

Diagnóstico de la translocación bacteriana en el intestino corto experimental mediante reacción en cadena de polimerasa

P. Aldazábal, N. García Urkía, A.B. Asensio, J.M. García Arenzana, P. Bachiller, I. Eizaguirre*

Unidad Experimental y *Servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Donostia. San Sebastián.

RESUMEN

Introducción. El sobrecrecimiento bacteriano que ocurre tras la resección intestinal masiva facilita la translocación de gérmenes gram-negativos intestinales. Los probióticos pueden tener efectos beneficiosos sobre la translocación bacteriana (TB).

Por otro lado, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) tiene más sensibilidad que los métodos convencionales para la detección bacteriana y no ha sido investigada en modelos experimentales de intestino corto y TB.

Objetivo. Poner a prueba la hipótesis de que la administración de un probiótico (*Bifidobacterium lactis*, BL) disminuye la translocación de *Escherichia coli* en un modelo de intestino corto experimental bajo probióticos y confirmar la mejor sensibilidad de la técnica de PCR para detectar TB.

Material y métodos. Cuarenta y ocho ratas Wistar adultas alimentadas por vía oral se mantuvieron en cajas metabólicas individualizadas durante diez días y se dividieron en tres grupos:

- Control (n=15): animales no manipulados.
- RES (n=15): resección intestinal del 80% y administración diaria de 1 ml de agua por sondaje orogástrico.
- RES-PRO (n=18): la misma resección y administración diaria de $7,8 \times 10^9$ unidades formadoras de colonias (UFC) de *Bifidobacterium lactis*.

Al final del experimento se tomaron muestras para cultivo bacteriológico de sangre portal y periférica y de ganglios linfáticos mesentéricos. Además se detectó ADN genómico de *E. coli* por PCR.

Resultados. Por cultivo convencional no se detectó translocación de *E. coli* en el grupo control. En el grupo RES fue del 73% y en el grupo RES-PRO, del 33%. Por PCR se detectó translocación en el 47% del grupo control, en el 87% del grupo RES, y en el 33% del grupo RES-PRO, mostrando así alta sensibilidad.

Por ambos métodos, los animales que recibieron BL mostraron menos translocación. Por cultivo convencional, el riesgo relativo (RR) fue de 0,45 (95% CI 0,22-0,79) y el número necesario a tratar (NNT)

fue 3 (95% CI 0-11). Por PCR, el RR fue de 0,38 (95% CI 0,19-0,76), y el NNT 2 (95% CI 0-4).

Conclusiones. 1) La administración de *Bifidobacterium lactis* reduce la incidencia de translocación. 2) La técnica de PCR es más sensible para la detección de la translocación por *E. coli*.

PALABRAS CLAVE: Translocación bacteriana; Reacción en cadena de polimerasa; Probióticos; Intestino corto experimental.

DETECTION OF BACTERIAL TRANSLOCATION BY POLYMERASE CHAIN REACTION IN AN EXPERIMENTAL SHORT BOWEL MODEL

ABSTRACT

Background. Bacterial overgrowth occurring after massive bowel resection, facilitates Gram-negative intestinal Bacterial Translocation (TB). Probiotic agents might have beneficial effects on TB. On the other hand, polymerase chain-reaction (PCR) has better sensitivity than conventional methods for bacterial detection and has not been investigated in experimental models of short bowel syndrome and TB.

Objective. To test the hypothesis that the administration of *Bifidobacterium lactis* (BL) decreases *Escherichia coli* Bacterial Translocation (ECTB) in experimental short bowel syndrome and to confirm the better sensitivity of PCR technique to detect ECTB.

Methods: Adult Wistar rats, orally fed with standard rat chow and tap water "ad libitum", were maintained in individual metabolic cages for ten days and divided into three groups:

- Control (n=15): non-manipulated animals.
- RES (n=15): 80% gut resection. Daily administration 1 ml of sterile water, after orogastric intubation.
- RES-PRO (n=18): same resection and daily administration of 7.8×10^9 *Bifidobacterium lactis* Colony Forming Units (CFU).

At the end of the experiment, mesenteric lymph nodes (MLN), and both peripheral and portal blood samples were recovered and cultured by standard procedures. Also, genomic DNA from *E. coli* was detected by PCR technique.

Results. By conventional cultures ECTB was detected in 0% in the control group, 73% in the RES group and 33% in the RES-PRO group. PCR technique detected ECTB in 47% of the control group, 87% of the RES group and 33% of RES-PRO group, showing higher sensitivity.

