

# Probióticos y enfermedad inflamatoria intestinal

N. Borrue, F. Casellas y F. Guarner

Unitat de Recerca de l'Aparell Digestiu. Hospital General Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

## INTRODUCCIÓN

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades del tracto gastrointestinal de carácter inflamatorio crónico y cuya etiología es desconocida. Por el momento, aunque se conocen diferentes mecanismos implicados en la patogenia de las lesiones, no existe un único agente o alteración celular o molecular que pueda explicar todos los aspectos de la enfermedad inflamatoria intestinal.

## BACTERIAS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Teniendo en cuenta que el intestino es el órgano más directamente expuesto a la acción de los múltiples microorganismos que componen la flora bacteriana, no es extraño que buena parte de la investigación sobre la etiología de estas enfermedades se haya centrado en la influencia de las bacterias en la iniciación y perpetuación del proceso inflamatorio. El concepto de que el contenido intestinal contribuye a la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal se apoya en algunos estudios realizados en pacientes con enfermedad de Crohn sometidos a una resección ileal y anastomosis ileocolónica. La ausencia de contacto de la mucosa con el contenido intestinal mediante una ileostomía previene la recurrencia que reaparece cuando el tránsito intestinal se restablece<sup>1,2</sup>. Estas observaciones plantean diversas cuestiones aún por resolver: ¿existe un agente infeccioso específico responsable de la enfermedad inflamatoria intestinal?, ¿tiene la enfermedad inflamatoria su origen en un defecto primario del sistema inmunitario que condiciona una respuesta exagerada frente a una flora intestinal no patógena (falta de tolerancia inmunológica)?, ¿sería posible alterar el curso natural de

la enfermedad modificando la flora intestinal mediante antibióticos o probióticos? Esta revisión se propone reunir la información científica, clínica o experimental, que permita abordar estas tres cuestiones.

## AGENTES INFECTIOSOS ESPECÍFICOS

Aunque los métodos tradicionales no han sido capaces de demostrar un patógeno específico causante de la enfermedad inflamatoria intestinal, los nuevos métodos de biología molecular actualmente disponibles han propiciado nuevas posibilidades de estudio, ya que la etiología infecciosa de la enfermedad inflamatoria intestinal todavía es una opción plausible<sup>3</sup>.

Durante la década de los ochenta y principios de los noventa se postuló la posible relación de la enfermedad de Crohn con la infección por micobacterias a raíz del descubrimiento de un microorganismo no clasificado pero relacionado con *Mycobacterium paratuberculosis* en pacientes con esta enfermedad<sup>4</sup>. Sin embargo, los resultados de las investigaciones posteriores han sido muy contradictorios y poco concluyentes. Algunos estudios demostraron la presencia en suero de pacientes con enfermedad de Crohn de títulos elevados de anticuerpos contra *M. paratuberculosis*<sup>5</sup>, pero este dato no ha podido ser confirmado en estudios posteriores<sup>6</sup>. La detección de *M. paratuberculosis* en los tejidos de pacientes también ha sido complicada y poco orientativa tanto por técnicas de inmunohistoquímica<sup>7</sup> como mediante el análisis del ADN del microorganismo<sup>8</sup>. Por otra parte, los resultados de los estudios clínicos realizados con fármacos antituberculosos han sido contradictorios<sup>9,10</sup>.

*Escherichia coli* es la especie bacteriana aeróbica gramnegativa más abundante en la flora intestinal normal en el ser humano; por este motivo, diversos estudios han valorado su papel en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. Hace más de 20 años se demostró un aumento de los títulos de anticuerpos anti-*E. coli* en pacientes con enfermedad de Crohn<sup>11</sup>. Más recientemente, un grupo de investigadores franceses demostró que *E. coli* se encuentra en el 65-100% de las lesiones ileales de pacientes con enfermedad de Crohn y que, además, constituye la flora pre-

Correspondencia: Dra. N. Borrue Saiz. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Vall d'Hebron. Paseig Vall d'Hebron, 119. 08035 Barcelona. Correo electrónico: borrue@hg.vhebron.es

Recibido el 1-3-2002; aceptado para su publicación el 5-3-2002.

dominante (50-100% del número total de aerobios y anaerobios)<sup>12</sup>. El mismo grupo de investigadores, en un estudio posterior, ha intentado determinar si la enfermedad de Crohn se asocia a la presencia de una cepa específica de *E. coli*. Los resultados obtenidos mediante estudios de biología molecular en tejidos afectados por la enfermedad de Crohn sugieren que, aunque no se puede aislar una única cepa de *E. coli*, algunos genotipos específicos aparecen con más frecuencia. Además, la mayoría de ellos posee capacidad de adherencia al epitelio, lo que les confiere capacidad de colonizarlo y, por tanto, de ser virulentos<sup>13</sup>.

Otro de los agentes infecciosos relacionados con la enfermedad inflamatoria intestinal, que ha suscitado diversos estudios, es el virus del sarampión. Wakefield et al demostraron que en piezas de resección intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn existían lesiones vasculares causadas por una vasculitis granulomatosa<sup>14,15</sup>. En el estudio por microscopía electrónica de estas lesiones se evidenciaron partículas compatibles con la presencia del virus del sarampión. Además, parece que la exposición perinatal al virus del sarampión aumenta el riesgo de padecer una enfermedad de Crohn y que la vacunación aumenta el riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria intestinal<sup>16,17</sup>. Sin embargo, aunque parece claro que en la enfermedad de Crohn existe un componente de afección vascular, es difícil probar que esté exclusivamente inducido mediante la infección por el virus del sarampión.

