

Evidencia de translocación bacteriana en un modelo experimental de politraumatismo

P. Rebasa, H. Vallverdú, J.L. López Negre, S. Navarro y X. Rius

Departamento de Cirugía. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma. Barcelona.

Resumen

Objetivo. Analizar la relación entre el politraumatismo y la translocación bacteriana en un modelo experimental.

Material y métodos. Se ha utilizado 132 ratones Balb/c de 8 a 12 semanas de vida, siendo traumatizados mediante el Aparato Generador de Politraumatismo, con una mortalidad prevista del 20%. Se ha determinado la translocación bacteriana a las 0, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h tras la agresión. Se ha analizado mediante test exacto de Fisher.

Resultados. La translocación global en el grupo control fue del 14,3%; la translocación en el grupo politraumatizado fue del 70% ($p < 0,00001$). Con un intervalo de confianza del 95%, el número de colonias por gramo de ganglio linfático fue de 1 a 3,6 en el grupo control y entre 20,7 y 127,7 en el grupo traumatizado. Las diferencias entre el grupo control y el traumatizado a los intervalos de tiempo descritos son significativas a las 8 h ($p = 0,01$), 12 h ($p = 0,041$), 24 h ($p = 0,041$) y a las 72 h ($p = 0,041$), según test exacto de Fisher.

Conclusión. Existe una translocación bacteriana precoz tras un politraumatismo experimental. Creemos que esta translocación puede actuar como un importante activador del fallo multiorgánico tras el politraumatismo.

Palabras clave:

(Cir Esp 2001; 69: 353-357)

FEVIDENCE OF BACTERIAL TRANSLOCATION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF MULTIPLE TRAUMA

Introduction. To analyze the relationship between multiple trauma and bacterial translocation in an experimental model.

Material and methods. Injuries were induced in 132 Balb/c rats, aged 8-12 weeks, using a multiple trauma generator. Expected mortality was 20%. Bacterial translocation was determined at 0, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours following trauma. Fisher's exact test was used in the statistical analysis.

Results. Overall translocation in the control group was 14.3%. Translocation in the group with multiple injuries was 70% ($p < 0.00001$). With a 95% CI of 95%, the number of colonies per gram of lymph node was from 1 to 3.6 in the control group and from 20.7 to 127.7 in the injured group. The differences between the control and injured animals at the time intervals described were significant at 8 hours ($p = 0.01$), 12 hours ($p = 0.041$), 24 hours ($p = 0.041$) and 72 hours ($p = 0.041$; Fisher's exact test).

Conclusion. Bacterial translocation occurs early after experimental multiple trauma. We believe that this translocation may be a significant trigger of multiple organ failure after trauma.

Key words:

Introducción

El fallo multiorgánico constituye actualmente la principal causa de muerte del paciente politraumatizado una vez transcurridas las primeras 24 h tras la agresión. Desde los años ochenta se ha investigado intensamente su fisiopatología, aceptándose hoy día que es la expresión final de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que se ha exacerbado hasta extremos nocivos.

Desde la descripción por Jacob Fine en las décadas de los años cincuenta-sesenta del papel de la translocación bacteriana en el shock que se produce tras un traumatismo, se ha desarrollado una ingente cantidad de estudios que han acabado conclu-

yendo el papel primordial que ejerce el intestino tanto en el desencadenamiento como en la progresión del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) hasta el fallo multiorgánico (FMO), así como la definición de translocación bacteriana como el paso de bacterias intestinales y sus productos a través de una barrera intestinal anatómicamente intacta.

En el presente trabajo pretendemos analizar la relación entre el politraumatismo y la translocación bacteriana basándonos en un modelo experimental¹⁻³.

Material y métodos

Animales de experimentación

Se han utilizado ratones Balb/c machos de 8 a 12 semanas de vida, de pesos entre 20 y 32 g según el diseño experimental.

Correspondencia: Dr. P. Rebasa.

Bartomeu Serret Argemí, 35. 08400 Granollers. Barcelona.

Aceptado para su publicación en noviembre del 2000.