By both methods, animals receiving BL (RES-PRO group) showed less ECTB. By conventional culture, the relative risk (RR) was 0.45 (95% CI 0,22-0,79) and the number needed to treat (NNT) was 3 (95% CI 0-11). By PCR technique, the RR was 0.38 (95% CI 0.19-0.76), and the NNT 2 (95% CI 0-4).

Correspondencia: Pablo Aldazábal. Unidad Experimental. Hospital Donostia. Pº Dr. Beguiristain s/n. 20014 San Sebastián.
E-mail: paldaza@chdo.osakidetza.net

Financiado en parte por ayudas del Gobierno Vasco, (200012008), FIS (Fondo de Investigación Sanitaria 00/1154) y Nestlé España S.A.

Presentado en el XLIX Annual Congress of the British Association Of Pediatric Surgeons, en Cambridge, Julio 2002.

Recibido: Enero 2007

Aceptado: Julio 2007

Conclusions: 1) Administration of *Bifidobacterium lactis* reduces the incidence of ECTB. 2) PCR technique is a more sensitive method for ECTB detection.

KEY WORDS: Bacterial Translocation; Polymerase chain-reaction; Probiotics; Experimental short bowel; Short bowel syndrome.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de intestino corto (SIC) es un reto para los cirujanos pediátricos y la infección una de sus complicaciones más relevantes. La translocación bacteriana (TB) de bacterias Gram-negativas a través de la pared intestinal puede ser responsable de la aparición de sepsis en esos pacientes y es muy frecuente en niños con SIC y en adultos con fallo multiorgánico, respuesta sistémica inflamatoria, pancreatitis aguda, cirrosis, quemaduras, síndrome de isquemia-reperfusion u obstrucción intestinal⁽¹⁻³⁾.

De acuerdo con nuestra práctica experimental previa, *Escherichia coli* es el germen que se halla con más frecuencia en la TB^(2,3).

Los probióticos son organismos vivos que sobreviven al paso a través del tracto gastrointestinal y tienen efectos beneficiosos en el huésped. Se han recomendado *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* en varias enfermedades y ambos pueden tener también efectos beneficiosos en la TB⁽⁴⁾. Nosotros hemos comprobado previamente que *Bifidobacterium lactis* disminuye el riesgo de TB de gérmenes entéricos, en un modelo experimental de SIC⁽⁵⁾.

Recientemente, el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante nos permite usar la detección molecular de microorganismos patógenos detectando su ADN genómico. Esta técnica supone una identificación de gérmenes más rápida y sensible que los métodos bacteriológicos convencionales basados en cultivos específicos.

La técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se ha introducido en el campo de la clínica con este propósito dada su mejor sensibilidad, y porque puede ser repetida en muestras de sangre de pacientes con sospecha de sufrir TB⁽⁶⁾. Hay pocos trabajos que hayan tratado estas cuestiones en la TB y en el SIC experimental⁽⁷⁾.

El objetivo de este estudio es poner a prueba la hipótesis de que la administración de *Bifidobacterium lactis* (BL) disminuye la translocación de *Escherichia coli* en un modelo experimental de SIC, y que la PCR tiene mayor sensibilidad para detectarla.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuarenta y ocho ratas Wistar adultas (CRL:WI. BR. Crifafa, Barcelona, Spain), con un peso entre 225 and 250 g, criadas, alimentadas y mantenidas en nuestro laboratorio de acuerdo con las presentes normativas⁽⁸⁾, fueron divididas en tres grupos de manera randomizada:

- Grupo Control (n=15): animales no manipulados.
- Grupo RES (n=15): resección del 80% del intestino delgado desde 10 cm más allá del ángulo de Treitz hasta 10 cm antes de la válvula ileocecal^(5,9). Se les administró 1 ml de agua estéril cada día por sondaje orogástrico.
- Grupo RES-PRO (n=18): la misma resección que el grupo RES y una administración diaria de $7,8 \times 10^9$ UFC de *Bifidobacterium lactis* (BL) (proporcionados por Nestlé España S.A.) en 1 ml de agua estéril, por sondaje orogástrico.

