

Papel del sobrecrecimiento bacteriano intestinal y de la motilidad intestinal en la traslocación bacteriana en un modelo experimental de cirrosis

E. Sánchez, F. Casafont, A. Guerra, I. de Benito¹ y F. Pons-Romero

Servicios de Aparato Digestivo y ¹Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria. Santander

RESUMEN

Introducción: el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) está relacionado con la motilidad del intestino delgado y diferentes trabajos con modelos experimentales han sugerido su relación con el desarrollo de traslocación bacteriana (TB). Tanto el sobrecrecimiento bacteriano intestinal como la traslocación bacteriana son eventos frecuentes en la cirrosis hepática.

Objetivos: los objetivos de este estudio han sido analizar la población cecal de bacterias aerobias y el tránsito intestinal en un modelo de ratas cirróticas y su relación con la TB.

Material y métodos: el estudio se ha realizado en un modelo experimental de cirrosis inducida por tetracloruro de carbono por vía oral en ratas Sprague-Dawley. Se llevaron a cabo cultivos microbiológicos convencionales a partir de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), sangre portal y periférica, hígado, bazo, y muestras cecales de todos los animales. Además se determinó el tiempo de tránsito intestinal en 10 ratas cirróticas y en 10 controles.

Resultados: la prevalencia de la traslocación bacteriana en los animales cirróticos fue de un 56%. La población de gérmenes

aerobios en el ciego en las ratas cirróticas fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que en las ratas controles. Las ratas cirróticas con TB presentaron un población bacteriana intestinal más elevada que las ratas sin TB ($p < 0,05$). La prevalencia de SBI en los animales cirróticos fue de un 67% frente a un 0% en los animales control ($p < 0,01$); también el SBI fue más frecuente en las ratas cirróticas con TB que en las cirróticas sin TB (93 vs. 33%) ($p < 0,01$). De las bacterias que traslocaron un 95,6% presentaban sobrecrecimiento en ciego. El tránsito intestinal fue más lento en las ratas cirróticas ($60,5 \pm 12,7$ vs. $81,2 \pm 5,7$ cm) que en los animales controles ($p < 0,01$).

Conclusiones: estos resultados sugieren que el sobrecrecimiento bacteriano es frecuente en ratas cirróticas y predispone al desarrollo de traslocación bacteriana intestinal. Además, este sobrecrecimiento probablemente está favorecido por la existencia de una dismotilidad intestinal, frecuente en este modelo de cirrosis experimental.

Palabras clave: Sobrecrecimiento bacteriano intestinal. Traslocación bacteriana. Cirrosis experimental. Motilidad intestinal.

INTRODUCCIÓN

El paso de bacterias viables desde el intestino a los nódulos linfáticos mesentéricos (GLM) es conocido como traslocación bacteriana (TB) (1) y es un fenómeno que ocurre en numerosas situaciones clínicas que se caracterizan por el frecuente desarrollo de sepsis causadas por gérmenes gram-negativos (2).

Las infecciones son una complicación frecuente de los enfermos cirróticos y la mayoría de ellas están causadas por organismos de origen entérico (3). Diferentes estudios han documentado la importancia de la TB en la cirrosis (4,5), la cual parece jugar un papel importante en la patogénesis de estas infecciones y especialmente en la peritonitis bacteriana espontánea (PBE) (6,7). Los factores que favorecen la traslocación de la flora intestinal en la cirrosis no están completamente definidos y entre otros han sido involucrados la endotoxemia y la malnutrición (8-10). La ruptura del equilibrio ecológico en la flora intestinal parece ser un factor importante que se ha relacionado también con el desarrollo de TB y la predisposición a la aparición de infecciones (11,12). Por ejemplo, el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) que se ha observado en algunos pacientes cirróticos, ha sido relacionado con una mayor predisposición al desarrollo de PBE (13-16). Otro dato que demuestra la importancia de la flora intestinal como factor patogénico de las infecciones en la cirrosis es el hecho de que la descontaminación intestinal selectiva mediante la administración de antibióticos, ha demostrado que previene la TB en ratas cirróticas, y es la profilaxis habitual de la PBE en pacientes cirróticos (17-20). Además, diversos estudios han demostrado que una motilidad intestinal deficiente es uno de los factores que contribuye al desarrollo de sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) y algunos autores han observado la existencia de un tránsito intestinal enlentecido en la cirrosis hepática, en relación con la gravedad de la enfermedad (21-24).

