

*SIMPOSIO*

**FLORA INTESTINALE UMANA: MODIFICAZIONI E RICOSTITUZIONE**

***HUMAN INTESTINAL FLORA: CHANGES AND REESTABLISHMENT***

**Chairmen:**

**G. SCHITO** – Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Genova, Italia

**D. VAN DER WAAIJ** – Laboratory for Medical Bacteriology, Groningen, The Netherlands

## INFLUENZA DELL'ADATTAMENTO BIOCHIMICO DI UN LATTE FORMULATO ARTIFICIALMENTE SULL'ECOSISTEMA MICROBICO INTESTINALE

R. Bisicchia (a), E. Gozio (a), M. Foschini (b) & C. Zunin (b)

(a) Laboratorio Analisi, Ospedale dei Bambini, Brescia;

(b) Divisione di Patologia Neonatale, Spedali Civili, Brescia, Italia

**Riassunto.** - E' stato valutato l'effetto dell'adattamento di un latte artificiale sull'ecosistema microbico intestinale. L'analisi è stata condotta in termini qualitativi e quantitativi per la ricerca delle principali specie aerobiche ed anaerobiche in bambini alimentati con latte materno (LM), latte adattato (LA) e latte non adattato (LNA). I risultati mostrano che, in generale, ad un adattamento di tipo biochimico corrisponde un avvicinamento dell'ecosistema microbico al modello naturale.

**Summary** (Influence of a biochemically adapted formula on intestinal microecology). - The authors evaluate the influences of an adapted milk formula on intestinal microbic ecosystem. The analysis is both qualitative and quantitative in assessing the main aerobic and anaerobic bacteria. In neonates nourished with breast milk, formula milk and adapted milk formula, the results show that an adapted milk formula induces a microbic ecosystem similar to that of mother's milk.

### Introduzione

E' universalmente accertato che l'alimentazione al seno materno offre al neonato una notevole protezione nei confronti delle infezioni in generale e di quelle intestinali in particolare. Numerosi sono i fattori chiamati in causa per spiegare tale protezione. Uno di questi fattori è l'ecosistema microbico intestinale che, in tali neonati, ha come marker caratteristico una notevole proliferazione di Bifidobatteri ed un ostacolato sviluppo di Enterobacteriaceae (1, 2). I lattii formulati artificialmente tendono ad indurre ecosistemi notevolmente diversi dal modello naturale (3, 4).

Scopo del lavoro è quello di verificare se all'adattamento di tipo biochimico corrisponde o meno un adattamento dell'ecosistema intestinale indotto. A tal fine è stata studiata la colonizzazione indotta da due diverse formule di latte, una adattata (LA) ed una non adattata (LNA), confrontandole con quella indotta dal latte materno (LM).

### Materiali e Metodi

Sono stati analizzati 39 bambini suddivisi in 3 gruppi in base all'alimentazione, nel periodo che va da aprile '84 a ottobre '85: 13 bambini allattati al seno, 15 bambini allattati con latte adattato, 11 bambini allattati con latte non adattato.

Si tratta di neonati a termine con peso corporeo superiore a 2300 grammi,

nati da parto spontaneo presso gli Spedali Civili di Brescia e che hanno soggiornato per i primi 6 giorni di vita nel nido dell'ospedale e poi a domicilio. Nessun bambino è stato sottoposto a terapia. Per ogni bambino di ciascun gruppo vengono eseguiti 2 prelievi di feci: in 4<sup>a</sup> e in 18<sup>a</sup> giornata di vita al fine di seguire la dinamica della colonizzazione.

Un grammo circa del campione viene stemperato ed omogeneizzato accuratamente in 9 ml di acqua peptonata, preventivamente scaldata per allontanare l'ossigeno. Si preparano diluizioni da  $10^{-2}$  a  $10^{-10}$ . Si seminano aliquote di 0,1 ml delle diverse diluizioni su terreni selettivi per la ricerca delle principali specie aerobiche (Enterobacteriaceae, Enterococco, S.aureus, S.epidermidis, C.albicans, P.aeruginosa, Lattobacilli) ed anaerobiche (Bifidobatteri, Bacteroides, Clostridi) (5). E' stata eseguita la determinazione del pH fecale. E' noto infatti che il latte materno induce valori di pH fecale notevolmente bassi e che più di un autore mette in relazione questo fattore con la colonizzazione con Bifidobatteri.

## Risultati

I risultati sono espressi nella Tabella 1; essi mostrano che il LA induce inizialmente concentrazioni di E.coli inferiori rispetto al LNA, avvicinandosi in tal modo alle condizioni tipicamente indotte dal LM; successivamente tuttavia la concentrazione aumenta fino a raggiungere i valori del LNA.

La colonizzazione con Bifidobatteri indotta dal LA si stabilizza su valori prossimi a quelli indotti dal LM e distanti da quelli indotti dal LNA. Quest'ultimo non tende ad indurre una colonizzazione con questo marker caratteristico del LM. L'elevata concentrazione di Bifidobatteri osservata inizialmente

Tabella 1. - Flora fecale in neonati diversamente alimentati

GIORNATE DI VITA	4a			18a		
	Materno	Adattato	Non adattato	Materno	Adattato	Non adattato
N° CAMPIONI	13	15	11	10	14	8
<u>E. coli</u>	**7,8±1,1 *( 8)	9,1±0,8 (13)	10,1±0,8 (10)	7,2±1,6 ( 4)	9,5±0,7 (13)	9,9±0,9 ( 7)
<u>Enterococco</u>	8,0±1,0 (13)	7,2±1,4 (15)	9,6±0,6 (10)	6,9±1,9 (10)	8,6±1,2 (13)	9,0±0,8 ( 8)
<u>S. epidermidis</u>	7,7±0,5 (12)	6,2±0,9 ( 7)	6,5±0,9 ( 6)	7,9±1,0 (10)	7,5±1,4 ( 6)	7,7±0,1 ( 2)
<u>S. aureus</u>	6,1±1,6 ( 4)	6,0±0,7 (11)	5,7±1,2 ( 5)	6,8±0,6 ( 7)	6,8±0,7 (12)	6,6±1,1 ( 4)
<u>Lattobacilli</u>	6,5 ( 1)	8,4±1,4 ( 6)	9,0±1,7 ( 6)	*** N.D.	8,6±1,2 ( 5)	8,7±0,8 ( 5)
<u>Altri Entero.</u>	7,4±1,0 ( 4)	7,2 ( 1)	8,8 ( 1)	6,7±0,6 ( 3)	7,2±2,2 ( 2)	10,1±1,6 ( 2)
<u>Bifidobatteri</u>	10,0±0,7 (13)	8,8±1,1 (12)	10,2±0,6 ( 3)	10,3±0,7 (10)	9,5±0,6 (12)	7,8±2,0 ( 2)
<u>Bacteroides</u>	7,7±0,5 ( 3)	7,4±2,0 ( 5)	9,2±0,1 ( 2)	7,3±2,1 ( 4)	9,0±1,6 ( 4)	8,7±2,1 ( 6)
<u>Clostridi</u>	8,2 ( 1)	7,6±1,6 ( 9)	8,5±0,9 ( 3)	6,8±1,8 ( 3)	7,8±1,3 (10)	9,4±0,6 ( 4)

\* Il numero bambini positivi per il microrganismo è messo tra parentesi

\*\* logaritmo(base 10) della concentrazione media ± S.D.

\*\*\* N.D. = non determinato (conta minore di log 2)

per il LNA non deve trarre in inganno poiché bisogna tenere conto che solo 3 neonati su 11 ne sono risultati colonizzati. E' interessante tuttavia speculare sulle possibili cause che hanno fatto sì che i pochi soggetti colonizzati lo siano a concentrazioni notevolmente elevate.

La colonizzazione con Enterococco è pressoché sovrapponibile per il LA e per il LM; entrambi presentano concentrazioni inferiori rispetto al LNA.

Scarsa è la tendenza alla colonizzazione con Lattobacilli aerobi che comunque in entrambi i lattici artificiali tende ad essere superiore rispetto al LM.