Los animales se mantuvieron durante diez días en jaulas metabólicas individualizadas con acceso libre a comida (A04 diet, Panlab, Barcelona, España) y agua. Al final del estudio los animales fueron anestesiados con una mezcla intramuscular de 0,1 mg/kg de atropina (Atropine, B. Braun Medical SA), 60 mg/kg de ketamina (Ketolar, Parke-Davis) y 3 mg/kg de diazepam (Valium, Roche), y fueron sacrificados en condiciones estériles por punción cardíaca. Se tomaron muestras de sangre portal (1 ml), periférica (1 ml) y ganglios mesentéricos para cultivo microbiológico y PCR. La muestra de ganglios se dividió en dos partes, una para cada método.

La sangre portal y periférica se inoculó en frascos de hemocultivo (Bacter, Becton-Dickinson, Maryland, EE.UU) y se incubó en un sistema automático (Bacter 9240, Becton Dickinson, Maryland, EE.UU.) durante 7 días. Las muestras de ganglios mesentéricos se fijaron primero en una cantidad igual de solución salina estéril, luego se homogeneizaron y finalmente se sembraron mediante una pipeta calibrada de 100 μ l (0,1 ml) en placas de triptona agar soja con sangre coagulada de caballo, manitol agar y MacConkey agar. Las placas se incubaron durante 48 horas a 35°C.

La identificación bacteriana se llevó a cabo mediante métodos convencionales: catalasa, coagulasa y biliesculina para bacterias Gram (+), y una galería de identificación para *Enterobacterias* (Api 20E, Merieux, France) en bacterias Gram (-).

El cultivo de las muestras de sangre se consideró positivo cualitativamente y, en el caso de los ganglios, cuando el crecimiento fue superior a 100 UFC/g.

La detección de *E. coli* se hizo mediante SSP-PCR (Sequence Specific Primer-Polymerase Chain Reaction). El ADN genómico se extrajo mediante QIamp DNA blood kit y QIamp DNA Minikit (Quiagen, Barcelona, España). La amplificación de los fragmentos de ADN se hizo por SSP-PCR usando primers específicos para el gen de la β -galactosidasa del *E. coli* (LAC-Z) (Primers: BC-1: 5'-CTT TGC CTG GTT TCC GGC ACC AGA A-3' y BG-4: 5'-ACC CAC CGC ACG ATA GAG ATT CGG G-3').

El programa de amplificación PCR fue diseñado con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido por 10 ciclos de anillado restrictivo a 94°C durante 30 segundos, 64°C durante 60 segundos, y finalmente 35 ciclos de elongación y anillado a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 60 segundos y 72°C durante 60 segundos. Para asegurar la última elongación de la secuencia amplificada añadimos otro ciclo a 72°C durante 10 minutos.

La solución de PCR contenía 7 µl de solución de pre-mezcla, compuesta por 10X PCR buffer (166 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% Tween 20), MgCl₂ (1,5 mM), 0,1 mM de dATP, dCTP, dGTP y dUTP (Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, EE.UU.), Cresol Red (10 mg/ml) y Glycerol; 1 µl de cada primer (10 pmol/µl); 1 ml de ADN genómico (100 ng/µl) y 0,5 µl de Taq polimerasa (Ecogen, Pamplona, España).

El producto final fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución (1,5%) en 1X TBE. Después de la electroforesis, el gel fue fotografiado bajo luz UV para comprobar la presencia o ausencia de ADN bacteriano en nuestras muestras⁽⁷⁾.

La translocación bacteriana se definió como la presencia de gérmenes entéricos Gram (-) en cualquiera de los territorios observados o cualquier amplificación de ADN.

Todas las variables se sometieron a métodos estadísticos comunes. Las comparaciones entre grupos se hicieron mediante el test de Chi-cuadrado, con la corrección de Yates, y el test de la "t" de Student o el test de la "U" de Mann-Whitney U test. Una p<0,05 se tomó como nivel de significación estadística a lo largo del estudio. El riesgo relativo (RR) se definió como el cociente entre el riesgo de translocación del grupo que recibió la intervención y el riesgo del grupo control, y el número necesario a tratar (NNT) como el número de animales que necesitarían ser tratados para prevenir un episodio de translocación bacteriana^(6,15).

RESULTADOS

La incidencia total de la TB se muestra en la tabla I.

Por cultivo convencional no se detectó translocación de *E. coli* en el grupo control. En el grupo RES fue del 73% y en el grupo RES-PRO, del 33%. LA PCR encontró translocación en el 47, 87 y 33%, respectivamente, mostrando una sensibilidad más alta.