TABLA 1. Animales, pesos y mortalidad

	Número de animales	Peso inicial (g)	Energía (J)	Mortalidad
Control 0 h (C0)	8	29,9 ± 2,7		0% (0/8)
Trauma 0 h (T0)	8	26,5 ± 2,3	29,5 ± 2,5	0% (0/8)
Control 4 h (C4)	8	26,0 ± 2,7		0% (0/8)
Trauma 4 h (T4)	8	26,3 ± 2,2	29,3 ± 2,4	0% (0/8)
Control 8 h (C8)	8	26,3 ± 1,9		0% (0/8)
Trauma 8 h (T8)	10	26,2 ± 3,4	29,1 ± 3,8	20% (2/10)
Control 12 h (C12)	8	26,4 ± 2,4		0% (0/8)
Trauma 12 h (T12)	9	26,7 ± 2,0	29,7 ± 2,2	11% (1/9)
Control 24 h (C24)	8	27,0 ± 1,8		0% (0/8)
Trauma 24 h (T24)	11	26,7 ± 2,5	29,7 ± 2,8	27% (3/11)
Control 48 h (C48)	8	27,8 ± 1,8		0% (0/8)
Trauma 48 h (T48)	17	26,5 ± 3,1	29,5 ± 3,4	29% (5/17)
Control 72 h (C72)	8	27,5 ± 2,1		0% (0/8)
Trauma 72 h (T72)	13	26,7 ± 2,8	29,7 ± 3,1	38% (5/13)

Los animales fueron mantenidos según normas dictadas por la CEE en la directiva del Consejo del 24 de noviembre de 1986 respecto a la protección de animales utilizados para la experimentación y otros objetivos científicos (Diario Oficial de las Comunidades Europeas 18/12/1986 n.º L358/1 a n.º L358/28). En su manipulación, se han seguido las normas sobre manejo de animales de laboratorio recogidas en la directiva 86/609/CEE. El método experimental de politraumatismo ha sido aprobado por la Direcció General de Producció i Indústries Agroalimentàries (Generalitat de Catalunya, Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca, Servei de Ramaderia) con autorización del día 25/7/1994 n.º 5367, según normas dictadas por el Reial Decret 223/1988 de 14 de marzo.

Se precisaron 132 animales, 76 traumatizados y 56 controles. Los animales traumatizados tuvieron una mortalidad del 21% (16 ratones; IC del 95%, 12,5-31,9), quedando 60 animales válidos en este grupo. La distribución de los animales por grupos, sus pesos iniciales, la energía final recibida y la mortalidad en cada grupo se detallan en la tabla 1.

Alimentación

Los animales siguieron alimentación oral, equilibrada en todos los principios inmediatos (Panlab® tipo VAR-A-04). El acceso a la comida y al agua fue libre en todo momento. Se calcula en unas 4 a 6 h el tiempo tras la anestesia en que los animales son capaces de nuevo de alimentarse por sí mismos si no son traumatizados, y alrededor de 12 h tras un traumatismo.

Anestesia

Se usó tiopental sódico a dosis de 60 mg/kg de peso, por vía intraperitoneal. La anestesia completa se consigue entre 6 y 10 min después de la administración del fármaco y se valora como efectiva al observarse la pérdida del reflejo que permite la recuperación espontánea de la posición de decúbito prono por parte del animal.

Generación del politraumatismo

Se introduce a los animales por parejas dentro del AGP a 45 rpm, según la técnica descrita anteriormente¹⁻³, previa anestesia general, y se someten a un traumatismo de 270 giros (6 min), aproximadamente unos 30 J de energía final (considerado

un trauma leve-moderado) y con una mortalidad prevista del 20%. Después del trauma son devueltos a sus jaulas con acceso libre a la comida y la bebida. No fueron sometidos a ayuno previo. En total se usaron 132 animales, 76 traumatizados y 56 como controles. La distribución inicial de los animales tenía como objeto conseguir grupos homogéneos de ocho; no se incluyeron aquellos que fallecieron por causas secundarias al traumatismo.

Determinación de la translocación bacteriana

La obtención de muestras se realizó con la ayuda de un microscopio óptico marca Topcon, modelo OMS 100 (Kogaku Kikui, Japón), realizándose todo el procedimiento quirúrgico a 4 aumentos. En todo momento se ha trabajado en condiciones de esterilidad y asepsia.

Al final del tiempo de experimentación, y bajo anestesia general, se efectuó la punción de sangre cardíaca y la extracción en condiciones de esterilidad, por este orden, del hígado, el bazo, el pulmón derecho y los ganglios linfáticos mesentéricos. El procesamiento de los cultivos se realizaba inmediatamente después de la extracción de las muestras.