La implicación de otras bacterias como *Salmonella*, *Yersinia*, *Clostridium difficile*, etc., también ha sido investigada pero, probablemente, estas bacterias están más relacionadas con las exacerbaciones de la enfermedad que con el propio mecanismo etiopatogénico subyacente<sup>18</sup>.

En un estudio reciente<sup>19</sup>, utilizando cultivos convencionales y nuevas técnicas de biología molecular, se ha investigado la flora asociada a la mucosa en biopsias de 305 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y en 40 controles. En los pacientes con enfermedad inflamatoria, especialmente con enfermedad de Crohn, se encontraron altas concentraciones de bacterias de origen fecal adheridas a la mucosa. Curiosamente, las concentraciones eran más altas en las zonas no inflamadas que en las inflamadas y no se evidenció una translocación en la lámina propia o en los macrófagos. Cuando las concentraciones de bacterias superaban un determinado valor, se podían observar por microscopía electrónica inclusiones bacterianas en enterocitos localizados cerca de la lámina propia (no superficiales). Sin embargo, no se pudo encontrar diferencias entre el grupo control y el grupo con enfermedad inflamatoria intestinal en lo que se refiere a las distintas especies aisladas, la mayoría de ellas del género *Bacteroides* entre las anaerobias o *E. coli* entre las aerobias. Los resultados de este estudio contradicen la hipótesis de un único microorganismo como agente etiológico de la enfermedad inflamatoria intestinal, siendo más probable la existencia de una respuesta inmunológica anormal en el huésped, quizás determinada por algún defecto genético, que originaría una alteración global en la interacción huésped-bacteria<sup>20</sup>.

## FALTA DE TOLERANCIA A LA FLORA

La tolerancia de la mucosa intestinal puede definirse como un proceso activo por el cual una respuesta inmunitaria potencialmente agresiva es suprimida al reconocer como no patógeno a un determinado componente del tracto intestinal. El intestino está en contacto permanente con bacterias de la flora intestinal normal, proteínas y antígenos de origen alimentario o productos bacterianos potencialmente patógenos, y tiene que discriminar y ejecutar una acción selectiva contra unos y otros.

La posibilidad de que sean los componentes de la flora intestinal normal los que inicien o perpetúen la enfermedad inflamatoria intestinal ha sido ampliamente estudiada. Los resultados experimentales obtenidos en modelos animales de inflamación intestinal demuestran que las bacterias de la luz intestinal están relacionadas con los mecanismos de inflamación intestinal. Nuestro grupo de investigación observó en un modelo animal que los antibióticos de amplio espectro que alcanzan concentraciones adecuadas en la luz intestinal consiguen un efecto antiinflamatorio. En cambio, los mismos antibióticos administrados por vía parenteral carecían de efecto antiinflamatorio o terapéutico<sup>21</sup>. Además, comprobamos que los elementos vivos de la flora, más que los antígenos de origen alimentario o la endotoxina bacteriana, estimulan la actividad inflamatoria de la mucosa intestinal lesionada<sup>22</sup>. Algunos géneros predominantes como *Bacteroides* contribuyen particularmente a la formación de lesiones mucosas profundas y crónicas<sup>23</sup>. Además, las lesiones contaminadas con ciertas especies de anaerobios evolucionan fácilmente a fibrosis intestinal<sup>24</sup>. Por el contrario, otros elementos de la flora, como *Lactobacillus*, no contaminan las lesiones de la mucosa ni tampoco inducen inflamación en la pared intestinal<sup>24</sup>. En un modelo animal en ratones se observó que éstos perdían la tolerancia a la flora autóloga mientras persistía la colitis<sup>25</sup>. Sin embargo, la tolerancia se restablecía cuando los ratones eran tratados con IL-10 o anticuerpos anti-IL-12<sup>26</sup>. Además, los ratones deficientes selectivamente en IL-10 o IL-2 (citocinas antiinflamatorias y promovedoras de tolerancia), sanos en condiciones *germ-free*, desarrollan una colitis espontáneamente cuando son colonizados con bacterias<sup>27,28</sup>.

La flora intestinal no es parte del huésped y, por tanto, la tolerancia inmunológica previene una respuesta inmunitaria contra las «bacterias propias», que en caso de producirse conduciría a una situación de inflamación crónica<sup>29</sup>. Duchmann et al<sup>30</sup> demostraron que las células mononucleares de la mucosa intestinal inflamada de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal proliferaban cuando se exponían *in vitro* a antígenos bacterianos de la flora autóloga. Sin embargo, las células de las áreas de mucosa no afectada de los mismos pacientes, de pacientes en remisión y de controles sanos no proliferaban ante las bacterias autólogas. Este estudio sugiere que hay una pérdida de tolerancia a la propia flora en la mucosa afectada por enfermedad inflamatoria intestinal activa.