Poca tendenza ad indurre la colonizzazione con Bacteroides presentano entrambi i lattici artificiali ricalcando in tal modo il modello del LM.

Una maggiore tendenza alla colonizzazione con Clostridi sembra emergere nei soggetti alimentati con LA rispetto a quelli alimentati con LNA e con LM. Questi ultimi infatti tendono ad indurre colonizzazioni sporadiche.

I valori di pH fecale indotti dal LA risultano inferiori rispetto a quelli indotti dal LNA avvicinandosi in tal modo a quelli notoriamente bassi dal LM.

### Discussione

In generale i nostri risultati tendono a mostrare che l'adattamento di tipo biochimico di una formula induce un avvicinamento dell'ecosistema microbico intestinale al modello naturale. In particolare questo risulta evidente dall'andamento della colonizzazione con Bifidobatteri ed Enterococchi. Tale avvicinamento viene confermato dai valori di pH fecale che nei neonati alimentati con LA risultano più vicini a quelli dei neonati alimentati con LM.

### BIBLIOGRAFIA

1. BULLEN, C.L., WILLIS, A.T. & WILLIAMS, K. 1973. The significance of bifidobacteria in the intestinal tract of infants. Society for Appl. Bacteriol. Symposium S. n. 2, Aead. Press: 311.
2. TISSIER, H. 1980. Recherche sur la flore intestinale des nourissons. These Medicine, Paris.
3. HEWITT, J.H. & RIGBY, J. 1976. Effects of various milk feeds on numbers of E.coli and Bifidobacterium in the stools of the newborn infants. J. Hyg. 77: 129-139.
4. SIMHON, A. & DOUGLAS, J.R. 1982. Effect of feeding on infants' faecal flora. Arch. Dis. Child. 57: 54-58.
5. HOLDEMANL, V. & MOORE, W.E.C. 1972. Anaerobe laboratory manual. Virginian Polit. Inst. and State University, Blacksburg.

## INFLUENCE OF FEEDING TUBES AND GASTROSTOMY ON THE COLONIZATION OF THE STOMACH IN NEONATES

K. Kraeft (a), R. Roos (a) & E. Mrozik (b)

(a) Universitätskinderklinik, Munich, Germany;

(b) Kinderchirurgische Universitätsklinik, Munich, Germany

**Summary.** - We carried out bacterial counts on 165 gastric aspirates of neonates with gastrostomy and on 101 of neonates with feeding tubes. In the first group, organisms were found in 70%, in the second group in 30% of all cases. Enterobacteriaceae, enterococci, Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans were isolated far more frequently in the first group than in the second ( $p < 0,01$ ).

Six infants with gastrostomy developed septicaemia caused by the same organisms that were also found in high numbers in the gastric aspirates. The influence of non-absorbable antibiotics in children with gastrostomy was studied prospectively in 72 gastric aspirates and 48 specimens of stool. There was no highly significant difference between infants with antibiotic treatment versus those without. It is concluded that gastrostomy influences the flora of the stomach and may conceivably lead to a septicaemia.

**Riassunto** (Influenza dell'alimentazione tramite sondino e della gastrostomia sulla colonizzazione dello stomaco nei neonati). - Sono state eseguite conte batteriche in 165 aspirati gastrici di neonati con gastrostomia e in 101 neonati alimentati con sonda. Nel primo gruppo batteri sono stati trovati nel 70%, nel secondo gruppo nel 30%. Nel primo gruppo sono stati isolati più frequentemente ( $p < 0,01$ ) Enterobacteriaceae, enterococci, Pseudomonas aeruginosa e Candida albicans.

Sei neonati con gastrostomia hanno sviluppato setticemie dovute agli stessi microrganismi presenti in numero elevato negli aspirati gastrici. L'influenza di antibiotici non adsorbibili è stata studiata in 72 aspirati gastrici e 48 campioni fecali di neonati con gastrostomia. Non sono state riscontrate differenze significative tra neonati trattati e non. Si conclude che la gastrostomia influenza la flora presente nello stomaco e può verosimilmente portare a setticemia.

### Introduction

It is known that catheters in the upper digestive tract may alter the local flora. Therefore, we studied the gastric colonization in neonates with gastrostomy and in premature infants with feeding tubes.

### Materials and Methods

We carried out bacterial counts in 161 gastric aspirates of 65 neonates with gastrostomy due to an abdominal malformation and on 101 gastric aspirates

of 37 premature infants with feeding tubes.

Furthermore, we tried to modulate the flora of the stomach by oral application of non-absorbable antibiotics. The influence of these drugs was studied in 72 gastric aspirates from another group of 42 neonates with gastrostomy. In 28 cases the infants received 3 x 250000 U colistin/d and 3 x 10 mg neomycin/d for at least one week. Fortyfour cultures from neonates without these antibiotics served as controls. Within the scope of this study, 48 specimens of stool were also cultivated, 23 from infants treated with colistin and neomycin and 25 from patients not receiving these antibiotics.

## Results

In 49 of the 161 cultures (30%) from infants with gastrostomy, there was no growth of any organism. In 112 aspirates (70%), one to four bacterial species were isolated. In the 101 cultures of neonates with feeding tubes, there was no growth of any organisms in 70 cases. One to three bacterial species were isolated in 31 cultures (Fig. 1).

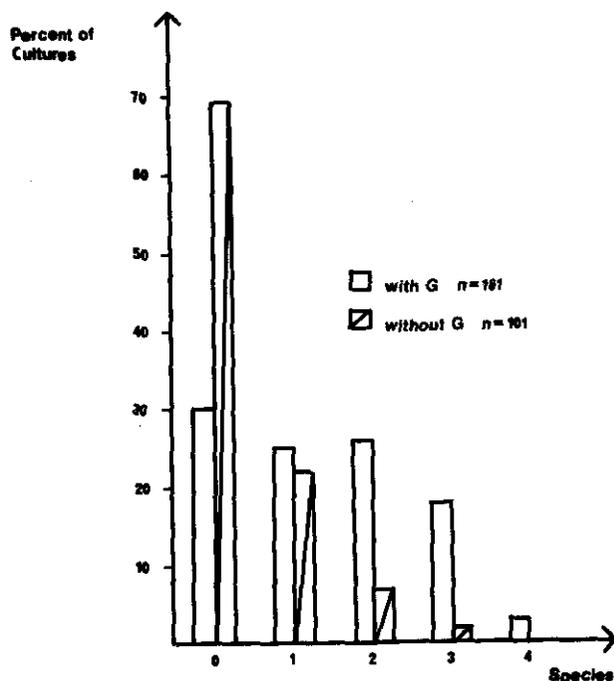


Fig. 1. - Colonization of the stomach in neonates with and without gastrostomy.

In the aspirates from infants with gastrostomy, we found 33x *Staph. epi.*, 9x *Staph. aureus*, 46x *enterococci*, 5x *Streptococcus viridans*, 53x *Enterobacteriaceae*, 34x *Pseudomonas aeruginosa*, 12x *anaerobes* and 26x *Candida albicans* (Fig. 2). In the specimens from neonates with feeding tubes, we cultivated 18x *Staph. epi.*, 6x *enterococci*, once *Streptococcus viridans*, 13x *Enterobacteriaceae*, once *Pseudomonas*, 3x *anaerobes* and never *Candida* (Fig. 3). To summarize, we isolated *Enterobacteriaceae*, *enterococci*, *Pseudomonas* and *Candida* far more frequently in infants with gastrostomy. This difference is highly significant.

We could not find any influence of the type of food. Neither breast milk nor a formula with *Lactobacillus bifidus* prevented the pathological colonization of the stomach in infants with gastrostomy.

We found that a low pH (1-3) of the gastric content prevented colonization of the stomach in most cases. (In order to avoid side-effects of an acidified formula, especially metabolic acidosis, we did not try to prevent gastric colonization by lowering the pH of the food, e.g. by adding lactic acid).