Una vez obtenidas las muestras para cultivo, se introducían en bolsas estériles especiales para su posterior homogeneizado en Stomacher® (Seward Medical, Londres, Reino Unido). Se diluía a diferentes concentraciones de caldo de tripticasa antes de ser homogeneizadas a alta intensidad durante 8 min en el homogeneizador de paletas Stomacher 80® (Seward Medical, Londres, Reino Unido).

Una vez homogeneizada la muestra, se cultivaron 100, 500 y 1000 µl de la misma en 3 placas de agar-sangre, en condiciones aeróbicas a 37 °C y durante 48 h. Se realizó tinción de Gram en todas las muestras positivas. Se calculó el número de colonias por gramo de tejido, realizándose un promedio ponderado del resultado de las tres placas de cultivo obtenidas.

Estadística

Los datos de los cultivos bacterianos se analizaron como variable cuantitativa, transformando los valores obtenidos en su logaritmo neperiano para disminuir la variabilidad e intentar linealizar la variable. Se efectuaron los tests de Kolmogorov y de Shapiro-Wilks para asegurar que seguían una distribución normal. Si no se cumplía este supuesto, se empleó el test no para-

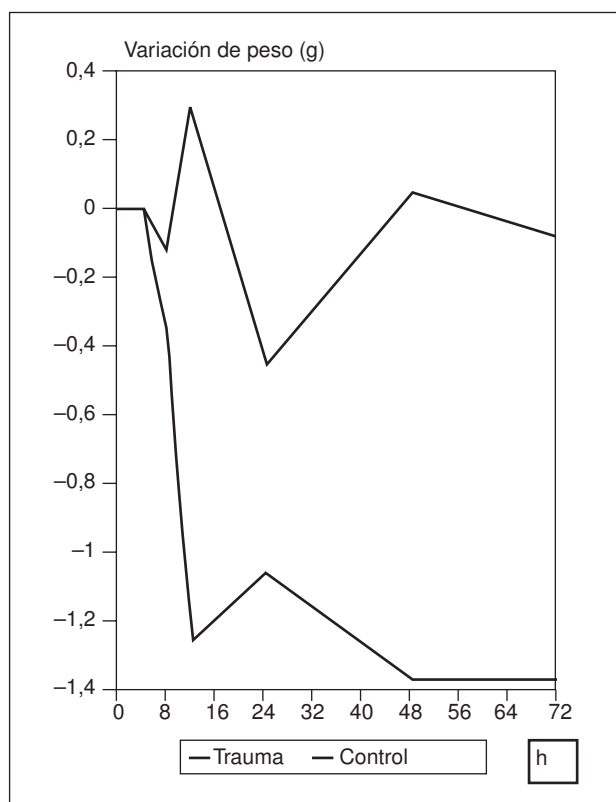


Fig. 1. Evolución del peso en el grupo control frente al grupo de animales traumatizados.

métrico de la U de Mann-Whitney para comparar grupos entre sí. La translocación bacteriana se consideró variable dicotómica y como tal fue analizada con χ^2 o test exactos de Fisher si no se cumplían las condiciones de aplicación.

Resultados

La mortalidad del politraumatismo fue de un 21% (IC del 95%: 12,5-31,9) distribuida por grupos como se refleja en la tabla 1.

Se observó una caída del peso de los animales traumatizados, que ya queda manifiesta a partir de las 8 h. La figura 1 recoge la comparación en la evolución de los pesos de los grupos controles respecto a los grupos traumatizados. En lo que respecta a los grupos control, las diferencias de peso finales cuando se comparan con las iniciales son sólo significativas a las 8 h ($p < 0,001$; t de Student) y a las 24 h ($p = 0,028$; t de Student). En cuanto a los grupos traumatizados, las diferencias son significativas en todos los casos a partir de las 8 h con $p = 0,004$ (8 h), $p = 0,002$ (12 h), $p = 0,003$ (24 h), $p < 0,001$ (48 h) y $p = 0,019$ (72 h; t de Student en todos los casos).

En el grupo control la tasa de translocación es del 14,3% (8 de 56), mientras que en los grupos traumáticos es del 70% (42 de 60). Esta diferencia es significativa con un valor de $p < 0,00001$ (χ^2). El número de colonias por gramo de ganglio linfático tras un traumatismo oscila entre 20,7 y 127,7, mientras que para el grupo control es de 1 a 3,6 (IC del 95% en ambos grupos), diferencia estadísticamente significativa.