La falta de tolerancia a la flora bacteriana probablemente desempeña un papel importante en la patogenia del

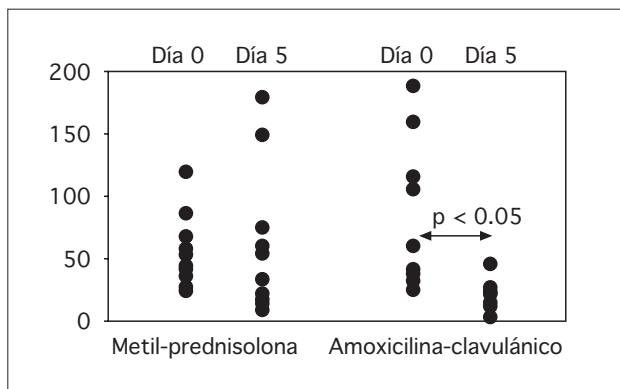


Fig. 1. Liberación de interleucina-8 (pg/ml) estimada por diáisis rectal en pacientes con colitis ulcerosa activa antes y después de 5 días de tratamiento con metilprednisolona i.v. y placebo oral, o salino i.v. y amoxicilina-clavulánico por vía oral administrada en cápsulas con cubierta entérica para prevenir su absorción<sup>28</sup>. La liberación de interleucina-8 disminuyó significativamente en los pacientes tratados con la preparación antibiótica, lo que sugiere que la reducción de la carga bacteriana tiene un importante efecto antiinflamatorio.

proceso inmunoinflamatorio que, en último término, da lugar a lesiones de la mucosa. Los fármacos inmunosupresores inhibirían los mecanismos inmunoinflamatorios frente a una población bacteriana, en principio no invasiva ni patógena. Por otra parte, la reducción de la carga bacteriana con antibióticos de amplio espectro reduciría el estímulo del proceso inmunoinflamatorio. Un estudio de nuestro centro<sup>31</sup> investigó en pacientes con colitis ulcerosa en brote los efectos del tratamiento con

corticoides (metilprednisolona) sobre la respuesta inflamatoria, en comparación con el tratamiento con amoxicilina-clavulánico administrado con cubierta entérica para evitar su absorción en el intestino delgado. El estudio demostró una reducción significativa de la actividad metabólica de la flora, valorada *in vivo* por la eliminación de hidrógeno en el aliento tras la administración de lactulosa, solamente en los pacientes tratados con el antibiótico de amplio espectro con cubierta entérica. A los 5 días de tratamiento se observó una importante inhibición de la liberación de eicosanoides inflamatorios en la mucosa rectal de los pacientes de los dos grupos. Sin embargo, la respuesta más llamativa fue la supresión en la liberación de interleucina-8, que prácticamente se anuló en los pacientes tratados con antibióticos, mientras que no se modificó en los pacientes tratados con corticoides (fig. 1). Estos datos sugieren que la presencia de flora ejerce un papel importante en la patogenia de las lesiones inflamatorias, de modo que la reducción de la carga bacteriana tiene un efecto antiinflamatorio más profundo que el de los propios antiinflamatorios esteroideos de uso habitual.

Teniendo en cuenta los resultados de estas y otras investigaciones, la hipótesis más probable para el desarrollo de una inflamación crónica intestinal es la de una respuesta inmunitaria anormal a la flora habitual. Esta pérdida de tolerancia podría deberse a una falta de mediadores o células reguladoras, o bien a una alteración en la barrera mucosa que permitiría el contacto de las células efectoras inmunitarias locales con los productos bacterianos.

TABLA I. Estudios clínicos con antibióticos para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal

Fármaco	Enfermedad	Control	Resultado <sup>a</sup>	n	Referencia
Ciprofloxacino i.v.	CU brote agudo <sup>b</sup>	Placebo	79,3 frente a 77% (p = NS)	55	40
Ciprofloxacino v.o.	CU activa <sup>b</sup>	Placebo	70,5 frente a 72% (p = NS)	70	39
Ciprofloxacino v.o.	CU remisión <sup>b</sup>	Placebo	79 frente a 56% (p = 0,02)	83	41
Rifaximina v.o.	brote agudo refractario CU	Placebo	64,2 frente a 35,7%	28	38
Metronidazol i.v.	brote agudo <sup>b</sup> CU	Placebo	74 frente a 70%	39	34
Metronidazol i.v.	CU	Placebo	63,15 frente a 65% (p = NS)	39	37
Tobramicina i.v.	brote agudo <sup>b</sup> CU	Placebo	74 frente a 43% (p = 0,008)	84	35
Tobramicina v.o.	activa <sup>b</sup>	Placebo	Sin diferencias	40	33
Vancomicina v.o.	CU y EC activa <sup>b</sup>	Placebo		25	48
Claritromicina v.o.	EC activa <sup>b</sup>	No controlado	48%	25	48
Metronidazol v.o.	EC activa	Placebo	Reducción CDAI (p < 0,001)	105	42
Metronidazol v.o.	EC posresección	Placebo	48 frente a 25%	60	44
Ciprofloxacino v.o.	EC activa	Mesalacina	56 frente a 55% (p = NS)	40	45
Metronidazol v.o.	EC activa	Metilprednisolona	45,5 frente a 63% (p = NS)	41	47
Ciprofloxacino v.o.	EC activa	No controlado	68%	72	46

<sup>a</sup>Tasa de remisión en el grupo de tratamiento frente al grupo control.

<sup>b</sup>Como tratamiento coadyuvante al tratamiento habitual.

CU: colitis ulcerosa; EC: enfermedad de Crohn.

## ANTIBIÓTICOS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Desde hace años, se han llevado a cabo estudios clínicos y experimentales para aclarar el papel del tratamiento con antibióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal, no sólo por su acción antibacteriana sino porque a algunos de ellos se les atribuye, además, efectos inmunomoduladores, como en el caso del metronidazol y el ciprofloxacino<sup>32</sup>. Sin embargo, los datos no pueden considerarse concluyentes, probablemente porque muchos de los estudios incluyen pocos pacientes, son muy heterogéneos desde el punto de vista clínico y los criterios de efectividad del tratamiento, así como su duración son muy variables (tabla I).