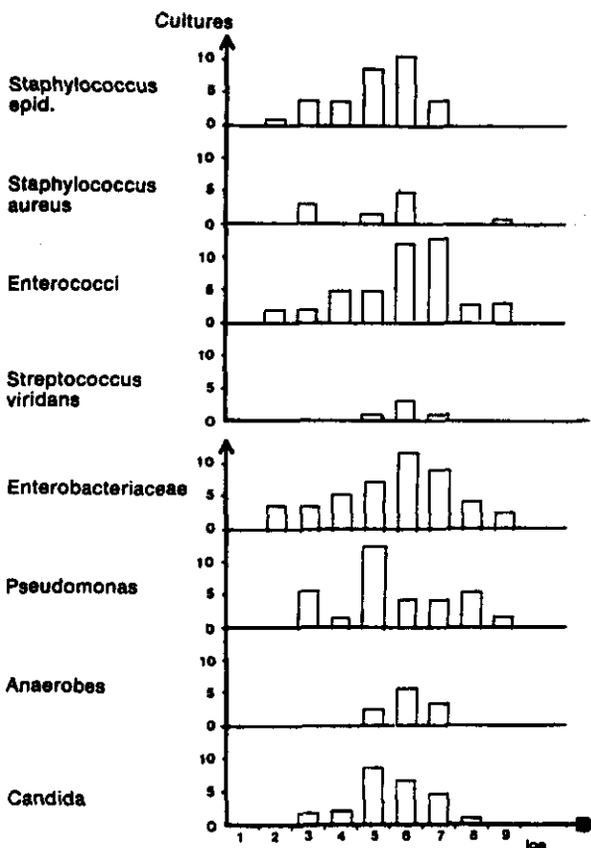


Fig. 2. - Colonization of the stomach in infants with gastrostomy (n=161).

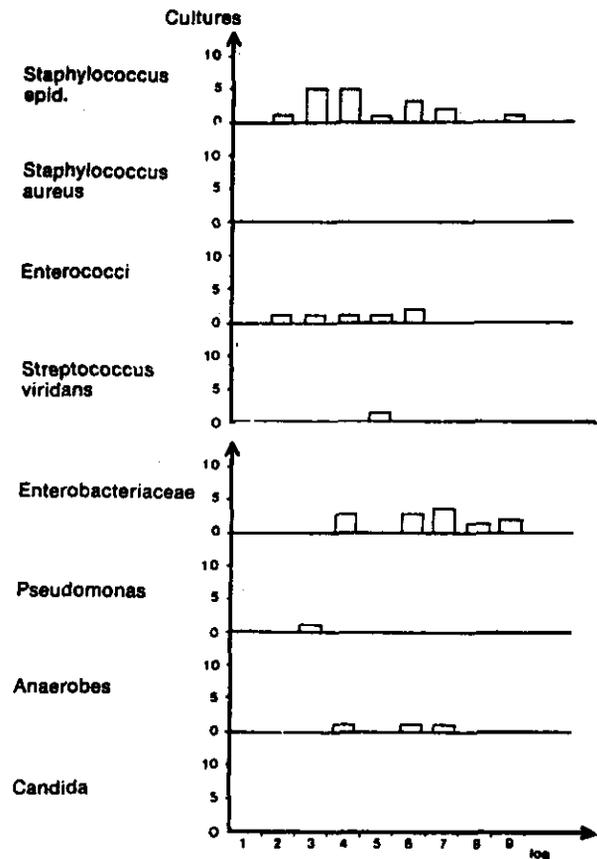


Fig. 3. - Colonization of the stomach in infants with feeding tubes (n=101).

In 99 cases the children with gastrostomy received antibiotics at the time of the investigation or during the previous week. In almost all cases the indication was proven or clinically suspected septicaemia. Most frequently (32x), the combination of cefotaxime, tobramycin and metronidazole was given. In 67 cases various other combinations were used. In cultures from the infants treated with antibiotics, we found no growth of organisms in 37 cases (37%) vis à vis 12 cases (19%) in the non-treated infants. (This difference is not highly significant.). With regard to the types of organisms found, there were no differences between the two groups.

In 86 cases the infants received nystatin in order to prevent colonization by Candida; this germ could be isolated from only 6 (7%) of these cultures. On the other hand Candida was revealed in 20 of the remaining 75 aspirates (27%) from patients who had not received nystatin (this difference is highly significant).

Ten of 65 neonates with gastrostomy developed septicaemia proven by positive blood cultures. In 6 of these, the same species of organisms were cultivated in counts above  $10^5$  in their gastric aspirates (Table 1). We never found this phenomenon in infants with feeding tubes.

In 28 cultures from children who received neomycin and colistin, there was no growth of any organism in 10 (36%). In the 44 controls, no organisms were demonstrated in 21 cases (45%). This difference is not significant.

Table 1. - Blood cultures and gastric colonization in 10 infants with gastrostomy and septicaemia.

Blood Culture	Gastric Aspirate
1 <u>E.coli</u>	$4 \times 10^9$ <u>E.coli</u>
2 <u>E.coli</u>	$6 \times 10^8$ <u>E.coli</u> $3 \times 10^8$ Enterococci
3 <u>E.coli</u>	$3 \times 10^5$ <u>E.coli</u>
4 <u>E.coli</u>	$6 \times 10^8$ St.aureus
5 <u>Serratia liquefaciens</u>	$3 \times 10^7$ <u>Serr. liqu.</u> $2 \times 10^7$ Serr. marc. $4 \times 10^7$ Klebs. oxyt. $10^7$ Enterococci
6 <u>Serratia marcescens</u>	$10^7$ Serr. marc.
7 <u>Citrobacter freundii</u>	$2 \times 10^4$ Enterococci $2 \times 10^4$ Candida
8 <u>Pseudomonas</u>	$2 \times 10^8$ <u>Pseudomonas</u>
9 <u>Pseudomonas</u>	$10^7$ Candida
10 <u>Enterococci</u>	$10^5$ Pseudomonas

Colistin and neomycin did not protect safely against single groups of organisms, such as Pseudomonas or Enterobacteriaceae, in spite of the fact that these species are as a rule sensitive to these antibiotics. (Indeed, we found Pseudomonas only once, in a concentration less than  $10^5$ , in infants who had received colistin and neomycin as opposed to 1lx in the non-treated group, but this difference is not statistically significant).

The only significant difference between the 23 stool cultures with colistin and neomycin and the 25 without these antibiotics was that we never isolated Pseudomonas in a concentration above  $10^5$  in the first group whereas we found it 6x in the second group.

#### Discussion

We found that 6 of the 65 infants with gastrostomy (9%) developed septicaemia with the same species of bacteria in the blood culture as that isolated in high counts in the gastric aspirates. It does not seem likely that the organisms move from the blood to the stomach. In two cases the bacteria were isolated in the gastric aspirate some days before the onset of septicaemia. According to the concept of colonization resistance (1), germs present in high numbers may surmount the barriers of the intestinal mucosa and immunologic defence mechanisms and lead to infection.

To summarize, we found that gastrostomy generally leads to an abnormal colonization of the stomach and in some cases probably to septicaemia. It was not possible to modulate the gastric flora by oral application of non-absorbable antibiotics. Therefore, the indications for gastrostomy should be reconsidered.

#### REFERENCE

1. VAN DER WAAIJ, D. 1979. The colonization resistance in the digestive tract. In: New criteria for antimicrobial therapy. Excerpta Medica, Amsterdam.

FLORA: MODIFICAZIONI E "RESISTENZA ALLA COLONIZZAZIONE" IN VOLONTARI SANI TRATTATI CON ANTIBIOTICI AD AMPIO SPETTRO

M. Giuliano (a), M. Barza (b) & S. Gorbach (b)

(a) III Clinica Medica, Università degli Studi "La Sapienza", Roma, Italia;  
(b) Tufts-New England Medical Center, Boston, USA

Riassunto. - Sono stati studiati gli effetti sulla flora intestinale umana di Cefoperazone, Cefoxitina, Piperacillina ed Aztreonam ed è stata valutata la loro influenza sulla "resistenza alla colonizzazione" monitorando l'impianto di 2 ceppi marcati somministrati per os. Il Cefoperazone ha presentato gli effetti più marcati su aerobi ed anaerobi, la Cefoxitina ha avuto modesta influenza sulla flora ma ha determinato il maggior incremento di Enterobatteri resistenti, la Piperacillina ha avuto effetti diversi e variabili nei 4 pazienti mentre l'Aztreonam ha avuto impatto significativo solo nei confronti degli aerobi Gram-negativi. Non è stato possibile rinvenire alcuna correlazione tra le modificazioni della flora e la frequenza di impianto e la durata dell'escrezione dei ceppi somministrati, né è presente alcuna differenza significativa tra i 4 gruppi di trattamento e il gruppo di controllo. Questo studio mostra un marcato effetto dei nuovi antibiotici  $\beta$  lattamici sulla flora intestinale, ma sembra non confermare il concetto di "resistenza alla colonizzazione".