La translocación bacteriana fue analizada comparando los grupos control y traumático para cada período de tiempo. Estos resultados quedan reflejados en la figura 2, donde se recoge el porcentaje de translocación en cada período de tiempo. Se puede observar que esta tasa para los controles se mantiene constante entre el 14 y el 28%. Para los grupos traumáticos se observan variaciones entre el 50 y el 87,5%. Hay diferencias significativas entre el grupo control y el traumático a las 8 h ($p = 0,010$), 12 h ($p = 0,041$), 24 h ($p = 0,041$) y a las 72 h ($p = 0,041$), según el test exacto de Fisher para ambos extremos en todos los cálculos, después de la anestesia o el traumatismo según el grupo (marcadas en la gráfica con el signo #). A las 0 y 4 h se obtuvo un valor de p de 0,12 y a las 48 h de 0,16 (test exacto de Fisher para ambos extremos en ambos casos).

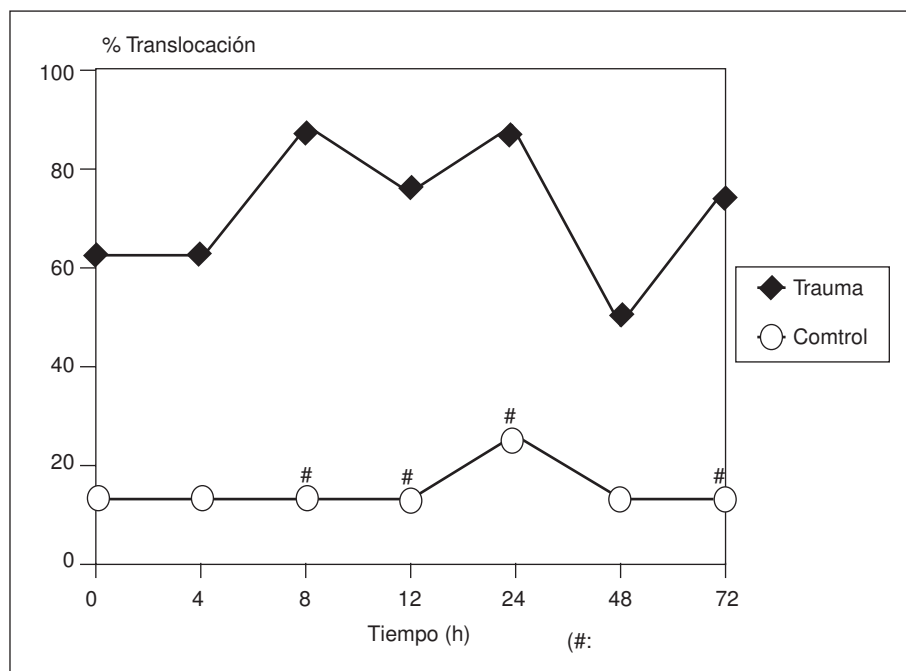


Fig. 2. Comparativa de la translocación.

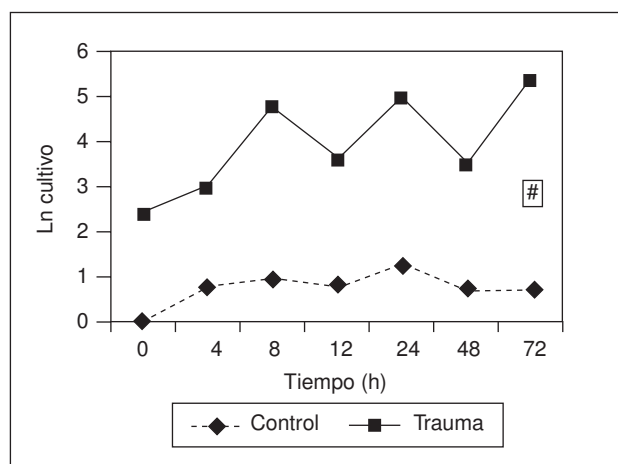


Fig. 3. Colonias por gramo de tejido en función del tiempo.