Los objetivos de este estudio han sido, en primer lugar, analizar la flora bacteriana del ciego en ratas cirróticas y su relación con la traslocación bacteriana; en segundo lugar establecer el papel que desempeña el SBI en la traslocación bacteriana; y finalmente, estudiar la motilidad intestinal en relación con estos fenómenos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos estudiado 27 ratas macho Sprague-Dawley con cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl_4) y diez ratas sanas como controles. La cirrosis se ha inducido siguiendo el modelo experimental descrito por Runyon y cols. (25): los animales son mantenidos a temperatura y humedad constantes, con un ciclo de luz-oscuridad de 16/8 horas, y alimentados con pienso estándar; de acuerdo con las indicaciones para la investigación con animales plasmadas en la "Guía para el Cuidado y Uso de

los Animales de Laboratorio". Los animales estuvieron bajo observación diaria. La inducción de la cirrosis comenzó cuando pesaban entre 100 y 150 g, mediante la adición de fenobarbital al agua de bebida a una concentración de 1,5 mmol/L. Cuando las ratas alcanzaron los 200 g de peso se les administró CCl_4 por vía intragástrica, usando una dilución al 50% con aceite de oliva, y mediante canulación esofágica con una aguja especial, sin anestesia. El CCl_4 fue administrado semanalmente partiendo de una dosis de 40 μL que fue aumentándose según el incremento de peso corporal del animal.

Estudio de la traslocación bacteriana y del SBI

Cuando los animales alcanzaron un estado de cirrosis estable (entre 9 y 11 semanas) recogimos las muestras para su procesamiento posterior. Para ello los anestesiábamos con éter etílico (Iqanalítica, Probus S.A. Barcelona). Antes de la laparotomía tomamos una muestra de sangre periférica.

La laparotomía se llevó a cabo bajo condiciones de asepsia tras remover la piel y aplicar localmente una solución antiséptica. A continuación abrimos el peritoneo y exploramos posibles fuentes de infección. Las muestras fueron recogidas en el siguiente orden: sangre portal, nódulos linfáticos mesentéricos de la cavidad ileo-cecal, hígado, y bazo; siempre antes de la muerte del animal. Finalmente, se recogieron muestras de ciego. También se obtuvieron muestras de hígado para análisis histológico.

Inoculamos inmediatamente las muestras de sangre portal y periférica en frascos de hemocultivo (Batec Plus/aerobio) y luego las procesamos en el sistema Bactec 9240 (Beckton-Dickinson, Maryland, EE.UU.). Homogeneizamos las muestras de hígado, bazo, y nódulos linfáticos que fueron colocadas en placas de CNA y agar MacConkey por espacio de 24 horas. Las muestras de ciego fueron homogeneizadas y luego diluidas 10:2, 10:4 y 10:6 previo a su cultivo en placas similares. Identificamos los microorganismos mediante los métodos bacteriológicos convencionales: API 20E (Bio Mérieux S.A. Mercy l'Etoile, France) y MicroScan (Baxter Healthcare, West Sacramento, CA, EE.UU.).

Definimos la existencia de traslocación bacteriana como el hallazgo de cultivo positivo en los GLM y la existencia de SBI cuando el conteo de bacterias en ciego superó la media más dos desviaciones estándar de la población en ratas normales.

Determinación del tránsito intestinal

Una hora antes del estudio de TB administramos a los animales un marcador líquido no absorbible, azul de Evans (50 mg en 1 mL de solución de NaCl al 0,9%), a través de un tubo orogástrico. Tras finalizar el estudio de traslocación evaluamos el intestino delgado en su totali-

dad. Siguiendo un método descrito previamente (26) determinamos la velocidad de tránsito intestinal midiendo la distancia entre el píloro y el sitio más alejado del intestino delgado teñido con azul de Evans.

Análisis estadístico

Expresamos los resultados como medias o proporciones, según lo requerido. El número de colonias se expresan como logaritmo en base 10 de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL de homogeneizado. Expresamos el tránsito intestinal como la distancia medida en centímetros entre el píloro y la zona más distal del intestino teñida con el colorante. Para las comparaciones múltiples hemos usado el test ANOVA y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para las comparaciones entre grupos hemos usado el test de la U de Mann-Whitney y los test de Fisher o Chi cuadrado. Consideramos significativos los valores de p menores de 0,05.