Summary (Flora: modifications and "colonization resistance" in healthy volunteers treated with broad-spectrum antibiotics). - We studied the effects on intestinal flora of Cefoperazone, Cefoxitin, Piperacillin and Aztreonam and evaluated their influence on "colonization resistance" monitoring the implantation of two fed marked strains. Cefoperazone showed the most remarkable effect on aerobes and anaerobes, Cefoxitin had little influence on bacterial counts but caused the maximum increase in resistant Enterobacteriaceae, Piperacillin had variable effects while Aztreonam had remarkable impact only versus Gram-negative aerobes. We could not find any correlation between modifications of the flora and the length of carriage of the fed strains; there is no significant difference among the four treatment groups and the control group. This study shows a remarkable effect of the new  $\beta$  lactam antibiotics but fails to support the concept of "colonization resistance".

#### Introduzione

Gli antibiotici ad ampio spettro determinano marcati cambiamenti nella flora intestinale (1). Questo può avere rilevanza clinica. Infatti, diversi studi in anni recenti hanno sottolineato l'importanza della microflora intestinale come meccanismo di prevenzione della colonizzazione del tratto gastroenterico da parte di potenziali patogeni. Questa proprietà è stata chiamata "resistenza alla colonizzazione" (2-4).

Nel nostro studio abbiamo esaminato, in volontari sani, l'impatto di 4 rappresentativi antibiotici  $\beta$  lattamici sulla flora fecale e la loro influenza sull'impianto e la durata dell'escrezione di 2 ceppi marcati somministrati per

os, di Escherichia coli e di Pseudomonas aeruginosa.

### Materiali e Metodi

Venti volontari sani, 15 maschi e 5 femmine, sono stati randomizzati in ciascuno dei seguenti gruppi di trattamento (4 per ogni gruppo): 1) Cefoperazone 4 gr/die; 2) Cefoxitina 8 gr/die; 3) Piperacillina 18 gr/die; 4) Aztreonam 8 gr/die; 5) Controlli: nessun trattamento.

E.coli ( $10^{10}$  U.F.C./ml), resistente all'Acido Nalidixico e Pseudomonas aeruginosa ( $10^7$  U.F.C./ml) sierotipo 6 (Difco), sono stati somministrati per via orale all'8° giorno di trattamento e al 12° giorno (cioè 3 giorni dopo la sospensione della terapia).

I campioni fecali sono stati raccolti prima della somministrazione dell'antibiotico, durante il trattamento (giorni 3, 6, 9) e dopo la sospensione dell'antibiotico (giorni 12, 14) e poi 2 volte alla settimana fino alla scomparsa degli organismi somministrati e al ritorno alla norma della flora.

Un grammo del campione fecale, lavorato entro 1 h dalla raccolta, trasferito in una camera anaerobia, è stato diluito in Phosphate Buffer Saline ed emulsificato con un Vortex. 0,1 ml di diluizioni selezionate è stato inoculato su terreni di arricchimento e selettivi per la determinazione della conta totale aerobi ed anaerobi e per le conte degli Enterobatteri, Enterococchi, Stafilococchi, Pseudomonas, Miceti, Bacteroides fragilis e Clostridium difficile. Tutti i campioni raccolti prima e durante il trattamento sono stati saggiati per la presenza della citotossina del Clostridium difficile.

Le concentrazioni degli antibiotici nelle feci sono state eseguite con metodo microbiologico di diffusione in agar, il 9° e il 12° giorno.

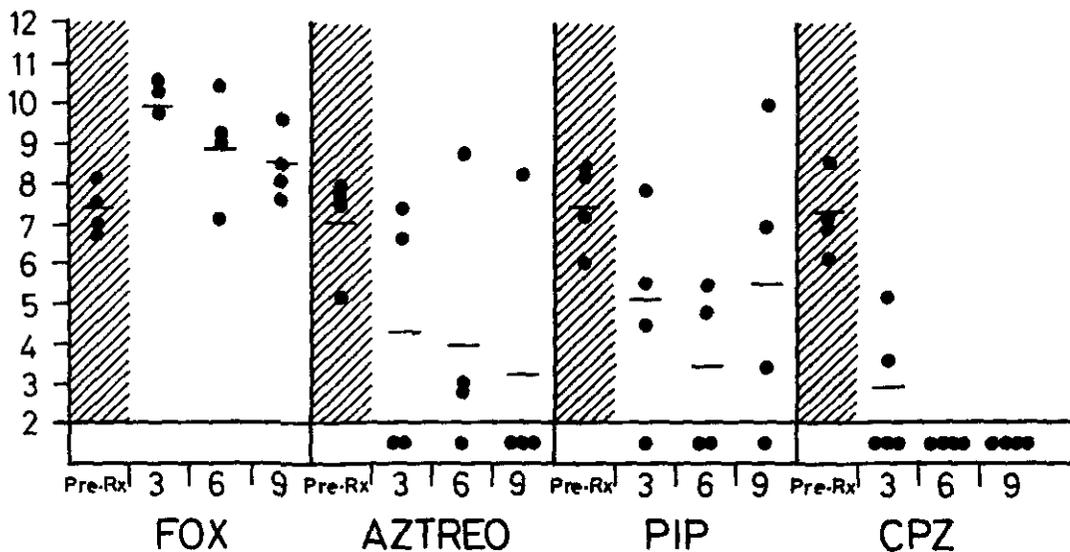


Figura 1. - Effetto dei 4 antibiotici sugli Enterobatteri. In ordinata i logaritmi delle U.C.F./gr. di feci; in ascissa i 4 antibiotici con le determinazioni prima del trattamento (Pre-Rx) e ai giorni 3, 6, 9 di terapia. I punti rappresentano le singole determinazioni, la linea continua la media.

## Risultati

**Concentrazioni degli antibiotici.** - Le concentrazioni ( $\mu\text{g/ml}$ ) degli antibiotici nelle feci determinate l'ultimo giorno di trattamento (9° giorno) sono risultate molto elevate per il Cefoperazone, tra 2727 e 8840 (media 5026), mentre per gli altri gruppi di trattamento solo 1 su 4 pazienti ha presentato livelli determinabili rispettivamente di 8 per la Cefoxitina, 107.6 per la Piperacillina e di 23 per l'Aztreonam. Il 12° giorno le concentrazioni nelle feci del Cefoperazone oscillavano tra 7 e 1800 (media 780.25) mentre in nessun altro dei 3 gruppi di trattamento era dosabile alcuna attività antibatterica 3 giorni dopo la fine della somministrazione.

**Effetti sulla flora.** - Gli effetti sulla flora intestinale sono mostrati nelle Fig. 1-3. Il Cefoperazone ha presentato l'effetto più marcato: in tutti e 4 i pazienti c'è stata soppressione a livelli indeterminabili dei batteri aerobi ed anaerobi ed un notevole incremento nel numero dei miceti (5,8-7,3 logaritmi). Nei 4 pazienti trattati con Cefoxitina si è avuto un aumento (tra 2 e 3,1 logaritmi) degli Enterobatteri, stabilità degli anaerobi, modico aumento nelle conte dei miceti. La Piperacillina ha determinato diminuzione degli Enterobatteri (3,5-5,5 logaritmi), effetti variabili sugli anaerobi, consistente aumento nel numero dei miceti (circa 5 logaritmi). L'Aztreonam ha messo in evidenza un maggior impatto sugli Enterobatteri mentre scarse modificazioni si sono riscontrate a carico degli anaerobi e dei miceti.

E' presente una correlazione inversa statisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) tra la diminuzione degli anaerobi e la sovraccrescita di miceti.