Por ambos métodos, los animales que recibieron BL (grupo RES-PRO) mostraron menos translocación que los que no la recibieron (grupo RES). Por cultivo convencional, el riesgo relativo (RR) fue de 0,45 (95% CI 0,22-0,79) y el número necesario a tratar (NNT), 3 (95% CI 0-11). Por PCR, el RR fue de 0,38 (95% CI 0,19-0,76), y el NNT, 2 (95% CI 0-4). En otras palabras, la adición de probióticos redujo el riesgo

Tabla I Translocación bacteriana total por *E. coli*

Grupos	Translocación bacteriana total	
	Cultivo	PCR
Control (15)	0 (0%)	7 (47%) +
RES (15)	11 (73%) *	13 (87%) *
RES-PRO (18)	6 (33%) **	6 (33%) **

PCR: reacción en cadena de polimerasa.
* p<0,05 vs Control. ** p<0,05 vs RES. + p<0,05 vs Cultivo.

de translocación aproximadamente a la mitad o a un tercio, dependiendo del método empleado y sería necesario administrar BL a 2-3 animales para conseguir que uno quedara libre de translocación.

Si analizamos los resultados de la TB en cada territorio (Tabla II) vemos que los datos son bastante similares. La única excepción se da a nivel de los ganglios mesentéricos donde la TB encontrada por cultivo convencional no fue diferente de la detectada por PCR.

DISCUSIÓN

El posible efecto beneficioso de los probióticos en diferentes enfermedades ha sido cuestionado por algunos autores que defienden la idea de que los probióticos no sobreviven en el paso a través del tracto digestivo⁽¹³⁾. Estudios recientes, sin embargo, demuestran que un considerable porcentaje de los probióticos administrados exógenamente se recuperan en las heces^(4,14).

Nuestro estudio muestra que los probióticos pueden reducir el riesgo de TB en niños con SIC y confirman nuestros hallazgos previos. Los mecanismos probablemente responsables de este efecto han sido discutidos previamente⁽⁵⁾.

La TB es un fenómeno bien conocido en múltiples modelos experimentales pero no tanto en humanos. En adultos la TB está ciertamente involucrada en el síndrome de fallo multiorgánico y en el de respuesta inflamatoria sistémica, pancreatitis aguda, cirrosis, quemaduras, síndrome de isquemia-reperusión y obstrucción intestinal. También la TB es un fenómeno que ocurre hasta cierto grado en humanos sanos (5-15%). El impacto real de la TB en algunas enfermedades nece-

Tabla II Translocación bacteriana por *E. coli* en cada territorio

Grupos	GGMM		Sangre portal		Sangre periférica	
	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR
Control (15)	0 (0%)	3 (20%) +	0 (0%)	4 (27%) +	0 (0%)	3 (20%) +
Res (15)	11 (73%) *	9 (60%) *	1 (7%)	11 (73%)+*	0 (0%)	4 (27%) +
Res-Pro (18)	5 (28%) **	4 (22%) **	1 (6%)	2 (11%)**	1 (6%)	2 (11%)

PCR: reacción en cadena de polimerasa. GGMM: ganglios mesentéricos. * p<0,05 vs Control. ** p<0,05 vs RES. + p<0,05 vs Cultivo.

sita estudios posteriores de los mecanismos fisiopatogénicos involucrados en la función de barrera intestinal^(1,15).

La TB puede ser demostrada por cultivo de ganglios mesentéricos pero, desgraciadamente, este tipo de cultivos no puede llevarse a cabo de manera seriada en humanos y así este tipo de investigaciones ha sido llevado a cabo en muy pocos estudios^(1,16).

Un método alternativo indirecto pudiera ser la extracción repetida de muestras de sangre en pacientes graves y el uso de un sistema rápido de detección de gérmenes^(11,17). Muchos de los trabajos llevados a cabo para definir la sensibilidad de la técnica de PCR indican que este método es más sensible que los métodos estándar basados en el crecimiento de microorganismos en medios de cultivo⁽⁶⁾.

El segundo objetivo de nuestro estudio era probar la hipótesis de que la técnica de PCR tenía mayor sensibilidad para la detección bacteriana en comparación con los métodos tradicionales. El análisis de la incidencia de TB muestra que la sensibilidad de la PCR es más alta que la de los cultivos tradicionales excepto en los ganglios mesentéricos. Tras su paso a través de la barrera intestinal, *E. coli* se establece firmemente en los ganglios⁽¹⁶⁾ por lo que su presencia en este órgano es más fuerte que en los otros compartimentos estudiados. En dos de tres de los grupos estudiados la sensibilidad de la PCR no fue más alta que en los cultivos. Esto puede ser debido a falsos negativos o a la división de la muestra en dos.