RESULTADOS

Todas las ratas tuvieron cirrosis en el momento del estudio. En cuanto a TB, el 56% de las ratas presentaron cultivos positivos en GLM; ninguna de las ratas controles presentó traslocación ($p < 0,02$). La mayoría de las bacterias aisladas fueron gram-negativas entéricas y el organismo cultivado más frecuentemente fue *E. coli*, que creció en un 66,7% de los cultivos. Encontramos 7 casos de TB polimicrobiana. La población bacteriana total en los GLM de las ratas con traslocación fue de $3,37 \pm 1,24 \log^{10}$ CFU. La tabla I muestra las bacterias aisladas de las muestras de ciego y de nódulos linfáticos mesentéricos.

La población bacteriana total en ciego fue significativamente mayor en las ratas cirróticas ($15,61 \pm 5,36 \log^{10}$ CFU) que en las ratas controles ($7,89 \pm 2,07 \log^{10}$ CFU), $p < 0,01$. Este incremento se debió fundamentalmente a un aumento en la población de *E. coli* ($p < 0,01$) y de *Proteus sp.* ($p < 0,01$) (Tabla II). En 7 ratas cirróticas encontramos *Enterococcus* y en 17 ratas cirróticas *Enterobacter sp.*; no encontramos estos organismos en ratas controles.

Clasificamos las ratas cirróticas de acuerdo a la presencia o ausencia de TB; no detectamos traslocación en 12 animales cirróticos. La figura 1 ilustra el número total de bacterias aerobias en ciego de ambos grupos y el grupo control. Las ratas cirróticas con traslocación presentaron una población bacteriana intestinal más elevada ($17,36 \pm 4,71 \log^{10}$ CFU) que las que no presentaron traslocación ($13,39 \pm 5,52 \log^{10}$ CFU) ($p < 0,05$). Estas últimas a su vez presentaron mayor población que los animales controles ($7,89 \pm 2,07 \log^{10}$ CFU). Estas diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas ($KW = 17,32$; $p < 0,01$).

La prevalencia de SBI en las ratas cirróticas fue de un 67%. En relación a la traslocación, el SBI total fue más

Tabla I. Resultados de los cultivos del contenido cecal y de los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) en los animales cirróticos

Nº de rata	Muestra de ciego	GLN
1	<i>E. coli</i> , EB	<i>E. coli</i>
2	<i>E. coli</i> , EB, PRT	SC
3	<i>E. coli</i> , EB, EC, PRT	EB, EC
4	<i>E. coli</i> , EB, EC, PRT	SC
5	<i>E. coli</i> , EB, EC, PRT	SC
6	<i>E. coli</i> , EB, EC, PRT	EC, PRT
7	<i>E. coli</i> , PT, PS	<i>E. coli</i> , PS, PRT
8	<i>E. coli</i> , PRT, <i>Aerogenes</i>	PRT, <i>Aerogenes</i>
9	<i>E. coli</i> , EC, PS	<i>E. coli</i> , EC
10	<i>E. coli</i> , PRT	<i>E. coli</i>
11	<i>E. coli</i> , EB, EC	SC
12	<i>E. coli</i> , EB, PRT	<i>E. coli</i> , EB
13	<i>E. coli</i> , EB, EC, PRT	EC
14	<i>E. coli</i> , EB, PRT	SC
15	<i>E. coli</i>	SC
16	<i>E. coli</i> , EB, <i>Klebsiella</i>	<i>E. coli</i>
17	<i>E. coli</i> , PRT	<i>E. coli</i> , PRT
18	<i>E. coli</i> , EB	<i>E. coli</i>
19	<i>E. coli</i>	SC
20	<i>E. coli</i> , EB	EB
21	<i>E. coli</i>	SC
22	<i>E. coli</i> , PRT	SC
23	<i>E. coli</i> , EB	SC
24	<i>E. coli</i> , EB, P	<i>E. coli</i>
25	<i>E. coli</i> , <i>Proteus</i>	<i>E. coli</i>
26	<i>E. coli</i> , EB	SC
27	<i>E. coli</i> , EB, PRT	SC

EB: *Enterobacter sp.*; EC: *Enterococci*; PRT: *Proteus sp.*; PS: *Pseudomonas sp.*; SC: sin crecimiento.