Le colture e la ricerca per la citotossina del C.difficile sono sempre risultate negative.

In tutti e 4 i pazienti trattati con Cefoxitina ed in uno trattato con Piperacillina c'è stato un aumento consistente nelle conte degli aerobi Gram-negativi resistenti, assente nei gruppi dell'Aztreonam e del Cefoperazone. Durante trattamento con Piperacillina e Cefoxitina c'è stato anche un aumento variabile nel numero dei Bacteroides resistenti (da 1 a 7 logaritmi).

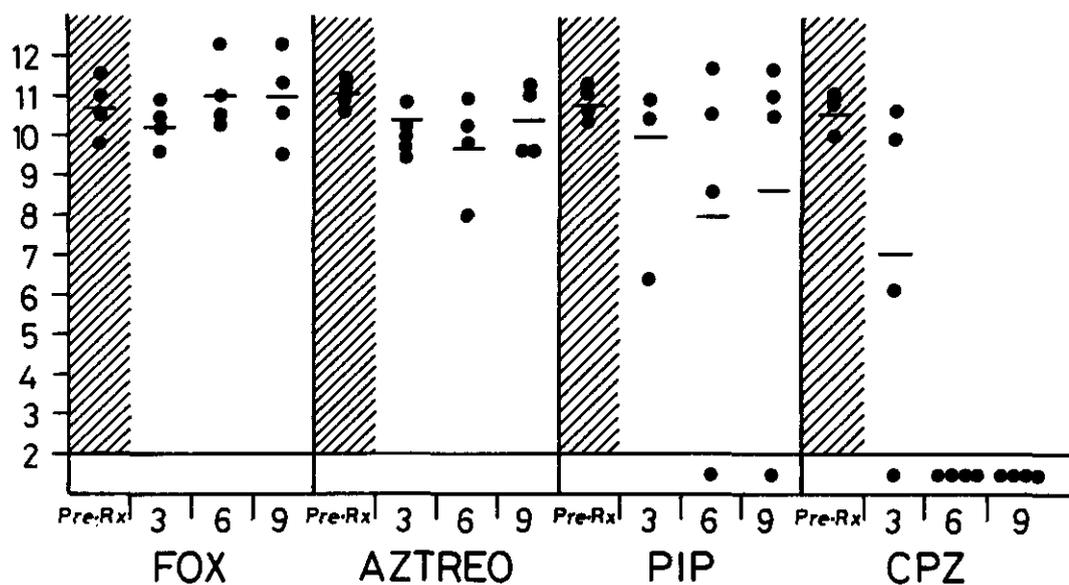


Fig. 2. - Effetto sugli anaerobi.

Resistenza alla colonizzazione. - "Colonizzazione" è stata definita come il rinvenimento del microorganismo somministrato per più di una settimana.

Il ceppo di *E.coli* ha colonizzato solo un paziente con il Cefoperazone. Il ceppo di *Pseudomonas* ha colonizzato 2 pazienti nel gruppo della Cefoxitina, 2 in quello della Piperacillina, 1 in quello dell'Aztreonam e 1 dei controlli. Non c'è nessuna differenza significativa nella percentuale di impianto e nella durata dell'escrezione tra i 4 gruppi di trattamento ed i controlli. Nessuno di questi parametri è correlabile a qualche modificazione della flora.

### Discussione

La potente attività dei nuovi antibiotici  $\beta$  lattamici spesso risulta in marcate alterazioni nella normale flora intestinale. L'entità di questi effetti dipende dal loro spettro di attività in vitro e dalle concentrazioni che essi raggiungono nel lume intestinale.

Le profonde modificazioni che abbiamo osservato con il Cefoperazone sono certamente dovute alla sua escrezione biliare (70% della dose totale) (5) e alle elevatissime concentrazioni che esso raggiunge nel tratto intestinale.

L'Aztreonam ha mostrato effetti significativi solo nei confronti degli aerobi Gram-negativi mentre la Piperacillina ha mostrato effetti diversi e variabili nei 4 pazienti.

La Cefoxitina ha avuto gli effetti più modesti sulla flora ma ha presentato il maggior incremento di Enterobatteri resistenti, fattore da tenere in considerazione nel trattamento dei pazienti immunocompromessi in cui la stessa flora può rappresentare la fonte di una infezione (6).

Nonostante gli effetti diversi prodotti sulla flora da questi 4 antibiotici nessuna vera correlazione è stata trovata tra le modificazioni nella flora intestinale e la così detta "resistenza alla colonizzazione". La colonizzazione da parte dei batteri somministrati si è verificata in pari misura nei 4 gruppi di trattamento e nel gruppo di controllo.

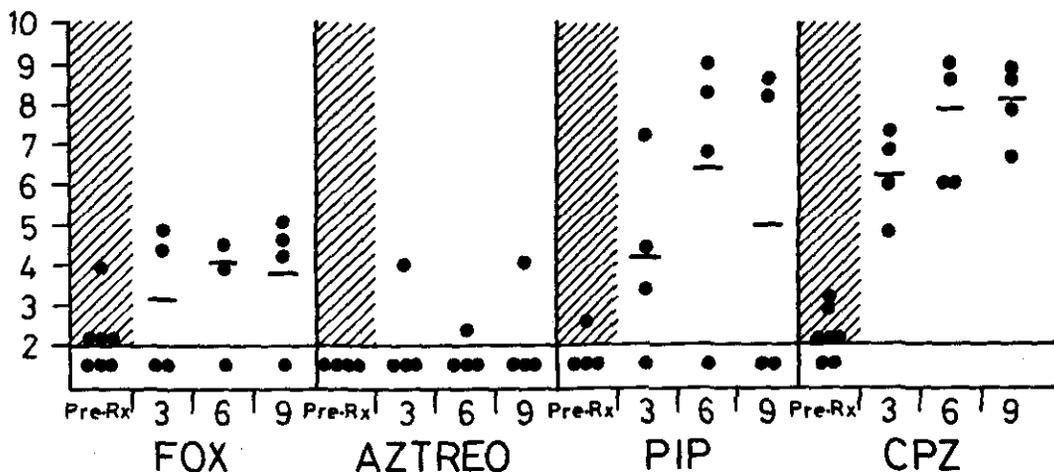


Fig. 3. - Effetto sui miceti.

L'unica correlazione significativa dimostrata è stata tra la diminuzione degli anaerobi e la sovraccrescita di miceti.

Il nostro studio quindi non conferma il concetto di "resistenza alla colonizzazione" almeno come esso è stato riportato fino ad adesso.

Sembra che una diversità di meccanismi operino per escludere i patogeni dal tratto gastrointestinale. Ulteriori studi sarebbero necessari per chiarire il ruolo della flora endogena nella protezione del microambiente intestinale.

#### BIBLIOGRAFIA

1. NORD, C.E., KAGER, L. & HEIMDAHL, A. 1984. Impact of antimicrobial agents on the gastrointestinal microflora and the risk of infections. Am. J. Med. 76: 99-106.
2. VAN DER WAAIJ, D. & BERGHUIS, J.M. 1974. Determination of the colonization resistance of the digestive tract of individual mice. J. Hyg. 72: 379-387.
3. VAN DER WAAIJ, D. 1982. Colonization resistance of the digestive tract: clinical consequences and implications. J. Antimicrob. Chemother. 10: 263-270.
4. KOOPMAN, J.P., WELLING, G.W., HUYBREGTS, A.W.M., MULLINK, J.W.M.A & PRINS, R.A. 1981. Association of germ-free mice with intestinal microfloras. Z. Versuchstierkd 23: 145-154.
5. NAKAMURA, T., HASHIMOTO, I., SAWADA, Y., MIKAMI, J., BEKKI, E., HIRASAWA, S., ABE, H. & WATANABE, Y. 1980. Cefoperazone concentrations in bile and gallbladder wall after intravenous administration. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 980-982.
6. SCHIMPF, S.C., YOUNG, V.M., GREENE, W.H., MOODY, M.R. & WIERNIK, P.H. 1972. Origin of infection in acute nonlymphocytic leukemia: significance of hospital acquisition of potential pathogens. Ann. Intern. Med. 77: 707-714.

