-570.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 18-12-86 del NL 358/1 al NL.
- Sackett DL, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB. En: *Medicina Basada en la Evidencia. Cómo ejercer y enseñar la MBE*. Madrid: Ed. Churchill Livingstone, 1997; págs. 117-119.
- Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M y cols. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 2000;**118**:1280-1281.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Res* 1995;**59**:171-200.
- Duffy LC, Zielezny MA, Rieppenf-Talty M. Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. *Pediatr Res* 1994;**35**:590-685.
- Spanhaak S, Havennar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Nutr* 1998;**52**:1-9.
- Adawi D, Kasrawi B, Molin G, Jepsen B. Effect of *Lactobacillus* supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in a acute liver injury model in the rat. *Hepatology* 1997;**25**:642-647.
- Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics and Prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacterial benefit health? *BMJ* 1999;**318**:999-1003.
- Vanderhoof JA, Young RJ. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;**27**:323-332.
- Mangiante G, Canepari P, Colucci G, Marinello P, Signoretto C, Nicoli N y cols. A probiotic as an antagonist of translocation in experimental pancreatitis. *Chirurgia Italiana* 1999;**51**:221-226.
- Lee DJ, Drongowski RA, Coran AG. Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. *Pediatr Surg Int* 2000;**16**:237-242.
- Schimpl G, Feierl G, Linni K, Uitz C, Ozbey H, Hollwarth ME. Bacterial translocation in short-bowel syndrome in rats. *Eur J Pediatr Surg* 1999;**9**:224-227.
- Eizaguirre I, Aldazabal P, Barrena MJ, García-Arenzana JM, Alcorta M, Ariz C y cols. Bacterial translocation is favoured by the preservation of the ileocecal valve in experimental short bowel with total parenteral nutrition. *Eur J Pediatr Surg* 1999;**9**:220-223.
- Bianchi A. Longitudinal intestinal lengthening and tailoring: results in 20 children. *J R Soc Med* 1997;**90**:429-432.
- Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony, O'Halloran S, Feeney M y cols. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in animal clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1990;**76**:270-292.