Tabla II. Población intestinal de gérmenes aerobios en las muestras cecales (\log^{10} UFC)

	Controls	Cirrhotics	
Total flora	$7,89 \pm 2,07$	$15,61 \pm 5,36$	$p < 0,001$
<i>E. coli</i>	$7,88 \pm 2,07$	$15,02 \pm 5,23$	$p < 0,001$
<i>Enterococci</i>	0	$17,52 \pm 4,89$	
<i>Enterobacter</i>	0	$14,61 \pm 5,76$	
<i>Pseudomonas</i>	0	$18,97 \pm 0,77$	
<i>Proteus</i>	$5,66 \pm 0,93$	$15,33 \pm 4,34$	$p < 0,001$
<i>Klebsiella</i>	0	11,51	

frecuente en las ratas cirróticas con TB que sin ella (93 vs. 33%) ($p < 0,01$) (Fig. 2). Analizamos la relación entre la traslocación de un organismo específico y la presencia de SBI de ese mismo microorganismo (Tabla III). La traslocación de una bacteria específica estuvo casi siempre asociada al SBI de la misma. Esto ocurrió en todos los casos de TB menos en uno (1 caso de traslocación de *Enterococcus* sin sobrecrecimiento de este en ciego, aunque sí presente en cultivo). Por el contrario, el sobrecrecimiento de un organismo específico en ciego no siempre estuvo asociado a la traslocación de este. Cada organismo presentó un rango diferente de traslocación: *E. coli* 56%, *Enterococcus* 50%, *Pseudomonas sp.* 50%, *Proteus sp.* 27%, *Enterobacter sp.* 20%; un animal presentó sobre-

Tabla III. Presencia de traslocación bacteriana de organismos específicos en ratas cirróticas con o sin sobrecrecimiento bacteriano intestinal

	SBI (-)	SBI (+)
Total	1/9	14/18
<i>E. coli</i>	0/9	10/18
<i>Enterococci</i>	1/21	3/6
<i>Enterobacter sp.</i>	0/12	3/15
<i>Pseudomonas sp.</i>	0/25	1/2
<i>Proteus sp.</i>	0/12	4/15
<i>Klebsiella sp.</i>	0/26	0/1
<i>Aerogenes sp.</i>	0/26	1/1

crecimiento intestinal y traslocación a GLM de *Aerogenes sp.* (Tabla III).

Con respecto al estudio del tránsito intestinal, los animales cirróticos presentaron un tránsito intestinal más lento ($60,5 \pm 12,7$ cm) que el observado en los animales control ($81,2 \pm 5,7$ cm) ($p < 0,05$) (Fig. 3). No fue posible establecer una relación significativa entre la existencia de un tránsito intestinal prolongado y el desarrollo de traslocación bacteriana.

DISCUSIÓN

La traslocación bacteriana intestinal se ha postulado como el principal mecanismo patogénico en los casos de infecciones debidas a bacterias gram-negativas entéricas (1,27). Dado que este tipo de infecciones son muy frecuentes en la cirrosis hepática, se piensa que la TB también juega un papel muy importante en esta situación, concretamente favoreciendo la aparición de bacteriemias y de peritonitis bacteriana espontánea (28-32).

Nuestro estudio confirma la alta prevalencia de TB, al menos en la cirrosis experimental, incluso en las primeras fases de la enfermedad, en las que no ha aparecido todavía ascitis. En estudios previos el desarrollo de la TB se ha relacionado fundamentalmente con la aparición de ascitis e incluso en el trabajo de García-Tsao sólo los animales cirróticos con ascitis presentaron TB (4-6). Nuestros datos sugieren que la ascitis no es imprescindible para la aparición de TB y que deben existir otros factores que promueven su aparición diferentes de la misma. Entre los factores que han sido implicados en la existencia de una mayor predisposición a la aparición de TB se encuentran las disfunciones o anomalías en la barrera mucosa intestinal, la malnutrición, la presencia de alteraciones inmunológicas y el sobrecrecimiento bacteriano intestinal, todas ellas descritas en casos de cirrosis hepática (4,33-39).