## COLONIZATION RESISTANCE AND PREOPERATIVE PREPARATION OF PATIENTS FOR COLORECTAL SURGERY

A.E.J.M. Van den Bogaard & W.F. Weidema

Departments of Medical Microbiology and Surgery, University of Limburg, Maastricht, The Netherlands

**Summary.** - To minimize septic complications modern preoperative preparation of patients for colorectal surgery includes whole gut irrigation (WGI) and the perioperative use of antibiotics. These procedures most likely do affect the colonization resistance of the gastrointestinal tract (CR), which may have the consequence of an increased change of infection. Therefore we investigated the impact of 3 current types of preoperative preparation on the CR in 15 healthy volunteers. The results of this study made us decide that antimicrobial prophylaxis should consist of a short term systemic antibiotic regimen and that fermentable osmotic carthartics such as mannitol should not be used in the lavage procedure operation.

**Riassunto** (Influenza della preparazione preoperatoria per la chirurgia coloretale sulla resistenza alla colonizzazione del tratto gastrointestinale). - Al fine di evitare complicanze infettive post-operatorie, la preparazione dei pazienti da sottoporre a chirurgia colon-rettale include una completa irrigazione intestinale (WGI) e una profilassi con antibiotici. Queste procedure potrebbero però alterare la resistenza alla colonizzazione (CR) del tratto intestinale con conseguente rischio di infezione. A tal fine abbiamo studiato l'impatto di 3 tipi di preparazioni preoperatorie sulla CR di 15 volontari sani. I risultati di questo studio ci portano a concludere che la profilassi antimicrobica dovrebbe consistere in somministrazioni di breve durata e che lassativi osmotici fermentabili quali il mannitolo, non dovrebbero essere usati nelle procedure di lavaggio intestinale.

### Introduction

Colorectal surgery is associated with a high incidence of postoperative sepsis. The obvious reason is the unavoidable heavy contamination of the field of operation by intestinal microorganisms. To prevent spillage of intestinal contents and to minimize contamination, preoperative regimens for elective colorectal surgery include a procedure for reducing the faecal mass. Current methods are mechanical cleansing of the large bowel by whole gut irrigation (WGI). Osmotic cathartics, such as mannitol, are also used either alone or in combination with WGI.

However, although impeccable mechanical cleansing of the gut may be achieved these procedures scarcely reduce the postoperative sepsis rate (1). Therefore, most surgeons use also antimicrobial prophylaxis for colorectal surgery.

Attempts to "sterilize" the colon in vivo by oral administration of mostly nonabsorbable antibiotics, mainly directed against the aerobic flora began more

than 40 years ago (2), but only marginal success in reducing the postoperative sepsis rate was achieved (3, 4). Since then it has become clear, that the obligate anaerobic bacteria (OAB) play an important role in postoperative sepsis. Mixed infections with aerobes and anaerobes have been shown to have an enhanced virulence (5) and protection offered by antimicrobial prophylactic regimens is due to adequate tissue levels of suitable antibiotics at the time of contamination. The prophylactic use of antibiotics for colorectal surgery has as a result of these findings shifted from antibiotics active against the aerobic flora given orally to parenterally administered antibiotics mainly active against AOB. Although from the onset of antibiotic therapy the effect of antibiotics on the colonic microflora has been recognised (6), it is only recently that this effect and especially its consequences for the resistance against colonization and overgrowth by potentially pathogenic microorganisms have seriously been considered. Van der Waaij (7) introduced the concept of colonization resistance (CR) to describe this phenomenon.

Mechanical cleansing of the bowel removes most of the bacterial mass in the colon. In combination with perioperative use of antibiotics this certainly influences the stability of the residual mucosa-associated colonic microflora, and therefore is most likely to affect the CR. Thus, mechanical cleansing of the colon with or without perioperative antimicrobial prophylaxis might actually enhance perioperative colonization of patients with (potentially) pathogenic bacteria and in consequence may influence the perioperative nosocomial infection rate.

Evaluation of the influence of the mechanical cleansing with or without antimicrobial prophylaxis on the CR is for obvious reasons not possible in patients by direct challenge contamination with potentially pathogenic bacteria.

Therefore we embarked upon a study with well informed healthy volunteers to investigate the impact of three different current methods of preoperative bowel preparation on the CR of the gastrointestinal tract.

### Materials and Methods

After premission from ethical committees of the hospital and medical faculty had been obtained, fifteen healthy volunteers (10 males and 5 females with a mean age of 23,4 years) were divided at random into three groups of five volunteers and each group underwent one of the following three currently used methods of large bowel preparation.

Group WGI. - This group was prepared by whole gut irrigation (WGI) as described by Hewitt (8).

Group WGI + AB. - In this group 0,5 g/L metronidazole and 1 g/L neomycin were added to the irrigation fluid.

Group Mann + AB. - WGI was in this group preceded by the administration of 1 L of 10% mannitol solution as an osmotic cathartic.

The next day an antibiotic prophylaxis was given consisting of 80 mg gentamicin i.v. and 500 mg metronidazole orally at 9.00 h and again at 17.00 h.

All three groups were orally challenged one hour after the WGI was finished with  $10^6$  CFU of a neomycin and gentamicin (MIC > 100 mg/L) of a resistant *E.coli* suspended in a glass of milk. After the WGI the volunteers were only allowed to drink clear fluids till the next morning.

Faecal samples were obtained from each volunteer before and after WGI and further daily during the first seven days and once a week there after.

One part of faeces was thoroughly mixed with 9 parts of saline and the homogenates were diluted tenfold ( $10^1 - 10^4$ ). 0,1 ml of the undiluted sample and aliquots of 0,036 ml of the dilutions were spread over plates with 5% sheepblood agar and MacConkey agar containing 100 mg/L neomycin with use of a spiral plater.

## Results

All three methods decreased the CR. The results are shown in Fig. 1. No neomycin resistant bacteria were cultured from any faecal sample taken before challenge, neither could the neomycin resistant E.coli be cultured from faecal samples from 3 healthy untreated volunteers, during one week after challenge.

## Discussion

The CR was more profoundly decreased in group WGI + AB than in both other groups. After colonization the elimination of the E.coli test strain took much longer in this group than in both other groups and even after three months two volunteers were still excreting the E.coli challenge strain. This difference must have been due to the administration of high doses of neomycin and metronidazole with the lavage fluid, resulting in high concentrations of these antibiotics in the colonic lumen. The presence of relatively high levels of neomycin and metronidazole in the colon must have disturbed the interaction between anaerobes and aerobes, resulting in a decrease of the CR. However, it has recently been shown that high oral doses of neomycin cause pathophysiological changes in the mucosa of the colon (9). How far this might have influenced the decrease of the CR of the volunteers in this group can only be a matter of speculation.

## Conclusion

Our observations lead to the conclusion that the oral administration of (especially partly absorbable) antibiotics decreases the CR much more profoundly. Apart from other reasons, such as better efficacy, systemic antimicrobial prophylaxis should be preferred in patients undergoing elective colorectal

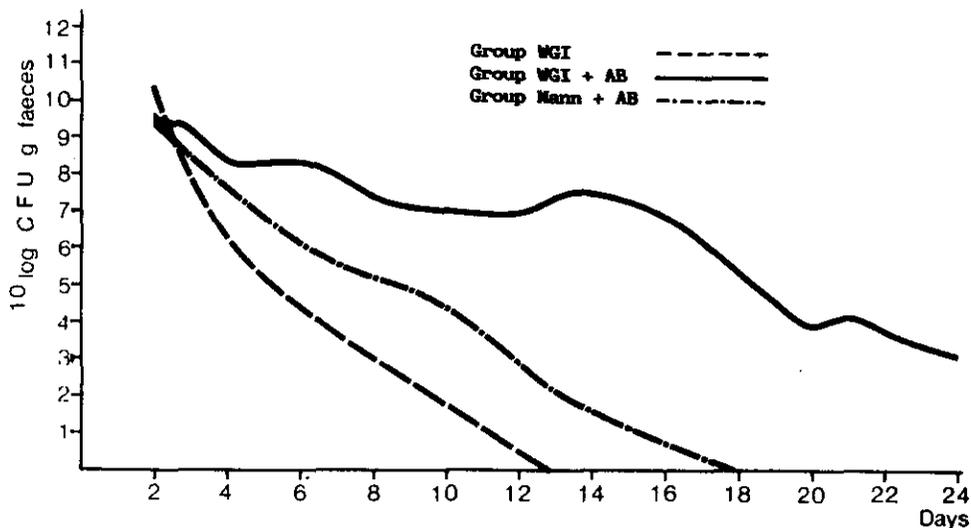


Fig. 1. - Faecal excretion of an E. coli challenge strain after three different types of large bowel preparation

surgery because the disturbance of the CR of the GI-tract is much less, which may be important in the prevention of nosocomial infections.