En la colitis ulcerosa se han realizado estudios con vancomicina, metronidazol, tobramicina, rifaximina y ciprofloxacino. La vancomicina administrada por vía oral no resultó efectiva en un estudio con pacientes con colitis ulcerosa activa, aunque presentó una tendencia a disminuir la necesidad de cirugía<sup>33</sup>. El metronidazol, activo contra bacterias anaerobias, tampoco fue efectivo por vía intravenosa asociado al tratamiento convencional del brote agudo de colitis ulcerosa<sup>34</sup>. La tobramicina administrada por vía oral durante una semana (se trata de un antibiótico no absorbible activo frente a bacterias gramnegativas) resultó más efectiva que el placebo para controlar el brote de colitis ulcerosa<sup>35</sup>. Sin embargo, la tobramicina no ha demostrado ser eficaz para mantener la remisión<sup>36</sup>, o cuando se administra por vía intravenosa asociada a metronidazol en casos de brote agudo<sup>37</sup>. La administración de rifaximina, un antibiótico no absorbible de amplio espectro, sólo ha sido investigada en un estudio con pocos pacientes, en los que induce una mejoría clínica y endoscópica al compararlo con placebo<sup>38</sup>. El ciprofloxacino es el fármaco más ampliamente utilizado en estudios clínicos recientes, dado su amplio espectro tanto para bacterias grampositivas como gramnegativas. Aunque el tratamiento a corto plazo, ya sea por vía oral<sup>39</sup> o intravenosa<sup>40</sup>, no ha demostrado su eficacia en la colitis ulcerosa activa, un estudio en el que se administró el antibiótico durante 6 meses demostró la superioridad del ciprofloxacino sobre el placebo para disminuir la tasa de recidiva<sup>41</sup>.

En la enfermedad de Crohn se han realizado diversos estudios con metronidazol, ciprofloxacino y claritromicina. El metronidazol ha demostrado ser eficaz en estudios clínicos en el tratamiento de enfermedad de Crohn activa leve o moderada<sup>42</sup>, en el tratamiento de la enfermedad perianal<sup>43</sup> y como tratamiento preventivo de recidiva posquirúrgica<sup>44</sup>. El ciprofloxacino, solo<sup>45</sup> o en combinación con el metronidazol<sup>46</sup>, también ha sido efectivo en el tratamiento de la enfermedad de Crohn activa, sobre todo de afección colónica y con una tasa de remisión similar a la conseguida con metilprednisolona<sup>47</sup>. Por último, recientemente se ha publicado un estudio abierto no controlado con claritromicina, antibiótico elegido por su amplio espectro y su capacidad de penetrar en macrófagos. La claritromicina, administrada durante 4-12 semanas a pacientes con enfermedad de Crohn activa, demostró unos

resultados muy prometedores para controlar la actividad y mantener la remisión<sup>48</sup>.

Teniendo en cuenta los resultados de todos los estudios previos, probablemente el éxito del tratamiento con antibióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal radique en la elección de fármacos con amplio espectro, activos intracelularmente y con pocos efectos secundarios para mantenerlos durante un período prolongado, y en la selección cuidadosa de los grupos de pacientes a tratar para valorar la eficacia real del tratamiento<sup>49</sup>.

## PROBIÓTICOS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Los probióticos son microorganismos vivos que, ingeridos en una cantidad adecuada, ejercen efectos beneficiosos para la salud más allá de sus propiedades puramente nutricionales<sup>50</sup>. Aunque clásicamente el concepto de probiótico se ha asociado con los lactobacilos y las bifidobacterias, actualmente podemos incluir en el término a otras cepas bacterianas no patógenas, como alguna de *E. coli*, u otros microorganismos no bacterianos, como el *Saccharomyces boulardii*.

La estrategia básica del tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal ha estado dirigida hasta ahora a modular o suprimir las respuestas inflamatorias y, salvo los estudios de tratamiento con antibióticos, se ha prestado poca atención a modificar el microambiente intestinal en lo que se refiere a la flora<sup>51</sup>. Aunque el uso de antibióticos parece ser el método más obvio de manipular la flora, sus desventajas, en términos de falta de especificidad, riesgo de sobrecrecimiento de patógenos y desarrollo de resistencias, hacen que se hayan investigado formas más sutiles y controladas, como la administración de prebióticos y probióticos, lo que recientemente se ha denominado *functional food*<sup>52</sup>. Además, la modificación de la flora intestinal mediante probióticos ofrece la oportunidad de actuar no sólo desde el punto de vista microbiológico, sino probablemente desde el punto de vista inmunológico<sup>53,54</sup>. Los estudios realizados sugieren que, además del efecto puramente competitivo con otras bacterias y la producción de sustancias antimicrobianas, los probióticos pueden modificar el diálogo epitelio-sistema inmunitario intestinal ejerciendo un efecto inmunomodulador, ya que algunos de ellos podrían tener propiedades antiinflamatorias al interactuar con la mucosa intestinal. En un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio, se ha investigado el efecto de ciertas bacterias sobre la liberación de TNF- $\alpha$  por la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn<sup>55</sup>. Se obtuvieron piezas quirúrgicas de ileon de pacientes con enfermedad de Crohn que no habían respondido al tratamiento convencional. Tras diseccionar la mucosa, ésta se cultivó durante 24 h con diferentes bacterias con propiedades probióticas conocidas. La liberación de TNF- $\alpha$  por la mucosa inflamada de pacientes con enfermedad de Crohn se redujo significativamente al cultivarla con *Lactobacillus casei*. Además, la incubación con *L. casei* redujo el número de células CD4 y la expresión de