El patrón de translocación por órganos concuerda con el origen intestinal de las bacterias. En 24 de los 50 animales que presentaron translocación, ésta se limitó a los ganglios linfáticos mesentéricos. Este modelo representa el 48% de los animales translocados. El siguiente modelo en frecuencia es el cultivo positivo en los ganglios linfáticos, el hígado y el pulmón obtenido en 8 animales (16%). Sigue el modelo en que los animales tienen cultivos positivos en los ganglios linfáticos mesentéricos y el pulmón únicamente (7 animales, 14%). Con menores frecuencias se obtienen cultivos positivos en el pulmón exclusivamente (5 animales, 10%); los ganglios, el pulmón, el hígado y el bazo (3 animales, 6%); finalmente, con un animal en cada caso, el cultivo de pulmón y el hígado, los ganglios y el hígado, e hígado aislado (2% en cada caso).

El patrón típico de translocación en los animales control es obtener el cultivo positivo únicamente en los ganglios linfáticos mesentéricos; este modelo se obtuvo en 7 de los 8 animales que presentaron translocación en los grupos control. En el otro animal, considerado como translocación positiva, se cultivó únicamente el pulmón (grupo C0). En el caso de los animales traumatizados, el modelo predominante es también el de cultivo aislado de los ganglios (de hecho, es el más frecuente), con 17 animales de los 42 posibles.

El número de colonias por gramo de ganglio linfático presenta diferencias significativas a las 8 h ($p = 0,035$), 24 h ($p = 0,012$) y 72 h ($p = 0,007$), según el test de Mann-Whitney en todos los casos (fig. 3). A las 0 h, se obtuvo un valor de p de 0,2; a las 4 h de 0,179, a las 12 h de 0,128, y a las 48 h era de 0,08. Sin embargo, aunque la estadística no dé significación a los intervalos citados, la observación de la gráfica evidenció una tendencia clara.

No hay un germen predominante en los cultivos. En general, se obtienen bacterias de origen intestinal, entre las que predominan sobre todo los bacilos gramnegativos de tipo no fermentador (80% de los cultivos positivos). Los siguientes más frecuentes son bacilos grampositivos del tipo *Corynebacteria* (55% de los cultivos positivos), y ya con menor frecuencia se obtienen cocos grampositivos de tipo *Streptococcus* y *Staphylococcus* (30% de los cultivos positivos). Lo más frecuente es que los cultivos sean multibacterianos (83%), y si se encontraba un cultivo monobacteriano era de bacilos gramnegativos (17%).

Discusión

Con el reconocimiento de que el FMO es un proceso sistémico con alteraciones fisiológicas similares a las de la sepsis, se ha propuesto la idea de que es el resultado y la expresión de un foco séptico oculto. Sin embargo, en un 30% de los casos de pacientes que murieron por FMO, y con cultivos positivos en sangre, no se encontró el origen de la sepsis⁴. Estas observaciones clínicas y un gran número de estudios experimentales indican que el intestino puede ser el reservorio de la bacteriemia sistémica, la endotoxemia o ambas, que se evidencian en enfermos críticos, y es lo que ha motivado a algunos autores a llamar al intestino el "motor del FMO"⁵; de hecho, algunos autores afirman que el tracto gastrointestinal ejerce un papel preponderante en la patogenia del FMO tras una agresión⁶. Sin embargo, y a pesar de la extensa investigación en este sentido, todavía no hay estudios clínicos o experimentales que demuestren de una manera irrefutable esta hipótesis.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido intentar determinar mediante un modelo experimental si existe translocación bacteriana asociada a un politraumatismo. Hemos demostrado claramente que tras el politraumatismo existe una translocación bacteriana que oscila entre el 60 y el 90% de los animales, incluso en traumatismos moderados. La activación de la cascada inflamatoria se desencadena independientemente de la especie translocada, motivo por el cual no hemos insistido en la determinación concreta de la especie cultivada, limitándonos a su clasificación según su tinción de Gram. De hecho, en la mayoría de los trabajos publicados en los últimos 3 años la translocación se convierte en una variable cualitativa dicotómica de tipo "sí/no"; algún autor incluso afirma taxativamente que la especie translocada es lo de menos⁷. En cualquier caso, la activación del sistema inflamatorio viene determinada por el simple contacto con un germen exógeno, sea éste cual sea. Experimentos preliminares nos demostraron que la flora que obteníamos en la translocación era similar a la de la bibliografía consultada.