Acknowledgement: The authors thank Ms. Luciënne Wilting for typing the manuscript.

#### REFERENCES

1. CLARKE, J.S., CONDON, R.E., BARTLETT, J.G., GORBACH, S.L., NICHOLS, R.L. & OCHI, S. 1977. Preoperative oral antibiotics reduce septic complications of colon operations. Ann. Surg. 186: 251-259.
2. GARLOCK, J.H. & SELEY, G.P. 1939. The use of sulfanilamide in surgery of the colon and rectum. Surgery 5: 787-790.
3. BARKER, K., GRAHAM, N.G., MASON, M.C., DE DOMBAL, F.T. & GOLIGHER, J.C. 1971. The relative significance of preoperative oral antibiotics, mechanical bowel preparation and preoperative peritoneal contamination in the avoidance of sepsis after radical surgery for ulcerative colitis and Crohn's disease of the large bowel. Brit. J. Surg. 58: 270-275.
4. BRASS, C., RICHARDS, G.K., RUEDY, J., PRENTIS, J. & HICHEY, F.J. 1976. Preventing infection at the operation site. Brit. Med. J. 2: 773-778.
5. MCGOWAN, K. & GORBACH, S.L. 1981. Anaerobes in mixed infections. J. Inf. Dis. 2: 181-185.
6. WEINSTEIN, L. 1947. The spontaneous occurrence of new bacterial infections during the course of treatment with streptomycin or penicillin. Am. J. Med. Sci. 214: 56-61.
7. VAN DER WAALJ, D., BERGHUIS-DE VRIES, J.M. & LEKKERKERK-VAN DER WEES, J.E.C. 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. J. Hyg. Camb. 69: 405-411.
8. HEWITT, J., REEVE, J., RIGBY, J. & COX, A.G. 1973. Whole gut irrigation in preparation for large bowel surgery. Lancet. 2: 337-340.
9. LONGSTRETH, G.F. & NEWCOMER, A.D. 1975. Drug-induced malabsorption. Mayo Clin. Proc. 50: 284-290.

COMPOSIZIONE DELLA FLORA BATTERICA NELLA SINDROME PREMESTRUALE.  
NOTA PRELIMINARE

E. Bertazzoni Minelli (a), G. Nardo (b), G. Pavanato (b), R. Cerutti (b) & G. Benoni (a)

(a) Istituto di Farmacologia, Università degli Studi, Verona;

(b) Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università degli Studi, Padova, Italia

Riassunto. - E' stata studiata la composizione qualitativa e quantitativa della flora fecale di 53 giovani donne affette da sindrome premenstruale (SPM). Si è osservata una grande variabilità individuale, per cui la gravità della sindrome (classificata in lieve o grave) non influisce in modo significativo sulla composizione delle diverse componenti batteriche, aerobie e anaerobie. L'analisi condotta nel singolo soggetto, durante un intero ciclo mestruale, rivela invece prevalenza di batteri aerobi Gram positivi all'11° giorno e di aerobi Gram negativi (E.coli 1, E.cloacae, C.freundii 1) al 23° giorno del ciclo. Le componenti anaerobie sembrano essere più stabili. Le variazioni della flora batterica, sia qualitative che quantitative, sembrano avere un ruolo rilevante nel determinare la SPM assieme ad altri fattori quali il metabolismo degli ormoni sessuali steroidei.

Summary (Relationship between premenstrual syndrome (PMS) and intestinal microflora in women). - We studied the qualitative and quantitative composition of faecal flora in 53 young women with premenstrual syndrome (PMS). A great intersubject variability was observed; statistically significant changes of aerobic and anaerobic bacteria in women with mild or severe syndrome were not evident. The faecal flora analyzed in the single subject showed that a prevalence of aerobic cocci at 11th day of the cycle and a prevalence of Gram negative bacteria (E.cloacae, C.freundii 1, E.coli 1) at 23rd day of cycle. The anaerobic bacterial flora showed minimal changes. We can hypothesize that the intestinal microbial fluctuations might be a relevant factor in determining the PMS with other phenomena such as the modifications of the sex steroid hormones pattern.

### Introduzione

In questo lavoro è stata studiata la composizione della flora batterica fecale in pazienti affette da sindrome premenstruale.

### Materiali e Metodi

Sono state analizzate le feci di 53 donne affette da sindrome premenstruale lieve o grave con predominante sintomatologia gastrointestinale. Il tipo di gravità della sindrome nelle nostre pazienti è stato definito in base alla classificazione di Hervé (1): lieve, quando i sintomi sono pochi, non gravi, e durano solamente 2 o 3 giorni prima delle mestruazioni; grave, quando i sintomi sono numerosi e gravi, compaiono 8 giorni prima del flusso mestruale e durano

fino alla fine. I soggetti di età compresa fra i 23 e 26 anni, nubili e coniugate, di estrazione socio-culturale media (studentesse e lavoratrici delle provincie di Padova e Verona) presentavano mestruazioni abbastanza regolari per ritmo ( $28 \pm 3$  gg) quantità e durata. In tutti i soggetti l'ovulazione veniva accertata attraverso il dosaggio del progesterone plasmatico in 23<sup>a</sup> giornata del ciclo. Sono stati valutati i parametri ematochimici (SMA 18 - Technicon). Tutte le pazienti esaminate non hanno ricevuto alcun trattamento farmacologico per almeno 1 mese prima dell'esame.

La raccolta delle feci è stata fatta all' 11°-12° e 23° giorno del ciclo. I campioni sono stati prelevati sterilmente al momento dell'emissione e congelati. Vengono allestite diluizioni seriali 1:10 in soluzione 0.15 M di NaCl. Per la valutazione quantitativa dei microrganismi aerobi e anaerobi sono stati utilizzati terreni selettivi secondo una tecnica precedentemente descritta in dettaglio (2). L'identificazione dei batteri è stata eseguita utilizzando il sistema API (3).

Contemporaneamente è stato determinato il pH sulla diluizione iniziale dei campioni di feci impiegati per la determinazione della flora.

Risultati

Il 90% delle pazienti da noi esaminate presentava una instabilità di tipo emozionale e nervoso, il 70% dolori e gonfiore addominali, mentre nel 50% erano presenti irritabilità, depressione, nausea e vomito. Stipsi alternata a diarrea è stata evidenziata nel 30% delle donne da noi esaminate. I valori dei parametri ematochimici sono risultati entro la norma. Il 25% delle pazienti esaminate presentava un ciclo non ovulatorio.