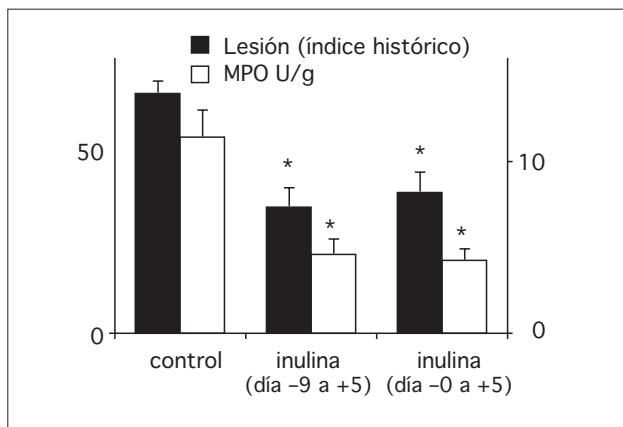


Fig. 2. La colitis inducida experimentalmente por DSS se atenúa significativamente en las ratas pretratadas (días -9 a +5) o tratadas (días 0 a +5) con el prebiótico inulina, administrado por vía oral (400 mg/día), tal como se evidencia por la reducción de los índices de lesión histológica y de la acumulación de actividad mieloperoxidasa en el tejido en comparación con las ratas control<sup>67</sup>. MPO: marcador de infiltración leucocitaria.

TNF- $\alpha$  en los linfocitos intraepiteliales. Estos hallazgos sugieren que algunas bacterias son capaces de interactuar con las células inmunocompetentes de la mucosa y modular localmente la producción de citocinas proinflamatorias.

#### PROBIÓTICOS EN MODELOS EXPERIMENTALES DE COLITIS

Los resultados de los estudios con animales en modelos experimentales de colitis tratados con probióticos han resultado esperanzadores. En el modelo de colitis en rata inducido por ácido acético, la administración de *Lactobacillus reuteri* R2LC inmediatamente tras la inducción prevenía la instauración de la colitis. Sin embargo, si la administración se realizaba de forma más retardada o con concentraciones menores de bacterias, el efecto era menos prominente<sup>56</sup>. De la misma forma, en el modelo de enterocolitis en ratas inducida con metrotexato intraperitoneal, la ingestión de lactobacilos, especialmente *Lactobacillus plantarum*, disminuía la gravedad de la colitis, mejorando la pérdida de peso y la permeabilidad intestinal y reduciendo la mieloperoxidasa local, la translocación bacteriana y los valores plasmáticos de endotoxina<sup>57</sup>. El modelo de ratones deficientes en IL-10 resulta interesante para estudiar el papel de las bacterias en el inicio de la inflamación de la mucosa del colon. La colitis crónica espontánea que desarrollan estos ratones requiere la presencia de bacterias en la luz intestinal (no la desarrollan en condiciones *germ-free*), se previene y trata con antibióticos y presenta características similares a la enfermedad de Crohn humana<sup>58-60</sup>. En el estudio de Madsen et al<sup>61</sup>, los ratones deficientes en IL-10 presentan en el período neonatal valores disminuidos de lactobacilos en el colon y un aumento de bacterias adheridas y translocadas en la mucosa colónica, desarrollando una

colitis a las 4 semanas de vida. La repoblación del colon con *Lactobacillus* sp. atenúa la colitis y disminuye la translocación y la adherencia de otras bacterias. El tratamiento de estos ratones con VSL#3, un preparado liofilizado con 8 bacterias diferentes, induce una normalización de la función epitelial, de la permeabilidad de la mucosa y una reducción en la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ <sup>62</sup>. En el mismo modelo, la ingestión del probiótico *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* UCC118 inhibe no sólo el desarrollo de colitis sino la aparición de cáncer de colon<sup>63</sup>. Por el contrario, la ingestión de *Lactobacillus plantarum* 299 por ratas a las que se les había inducido una colitis en el modelo del TNBS no indujo una mejoría en la inflamación ni en el aumento de permeabilidad de la mucosa<sup>64</sup>.

En un estudio publicado recientemente<sup>65</sup> se describe el efecto terapéutico de una bacteria (*Lactococcus lactis*) modificada genéticamente para secretar IL-10, una citocina con propiedades antiinflamatorias que promueve la tolerancia inmunológica. El efecto antiinflamatorio de la bacteria, usada hasta ahora en la producción de alimentos fermentados, fue probado en el tratamiento de la colitis crónica inducida en ratones mediante DSS y en la prevención de la colitis espontánea que desarrollan los ratones deficientes en IL-10. La administración intragástrica de la bacteria tras la inducción de la colitis produjo una reducción significativa en la inflamación intestinal medida por histología comparable a la de otros tratamientos más convencionales, como los corticoides. En el modelo de los ratones deficientes en IL-10, la administración diaria de la bacteria previno el desarrollo espontáneo de colitis. Las ventajas de esta modalidad terapéutica son, por una parte, la necesidad de una dosis efectiva más baja de IL-10 que la requerida por vía parenteral y, en segundo lugar, permite la administración local *in situ* evitando los inconvenientes asociados a la exposición sistémica de citocinas con alta actividad biológica. El estudio es prometedor, ya que introduce un nuevo concepto en la terapéutica de la enfermedad inflamatoria intestinal integrando el tratamiento con citocinas y la modificación del microambiente local en el intestino<sup>66</sup>. Sin embargo, son necesarios más estudios, relacionados sobre todo con la seguridad, antes de aplicar estas novedosas técnicas en humanos.