Otro aspecto debatible es si el hecho de encontrar fragmentos de ADN pueda significar o no que los gérmenes sean viables. Lo que es claro, sin embargo, es que si *E. coli* es detectado en los ganglios o en sangre periférica o portal es a consecuencia de que el germen ha atravesado la barrera intestinal sin importar el momento en el que esto haya podido ocurrir. En nuestro trabajo hemos seleccionado un gen funcional del metabolismo bacteriano por lo que es probable que la bacteria a la que pertenece está activa. Puede obtenerse más precisión en un estudio en el cual se utilice una serie variable de genes funcionales, lo cual nos capacita para asegurar que el ADN localizado corresponde a genes con una capacidad infectiva⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Hemos verificado la sensibilidad más alta de la técnica de la PCR en comparación con los métodos tradicionales. La presencia de un microorganismo concreto en las muestras analizadas es un hecho que confirma el paso a través de la barrera intestinal, pero al mismo tiempo, debe hacerse notar que este hallazgo positivo no confirma la existencia de infección. Para ello debemos estudiar el número de copias amplificadas de ADN y establecer una relación entre esta cifra y la presencia de infección o la extensión de la infectabilidad, a través de una PCR cuantitativa (RT-PCR).

BIBLIOGRAFÍA

1. Balzan S, Quadros CA, de Cleve R, Zilberstein B, Ceconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471.

2. Eizaguirre I, Aldazabal P, Barrena MJ, Garcia-Arenzana JM, Alcorta M, Ariz C, Candelas S, Tovar JA. 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.
3. Pierro A, Van Saene HK, Donnell SC, Hughes J, Ewan C, Nunn AJ, Lloyd DA. Microbial translocation in neonates and infants receiving long-term parenteral nutrition. *Arch Surg* 1996; 131:176-179.
4. Fric P. Probiotics and prebiotics. Renaissance of a therapeutic principle. *Central Eur J Med* 2007 (En prensa).
5. Eizaguirre I, García Urkia N, Asensio AB, Zubillaga I, Zubillaga P, Vidales C, Garcia-Arenzana JM, Aldazabal P. Probiotic supplementation reduces the risk of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 699-702.
6. Kane TD, Wesley Alexander J, Johannigman JA. The detection of microbial DNA in the blood: A sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients. *Ann Surg* 1998; 227: 1-9.
7. Kucukaydin M, Kocaoglu C, Koskal F, Kontas O. Detection of intestinal bacterial translocation in subclinical ischemia-reperfusion using the Polymerase Chain Reaction Technique. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 41-43.
8. European Communities Journal 1986, Dec 18th. NL 358/1 al NL 358/28.
9. 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.
10. Kane TD, Johnson SR, Alexander JW, Babcock GF, Ogle CK. Detection of intestinal bacterial translocation using PCR. *J Surg Res* 1996; 63: 59-63.
11. Haynes B, Glasszion P. Terms Used in Therapeutics. *EBM* 200; 16: 34-37.
12. Sackett DL, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB. Evidence-based Medicine: how to practice and teach EBM. Pearson Professional Limited 1997 pp 117-119.
13. Wilson KH. Ecological concepts in the control of pathogenesis. En: Roth JA, Bolin CA, Brogden KA, Minion FC, Wannemuehler MJ, eds. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. Washington, DC: ASM Press 1995, pp. 245-56.
14. Pochart P, Marteau P, Bouhnik Y, Goderel I, Bourliouix P, Rambaud JC. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *Am J Clin Nutr* 1992; 55:78-80.
15. Lemaire LCJM, Van Lanschot JJB, Stoutenbeek CP, Van Deventer SJ, Wells CL, Gouma DJ. Bacterial Translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg* 1997; 84: 1340-1350.
16. Lichtman SM. Bacterial Translocation in Humans. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 2001; 33:1-10.
17. Wilmore DW. Polymerase Chain Reaction surveillance of microbial DNA in critically ill patients: exploring another new frontier. *Ann Surg* 1998; 27: 10-11.
18. McCabe KM, Khan G, Zhang YH, Mason EO, McCabe E. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: Automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrics* 1995; 95: 165-169.
19. Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 1992; 327: 293-301.
20. Yamashita Y, Kohno S, Koga H, Tomono K, Kaku M. Detection of *Bacteroides fragilis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 679-683.