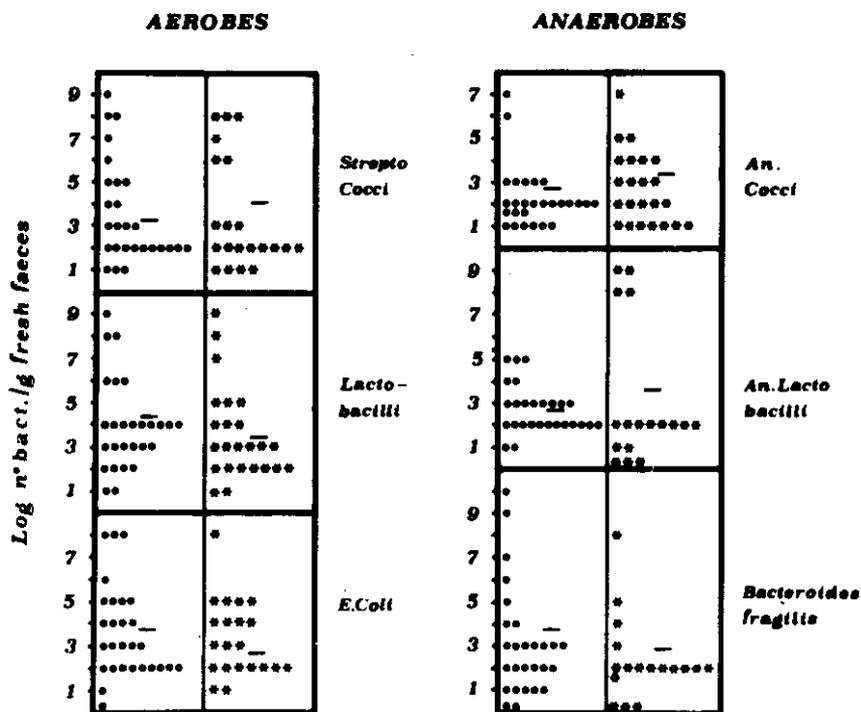


Fig. 1. - Composizione della flora batterica fecale in donne con sindrome pre-mestruale lieve (') e grave (\*) determinata al 23° giorno del ciclo.

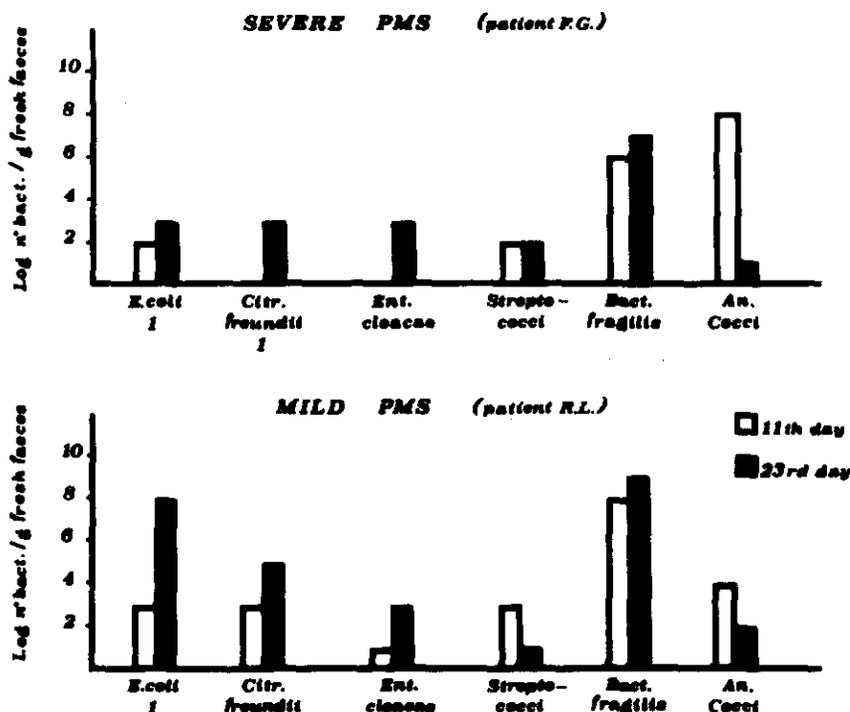


Fig. 2. - Composizione della flora batterica fecale analizzata all'11° e 23° giorno del ciclo in due pazienti con sindrome premenstruale grave o lieve.

Non sono state osservate variazioni statisticamente significative nella composizione della flora batterica fecale aerobia ed anaerobia prelevata al 23° giorno del ciclo nelle 53 pazienti esaminate affette da sindrome premenstruale.

Basse concentrazioni batteriche, come risulta dalla Fig. 1, sono state riscontrate nelle donne da noi esaminate. Inoltre si osserva una grande variabilità fra i soggetti, soprattutto nella sindrome premenstruale di lieve gravità. La flora aerobia è risultata più variabile della anaerobia. Come risulta dalla Fig. 1, la gravità della sindrome non influenza quantitativamente la composizione della flora batterica.

L'analisi della flora batterica fecale in 12 pazienti durante un ciclo completo, presenta, nonostante una grande variabilità tra i soggetti, una prevalenza dei batteri Gram positivi (streptococchi aerobi ed anaerobi) al 11°-12° giorno mentre al 23° giorno prevalgono i batteri Gram negativi, in particolare gli enterobatteri aerobi (*E.coli 1*, *C.freundii 1* e *E.cloacae*).

Un esempio di queste variazioni è rappresentato in Fig. 2, dove è riportata la composizione della flora durante un ciclo completo di due pazienti con diversa gravità di sindrome. In una paziente con SPM grave, *C.freundii 1* e *E.cloacae* aumentavano di circa 3 log mentre i cocchi anaerobi diminuivano di 6 log al 23° giorno del ciclo. In una paziente con SPM lieve *E.coli 1* aumentava da un valore di 3 a 8 log prima del flusso mestruale.

In queste fluttuazioni risulta essere maggiormente implicata la flora aerobia rispetto alla anaerobia. Alle modificazioni della flora batterica aerobia Gram negativa corrisponde un aumento del pH fecale (range 6,5-7,5), che peraltro non assume significatività statistica per la variabilità della composizione della flora nei soggetti esaminati.

## Discussione

I risultati presentati vanno considerati in un quadro generale cui concorrono diversi fattori, quali la fisiologia dell'ospite, le interazioni batteriche e le influenze determinate dall'ambiente stesso.

Benchè la composizione della flora intestinale sia considerata abbastanza stabile, è noto che esistono considerevoli variazioni di composizione fra i diversi individui e che in alcune condizioni vi possono essere delle fluttuazioni (4).

I risultati da noi ottenuti, nella donna con sindrome premestruale, sono in accordo con queste osservazioni. La grande variabilità individuale non ha permesso di evidenziare un rapporto diretto fra la gravità della sindrome e la flora batterica.

Le modificazioni della flora aerobia, in particolare la prevalenza dei batteri Gram negativi, osservata nel singolo soggetto, possono in parte essere concausa della sintomatologia gastrointestinale della SPM.

Bisogna sottolineare, inoltre, che le pazienti da noi esaminate presentavano nel 90% dei casi una sintomatologia di tipo emotivo con interessamento del tratto gastrointestinale. Fra le alterazioni delle normali funzioni fisiologiche, l'aumentata motilità può in parte giustificare la bassa carica batterica osservata nella maggior parte delle nostre pazienti.

Le concentrazioni batteriche influiscono quantitativamente su diversi processi metabolici intestinali. Lombardi e coll. (5) hanno evidenziato che nel metabolismo degli ormoni sessuali steroidei basse concentrazioni batteriche mediano reazioni di tipo ossidativo, mentre elevate concentrazioni determinano reazioni di riduzione.

I meccanismi di ossidazione potrebbero infatti alterare la quantità, ma soprattutto la qualità degli ormoni steroidei metabolizzati nel circolo entero epatico e quindi biologicamente attivi. Ulteriori ricerche dovranno verificare le possibili correlazioni tra influenze dietetiche, ormonali, neurogene (stress) e composizione della flora batterica intestinale.

## BIBLIOGRAFIA

1. HERVE', R. 1968. Encycl. Med. Gyn. 10: 161-162.
2. BERTAZZONI MINELLI, E., BENONI, G., BERTI, T., DEGANELLO, A., ZOPPI, G. & GABURRO, D. 1977. A simplified method for the evaluation of human faecal flora in clinical practice. Helv. Paediat. Acta 32: 471-478.
3. VEILLEUX, B.G. & ROWLAND, I. 1981. Simulation of the rat intestinal ecosystem using a two-stage continuous culture system. J. Gen. Microbiol. 123: 103-115.
4. SIMON, G.L. & GORBACH, S.L. 1984. Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology 86: 174-193.
5. LOMBARDI, P., GOLDIN, B., BOUTIN, E. & GORBACH, S.L. 1978. Metabolism of androgens and estrogens by human fecal microorganisms. J. Steroid Biochem. 9: 795-801.