En nuestro modelo las ratas cirróticas tuvieron una población bacteriana cecal significativamente mayor que los animales controles, fundamentalmente a expensas de un incremento en la flora gram-negativa (*E. coli*

y *Proteus*). Este aumento en la población bacteriana condujo a la aparición de sobrecrecimiento en el 67% de los animales cirróticos, hallazgos que confirman los descritos por otros autores (39,40). Hay que señalar que son precisamente estas bacterias gram-negativas las que se han asociado con mayor frecuencia con el fenómeno de traslocación (7,10,30,39). De hecho, en nuestro estudio hemos observado que la población bacteriana intestinal de los animales cirróticos era mayor en los que presentaban TB que en los que no. Igualmente, las ratas cirróticas con criterios de SBI tuvieron una mayor prevalencia de TB que las ratas sin sobrecrecimiento. Esta relación entre el SBI y la existencia de TB y la aparición de complicaciones infecciosas, ha sido valorada previamente tanto a nivel experimental como en estudios en humanos. En animales cirróticos y también en los no cirróticos se ha observado que la existencia de SBI se correlaciona con la aparición de TB y en casos de cirrosis con el desarrollo de PBE (6,7,41). Nuestros resultados confirman el probable papel del sobrecrecimiento bacteriano como factor promotor de la traslocación, en la cirrosis hepática y posiblemente favoreciendo la aparición de PBE. De hecho, nuestro mismo grupo ha observado que en pacientes cirróticos la existencia de SBI se relaciona con una mayor prevalencia de PBE durante la hospitalización, con respecto a los pacientes cirróticos sin sobrecrecimiento (13). Por tanto, todos estos datos sugieren que en la cirrosis hepática el SBI es un factor promotor de la TB y posteriormente del desarrollo de complicaciones infecciosas como la PBE.

Un dato interesante de nuestro estudio es que si bien la traslocación de un germen específico se asocia a su sobrecrecimiento a nivel cecal, no todos los animales con sobrecrecimiento presentaron traslocación. Este dato sugiere que el sobrecrecimiento intestinal de cada bacteria es un factor necesario pero no suficiente, para su traslocación y que por tanto existen otros factores involucrados en la misma. Uno de estos factores probablemente está en relación con la propia virulencia del germen. Se sabe que existen bacterias que tienen una mayor facilidad y predisposición para traslocar, debido a diferencias en su capacidad de penetrar el epitelio intestinal (42-44). En nuestro trabajo hemos observado que los organismos que traslocaron con más frecuencia fueron *E. coli* y *Enterococci*, resultados que están en consonancia con lo descrito en la literatura.

Es conocido que la flora intestinal está controlada por diferentes mecanismos fisiológicos como la motilidad gastrointestinal, el ácido gástrico y las interacciones bacterianas (36,42,45-47) que tratan de impedir su sobrecrecimiento. En la cirrosis hepática se ha descrito que varios de estos mecanismos pueden estar alterados y así se ha observado por ejemplo la existencia de hipoclorhidria (15) y enlentecimiento del tránsito intestinal (47-51). Esta hipomotilidad a su vez se ha puesto en relación con el desarrollo de SBI en pacientes con hepatopatías (23,51) y se ha asociado a una mayor incidencia de PBE (24). La pro-

bable implicación de este trastorno de la motilidad intestinal en la patogenia del SBI y la traslocación bacteriana está avalada por los hallazgos de diferentes estudios en los que se ha observado que la administración de fármacos procinéticos provoca una disminución en ambos fenómenos (52-54). En nuestro estudio hemos observado también un tránsito intestinal más lento en los animales cirróticos que en los controles, aunque no hemos podido establecer una correlación significativa con la traslocación bacteriana. Probablemente una de las causas de esta falta de correlación se deba al método indirecto utilizado para medir el tiempo de tránsito intestinal, que no permite una valoración detallada del mismo, comparado con

métodos mucho más exactos y sensibles utilizados en otros estudios (55,56).

Todos estos datos sugieren que en la cirrosis hepática el sobrecrecimiento bacteriano intestinal aparece de forma frecuente y precoz, incluso antes del desarrollo de ascitis y que es un factor promotor de la traslocación bacteriana. Además, para que un determinado germen trasloque, su sobrecrecimiento es una condición necesaria aunque no suficiente. Por último, la cirrosis se asocia con frecuencia a un tránsito intestinal enlentecido, lo que probablemente es un factor favorecedor de la aparición del sobrecrecimiento bacteriano intestinal y por tanto de traslocación.