Otra posibilidad que se ha explorado es el uso de polisacáridos no absorbibles que, administrados por vía oral, aumentan la actividad sacarolítica de la flora del colon favoreciendo el sobrecrecimiento de especies autóctonas de los géneros *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*. Un trabajo experimental de nuestro centro demostró que la administración oral de inulina tiene un efecto antiinflamatorio muy significativo en un modelo de colitis distal similar a la colitis ulcerosa humana<sup>67</sup> (fig. 2).

Del conjunto de resultados de los experimentos animales se puede extraer varias conclusiones. Por una parte, el inicio de la inflamación de la mucosa intestinal está probablemente relacionado con una alteración del balance normal de la flora y esta situación puede ser antagonizada manipulando la flora mediante la administración de bac-

terias «probióticas». En segundo lugar, la variabilidad de la eficacia de los diferentes probióticos, según el modelo animal utilizado, sugiere que en el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal humana, caracterizada por su gran heterogeneidad, será preciso establecer indicaciones con bacterias específicas según el subgrupo de pacientes que se quiera tratar.

### **PROBIÓTICOS EN ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL HUMANA**

Aunque en los últimos años se ha investigado sobre el efecto de los probióticos en los pacientes con enfermedad inflamatoria, todavía faltan datos basados en estudios controlados para determinar su eficacia clínica.

En dos estudios realizados en niños con enfermedad de Crohn, *Lactobacillus GG* demostró tener efectos beneficiosos. Administrado a corto plazo (10 días), indujo un aumento en las células secretoras de IgA contra lactoglobulina y caseína, lo que sugiere una estimulación de la respuesta inmunitaria intestinal<sup>68</sup>. Cuando el probiótico era administrado a más largo plazo, durante 6 meses, inducía una disminución de la permeabilidad de la mucosa intestinal además de una reducción en el índice de actividad clínica<sup>69</sup>.

En dos estudios piloto, se ha investigado en pacientes con enfermedad de Crohn el efecto de *Saccharomyces boulardii*, levadura que ha demostrado ser eficaz en la prevención y el tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile*. Plein et al<sup>70</sup>, en un estudio controlado a doble ciego, estudiaron el efecto de este probiótico asociado al tratamiento convencional, sobre el control de los síntomas en pacientes con enfermedad de Crohn activa. En el grupo tratado con *Saccharomyces* se demostró una reducción en la frecuencia de las deposiciones cuando se comparaba con el grupo placebo. El estudio de Guslandi et al<sup>71</sup> valoró la eficacia de la administración de *S. boulardii* como tratamiento de mantenimiento asociado a la mesalacina durante 6 meses en pacientes con enfermedad de Crohn en remisión. La tasa de recidiva en el grupo placebo fue significativamente superior que en el grupo tratado con la levadura (37,5 frente a 6,25% a los 6 meses).

En pacientes con colitis ulcerosa se han publicado dos estudios comparando la eficacia de una cepa de *E. coli* no patógena (Nissle 1917) con la mesalacina en la inducción y mantenimiento de la remisión. En un primer estudio, se incluyó a 120 pacientes con colitis ulcerosa en remisión, a los que de manera aleatoria y a doble ciego se les administró mesalacina a la dosis de 1.500 mg/día, o bien una preparación por vía oral de *E. coli* Nissle 1917 durante 12 semanas. Al final del período de estudio, la tasa de remisión fue similar en ambos grupos (11,3 y 16%, respectivamente) lo que sugiere que el tratamiento con probióticos puede suponer una alternativa como mantenimiento de la remisión en pacientes con colitis ulcerosa<sup>72</sup>. En un estudio posterior, utilizando la misma bacteria, se investigó la eficacia del probiótico en el mantenimiento a largo plazo, 12 meses, en 120 pacientes con colitis ulcerosa ac-

tiva. La adición de la bacteria al tratamiento estándar de la colitis ulcerosa activa no modificó ni la tasa de remisión ni el tiempo en conseguirla. Por otra parte, el tratamiento con *E. coli* no patógena demostró una eficacia equivalente al tratamiento con mesalacina (recidiva, 67 frente a 73%, respectivamente) en el mantenimiento de la remisión<sup>73</sup>. Según algunos autores<sup>74</sup>, este estudio presenta algunas particularidades que limitan la importancia de los hallazgos, como la heterogeneidad en la gravedad del brote, las diferencias en las pautas de tratamiento con corticoides y la alta tasa de recidiva al final del período de estudio. Sin embargo, los resultados son interesantes y alicantan el desarrollo de nuevos estudios para investigar qué cepa bacteriana, a qué dosis y durante cuánto tiempo habría que utilizar en el tratamiento de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