El hallazgo más llamativo es la precocidad de la translocación bacteriana tras el traumatismo. En el tiempo 0, que en la práctica oscilaba entre 20 y 30 min, un 62,5% de los animales traumatizados presentaban cultivos positivos, la mayor parte en los ganglios linfáticos. Uno de los pocos trabajos en la bibliografía diseñados para determinar la secuencia de acontecimientos y el momento de su aparición en un modelo de shock hemorrágico es el de Jiang et al⁸, donde también demuestran una translocación precoz, que ellos sitúan a los 30 min de la hipotensión. Al igual que nuestros hallazgos macroscópicos, en el trabajo de Jiang et al los tramos de intestino más dañados parecen ser yeyuno e íleon, hecho que concuerda con otros estudios donde demuestran que los lugares de más translocación y menor capacidad defensiva del organismo se sitúan en los primeros tramos del tracto intestinal⁹. Modelos de quemaduras también han conseguido demostrar una translocación a las 2 h de la agresión térmica¹⁰.

Nos sorprende que en el tiempo 0 del estudio (aproximadamente unos 30 min reales) ya obtengamos cultivos positivos en el pulmón y el hígado, lo cual demuestra que no sólo la translocación es un hecho precoz tras la agresión, sino que la diseminación bacteriana hacia el torrente linfático y sanguíneo es también muy precoz. Algunos autores, como Redan¹¹, demostraron en su trabajo que es posible esta detección tan precoz en el pulmón y el hígado. Que no se obtengan cifras significativas

estadísticamente en los tiempos 4 y 48 en lo que respecta a la translocación global y en los tiempos 4, 12 y 48 en el cultivo de ganglios linfáticos no se debe a que no exista una diferencia clara, sino al sesgo que se produce al no analizar el 20% de animales que no sobreviven. Creemos que dichos animales presentarían una clara translocación bacteriana si pudieran ser analizados adecuadamente.

Queda por esclarecer la significación clínica de la translocación que hemos detectado, y desde luego, si este resultado es extrapolable a humanos. El hecho es que existe un consenso en que la translocación bacteriana conlleva una activación del sistema inflamatorio y éste puede desencadenar el FMO^{2,12}, hecho que confirmamos con nuestra experiencia.

Bibliografía

1. López Negre JL. Politraumatismo experimental. Metabolismo de los lípidos e hígado graso [tesis doctoral]. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, 1994.
2. Rebasa, P. Utilidad de *Insulin-like growth factor-I* y hormona del crecimiento en el tratamiento del fallo multiorgánico secundario a un politraumatismo experimental [tesis doctoral]. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, 1997.
3. Rebasa P, López Negre JL, Vallverdú H, Rius X. Un nuevo modelo de politraumatismo experimental. *Cir Esp* 1998; 64: 511-515.
4. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR. Gram-negative bacteremia. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980; 68: 332-343.
5. Meakins JL, Marshall JC. The gastrointestinal tract: the "motor" of multiple organ failure. *Arch Surg* 1986; 121: 197-201.
6. Fink MP. Effect of critical illness on microbial translocation and gastrointestinal mucosa permeability. *Semin Respir Infect* 1994; 9: 256-260.
7. Helton WS, Rockwell M, García RM, Maier RV, Heitkemper M. TPN-induced sympathetic activation is related to diet, bacterial translocation, and an intravenous line. *Arch Surg* 1995; 130: 209-214.
8. Jiang J, Bahrami S, Leichtfried G, Redl H, Ohlinger W, Schlag G. Kinetics of endotoxin and tumor necrosis factor appearance in portal and systemic circulation after hemorrhagic shock in rats. *Ann Surg* 1995; 221: 100-106.
9. Fukushima R, Gianotti L, Alexander JW. The primary site of bacterial translocation. *Arch Surg* 1994; 129: 53-58.
10. Fukushima R, Alexander JW, Wu JZ, Mao JX, Szczur K, Stephens AM et al. Time course of production of cytokines and prostaglandin E2 by macrophages isolated after thermal injury and bacterial translocation. *Circ Shock* 1994; 42: 154-162.
11. Redan JA, Rush BF, Lysz TW, Smith S, Machiedo GW. Organ distribution of gut derived bacteria caused by bowel manipulation or ischemia. *Am J Surg* 1990; 159: 85-90.
12. Lemaire LCJM, Lanschot JJB, Stoutenbeek CP, Deventer SJH, Wells CL, Goema DJ. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg* 1997; 84: 1340-1350.