Los resultados obtenidos con un mezcla de probióticos en pacientes con pouchitis han resultado más llamativos<sup>75</sup>. La pouchitis es una de las complicaciones a largo plazo más frecuentes de los pacientes con reservorio ileoanal. Aunque su causa no se conoce, la respuesta que presenta al tratamiento con antibióticos sugiere que probablemente tiene su origen en una alteración en el equilibrio bacteriano, ya que se asocia a una disminución en la concentración en las heces de lactobacilos y bifidobacterias. El estudio, doble ciego controlado contra placebo, incluyó a 40 pacientes con una anastomosis ileoanal con reservorio con historia de pouchitis crónica recidivante (más de 3 brotes al año) que se encontraban en remisión en el momento de la inclusión. Los pacientes fueron aleatorizados para recibir la preparación de probióticos o placebo durante 9 meses. La preparación de probióticos (VSL#3) incluía 4 cepas de lactobacilos, 3 de bifidobacterias y una cepa de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* en forma de liofilizado que contenía  $5 \times 10^{11}$  bacterias por gramo. El objetivo del estudio fue valorar la eficacia del probiótico y compararla con la del placebo como tratamiento de mantenimiento de la pouchitis crónica recidivante. Al final del período de estudio, sólo el 15% de los pacientes en el grupo tratado con VSL#3 presentaron una recidiva, comparado con el 100% de los pacientes en el grupo placebo. Además, todos los pacientes que respondieron al tratamiento con probióticos presentaron una recidiva en los 4 meses siguientes tras suspenderlo. La misma mezcla de probióticos, en un estudio abierto con 20 pacientes con colitis ulcerosa en remisión, alérgicos o intolerantes al 5-ASA, demostró ser eficaz como tratamiento de mantenimiento<sup>76</sup>. Los autores justifican el uso de una mezcla de distintas especies de bacterias por dos motivos. Por un lado, se administran altas concentraciones de bacterias probióticas y, por otro, la presencia de diferentes especies bacterianas favorece un efecto sinérgico teórico entre ellas para la inhibición de patógenos. Sin embargo, sería muy conveniente determinar si realmente las distintas cepas de probióticos presentan este efecto sinérgico, si todas las cepas son activas y necesarias para conseguir el efecto antiinflamatorio o si la utilización de la mezcla es superior a la de una única cepa bacteriana<sup>77</sup>.

## CONCLUSIONES

Las bacterias de la flora comensal parecen desempeñar un papel importante en los mecanismos de inflamación implicados en la patogenia de las enfermedades crónicas del intestino. Probablemente, hay un defecto primario en el huésped que reacciona anormalmente contra una población bacteriana poco o nada virulenta. La investigación de la interacción del sistema inmunitario intestinal con la diversidad de bacterias de la flora abre un amplio abanico de posibilidades para mejorar nuestros conocimientos sobre la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino. Aunque por el momento contamos con pocos estudios clínicos, es probable que en pocos años el uso de probióticos ocupe un lugar importante en el arsenal terapéutico para prevenir y combatir la enfermedad inflamatoria intestinal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rutgeerts P, Geboes K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991;2:771-4.
2. D'Haens G, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; 114:262-7.
3. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
4. Chiodini RJ, Kruizingen HJV, Thayer WR, Merkal RS, Couto JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984;29:1073-9.
5. Thayer WR, Couto JA, Chiodini RJ, Kruizingen HJV, Merkal RS. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease (II). Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984;29:1080-5.
6. Kobayashi K, Brown WR, Brennan PL, Blaser MJ. Serum antibodies to mycobacterial antigens in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1988;94:1401-11.
7. Kobayashi K, Blaser MJ, Brown WR. Immunohistochemical examination for mycobacteria in intestinal tissues from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1989;96:1009-15.
8. Sanderson JD, Moss MT, Tizard MLV, Hermon-Taylor J. Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992;33:890-6.
9. Prantero C, Kohn A, Mangiarotti R, Andreoli A, Luzi C. Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen. *Am J Gastroenterol* 1994;89:513-8.
10. Swift GL, Srivastava ED, Stone R, Pullan RD, Newcombe RG, Rhodes J, et al. Controlled trial of anti-tuberculous chemotherapy for two years in Crohn's disease. *Gut* 1994;35:363-8.
11. Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettleheim KA. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1978;19:108-13.
12. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-13.
13. Massereel E, Boudeau J, Colombel JF, Neut C, Desreumaux P, Joly B, et al. Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut* 2001;48:320-5.
14. Wakefield AJ, Sankey EA, Dhillon AP, Sawyer AM, More L, Sim R, et al. Granulomatous vasculitis in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991;100:1279-87.
15. Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, et al. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* 1993;39:345-53.
16. Ekbom A, Wakefield AJ, Zack M, Adam HO. Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet* 1994;334: 508-10.
17. Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* 1995;345:1071-4.
18. Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 2001;48:132-5.
19. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernhaller A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.
20. Braun J. Unsettling facts of life: bacterial commensalism, epithelial adherence and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:228-9.
21. Videla S, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, Treserra F, Crespo E, et al. Role of intestinal microflora in chronic inflammation and ulceration of the rat colon. *Gut* 1994;35:1090-7.
22. Videla S, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, González G, Antolín M, et al. Stimulation of mucosal inflammatory activity by the normal fecal flora in a rat model of colitis. *Inflammatory Bowel Dis* 1997;3:191-7.
23. García-Lafuente A, Antolín M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, et al. Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol* 1997;272:G10-5.
24. Mourelle M, Salas A, Guarner F, Crespo E, García-Lafuente A, Malagelada JR. Stimulation of transforming growth factor-β1 by enteric bacteria in the pathogenesis of rat intestinal fibrosis. *Gastroenterology* 1998;114:519-26.
25. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995;102:448-55.
26. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;26:934-8.
27. Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, Neurath M, Strober W. Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:566-73.
28. Kühn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.
29. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;38:365-75.
30. Duchmann R, Neurath MF, Meyer zum Büschenfelde KH. Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease. *Res Immunol* 1997;148:589-94.
31. Casellas F, Borruel N, Papo M, Guarner F, Antolín M, Videla S, et al. Antiinflammatory effects of enterically coated amoxicillin-clavulanic acid in active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:1-5.
32. Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118:S68-82.
33. Dickinson RJ, O'Connor HJ, Pinder I, Hamilton I, Johnston D, Axon AT. Double blind controlled trial of oral vancomycin as adjunctive treatment in acute exacerbations of idiopathic colitis. *Gut* 1985;26:1380-4.
34. Chapman RW, Selby WS, Jewell DP. Controlled trial of intravenous metronidazole as adjunct to corticoids in severe ulcerative colitis. *Gut* 1986;27:1210-2.
35. Burke DA, Axon AT, Clayden SA, Dixon MF, Johnston D, Lacey RW. The efficacy of tobramycin in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1990;4:123-9.
36. Lobo AJ, Burke DA, Sobala GM, Axon AT. Oral tobramycin in ulcerative colitis: effect on maintenance of remission. *Aliment Pharmacol Ther* 1993;7:155-8.
37. Mantzaris GJ, Hatzis A, Kontogiannis P, Triadaphyllou G. Intravenous tobramycin and metronidazole as an adjunct to corticosteroids in acute, severe ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1994;89:43-6.
38. Gionchetti P, Rizzello F, Ferriero A, Venturi A, Brignola C, Ferretti M, et al. Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid-treatment: a double blind, placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci* 1999;44:1220-1.

39. Mantzaris GJ, Archavlis E, Christoforidis P, Kourtessas D, Ambergiadis P, Florakis N, et al. A prospective randomised controlled trial of oral ciprofloxacin in acute ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:454-6.
40. Mantzaris GJ, Petraki K, Archavlis E, Ambergiadis P, Kourtessas D, Christidou A, et al. A prospective randomized controlled trial of intravenous ciprofloxacin as an adjunct to corticosteroids in acute, severe ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:971-4.
41. Turunen UM, Färkkilä MA, Hakala K, Seppälä K, Sivonen A, Ogren M, et al. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 1998; 115:1072-8.
42. Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, et al. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* 1991;32:1071-5.
43. Jakobovits J, Schuster MM. Metronidazole therapy for Crohn's disease and associated fistulae. *Am J Gastroenterol* 1984;79: 533-40.
44. Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, et al. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995;108:1617-21.
45. Colombel JF, Lemman M, Cassagnou M, Bouhnik Y, Duclos B, Dupas JL, et al. A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalamine for the treatment of active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:674-8.
46. Greenbloom SL, Steinhart AH, Greenberg GR. Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1998;12:53-6.
47. Prantera C, Zannoni F, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, Kohn A, et al. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *A J Gastroenterol* 1996;91:328-32.
48. Leiper K, Morris AI, Rhodes JM. Open label trial of oral clarithromycin in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:801-6.
49. Colombel JF, Cortot A, Van Kruiningen HJ. Antibiotics in Crohn's disease. *Gut* 2001;48:647.
50. Guarner F, Schaafsma G. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998;39:237-8.
51. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnosis, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001; 120:622-35.
52. Milner JA. Functional foods and health promotion. *J Nutr* 1999;129:S1395-7.
53. Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:609.
54. Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:107-15.
55. Borruel N, Carol M, Casellas F, Antolín M, De Lara F, Espín E, et al. Increased mucosal TNF $\alpha$  production in Crohn's disease can be modulated in vitro by probiotic bacteria. *Gut* 2002; 5:659-64.
56. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Willen R, Andersson R. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic-acid induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:155-62.
57. Mao Y, Nobaeck S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, et al. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 111:334-44.
58. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75:263-74.
59. Sellon RK, Tonkonogy SL, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10 deficient mice. *Infect Immun* 1998;66: 5224-31.
60. Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, Jewell LD, Rennie RP, Fedorak RN. Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 2000;118:1094-105.
61. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;116:1107-14.
62. Madsen K, Cornish A, Soper P, Mc Kaigney C, Jijon H, Yachmec C, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001;121: 580-91.
63. O'Mahony, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L, Kiely B, Fitzgibbon J, et al. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1219-25.
64. Kennedy RJ, Hooper M, Deodhar K, Kirk SJ, Gardiner KR. Probiotic therapy fails to improve gut permeability in a hapten model of colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1266-71.
65. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352-5.
66. Shanahan F. Turbo probiotics for IBD. *Gastroenterology* 2001;120:1297-8.
67. Videla S, Vilaseca J, Antolín M, García-Lafuente A, Guarner F, Crespo E, et al. Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1486-93.
68. Malin M, Soumalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of Ig A immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab* 1996;40: 137-45.
69. Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is *Lactobacillus GG* helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:453-7.
70. Plein K, Hotz J. Therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea—a pilot study. *Z Gastroenterol* 1993;31:129-34.
71. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1462-4.
72. Kruis W, Schütz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalamine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:853-8.
73. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalamine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:635-9.
74. Faubion WA, Sandborn WJ. Probiotic therapy with *E. coli* for ulcerative colitis: take the good with the bad. *Gastroenterology* 2000;118:630-1.
75. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305-9.
76. Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, et al. Impact on the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13: 1103-8.
77. Sartor RB. Probiotics in chronic pouchitis: restoring luminal microbial balance. *Gastroenterology* 2000;119:584-6.