

El probiótico de la leche materna *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduce la incidencia de infecciones gastrointestinales y del tracto respiratorio superior en bebés

*José Maldonado, †Francisco Cañabate, ‡Luis Sempere, †Francisco Vela, †Ana R. Sánchez, §Eduardo Narbona, ||Eduardo López-Huertas, ‡Arjan Geerlings, ‡Antonio D. Valero, ‡Mónica Olivares, y ¶Federico Lara-Villoslada

Ver "Probióticos": "Fishing in the Ocean" por Vandenplas y Veereman-Wauters, página 4.

Palabras clave: fórmula de seguimiento, bebés, infección, *Lactobacillus fermentum*, probióticos.

(JPGN 2012;54: 55–61)

RESUMEN

Objetivos: El objetivo del estudio fue examinar los efectos de una fórmula de continuación que contiene *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (*L. fermentum*) sobre la incidencia de infecciones en bebés de entre 6 y 12 meses.

Pacientes y métodos: Se realizó un estudio controlado aleatorizado, doble ciego, que incluyó a niños de 6 meses de edad. Los bebés se asignaron al azar a una fórmula de continuación suplementada con *L. fermentum* más galactooligosacáridos (grupo experimental, EG), o la misma fórmula suplementada solo con galactooligosacáridos (grupo de control, CG). El resultado principal fue la incidencia de infecciones durante los seis meses que duró el estudio.

Resultados: El GE mostró una reducción significativa del 46 % en la tasa de incidencia (IR) de infecciones gastrointestinales (EG: 0,196 ± 0,51, GC: 0,363 ± 0,53, índice de IR 0,54, intervalo de confianza [IC] del 95 % 0,307-0,950, P = 0,032), reducción del 27 % en la incidencia de infecciones del tracto respiratorio superior (EG: 0,969 ± 0,96, GC: 1,330 ± 1,23, índice de IR 0,729, IC 95 % 0,46-1,38, P = 0,026) y reducción del 30 % en el número total de infecciones (EG: 1,464 ± 1,15, GC: 2,077 ± 1,59, índice de IR 0,70, IC del 95 %: 0,46–1,38, P = 0,003), al final del período de estudio en comparación con el GC.

Conclusiones: La administración de una fórmula de continuación con *L. fermentum* CECT5716 puede ser útil para la prevención de infecciones gastrointestinales y respiratorias superiores extrahospitalarias.

Las enfermedades infecciosas son el tipo de enfermedad más común para los bebés en todo el mundo. En España, los datos de 2007 muestran que, del total de ingresos hospitalarios por enfermedades infecciosas, el ingreso de menores de 1 año representa > 50 % del total, con una media de 2174 casos por 100.000 personas (1). Los niños amamantados tienen una menor incidencia de infecciones que los niños alimentados con fórmula, lo que podría estar mediado en parte por la modulación de la microflora intestinal por los componentes de la leche materna (2). De hecho, los lactantes alimentados con leche materna parecen desarrollar una microflora intestinal más rica en lactobacilos y bifidobacterias con bacterias patógenas reducidas en comparación con los lactantes alimentados con fórmula (3). Debido a sus múltiples beneficios, la lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida es la forma recomendada de alimentar a los lactantes (4). Cuando la lactancia materna no es posible o insuficiente, la fórmula infantil representa una alternativa destinada a imitar parcialmente los efectos de la leche materna. En la última década, la manipulación de la microbiota intestinal de los lactantes mediante la administración de cepas probióticas ha sido reconocida como una aplicación potencial para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas. En una revisión del Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN), se afirmó que algunos probióticos complementados con fórmulas para lactantes o de continuación pueden estar asociados con una reducción en el riesgo de enfermedades gastrointestinales inespecíficas (GI) y una reducción en el riesgo de uso de antibióticos ((5) y referencias allí). Sin embargo, la evidencia científica que respalda el uso de probióticos para la prevención de enfermedades infecciosas es solo emergente. La eficacia de los probióticos en la prevención de infecciones adquiridas en la comunidad en niños ha sido investigada en varios ensayos controlados aleatorios (RCT) pero los resultados mostrados son contradictorios, mostrando que, aparte de la variabilidad observada entre las poblaciones de estudio, diseños y metodologías; estos sugieren que los efectos observados por una cepa probiótica no se pueden extrapolar a otras (6, 7).

Los prebióticos como los galactooligosacáridos (GOS) son nutrientes no digeribles que se encuentran en la leche materna humana y que estimulan el crecimiento y la actividad metabólica de las bacterias beneficiosas en la flora intestinal, lo que también puede producir un efecto inmunológico directo (8, 9).

La leche materna es una fuente de bacterias del ácido láctico para el intestino del lactante, que puede desempeñar un papel importante en la protección infantil contra agentes infecciosos (10,11). Identificamos y seleccionamos *Lactobacillus fermentum* CECT5716 de la leche materna humana y caracterizamos la seguridad y las propiedades

Recibido el 28 de enero de 2011; aceptado el 17 de julio de 2011.

Del *Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, el †Hospital Poniente de El Ejido, Carretera de Almerimar, El Ejido (Almería), the ‡Biosearch Life SA, Granada, el §Hospital Universitario San Cecilio, Granada, la ||Estación Experimental Zaidín, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Granada, y el ¶Dpto. de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Puleva Food S.L. Granada 18004, España.

Enviar correspondencia y solicitudes de reimpresión a Federico Lara-Villoslada, PhD, Dpto. de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Puleva Food S.L. 66, Camino de Purchil, Granada 18004, España (e-mail: flara@puleva.es). Este trabajo fue apoyado por Puleva Food S.L.

www.clinicaltrials.gov número de registro: NCT012156156.

Los autores no reportan conflictos de interés.

Copyright © 2012 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

DOI: 10.1097/MPG.0b013e3182333f18

probióticas de la cepa utilizando modelos animales in vitro y RCT en adultos humanos (12-15). Debido a que esta cepa probiótica está presente de forma natural en la leche materna humana, planteamos la hipótesis de que su uso en una fórmula de continuación podría beneficiar al bebé alimentado con biberón. En este RCT evaluamos el efecto producido por una fórmula de continuación que contiene *L fermentum* y GOS en comparación con una fórmula de seguimiento de control con solo GOS sobre la incidencia de infecciones en bebés entre las edades de 6 y 12 meses.

PACIENTES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y Protocolo

Se realizó un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con 2 grupos de estudio en colaboración con los servicios de pediatría de 3 hospitales españoles, el Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España), el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España), y Hospital "Poniente" de El Ejido (Almería, España). Las familias que vivían cerca de los hospitales cuyas madres habían dado a luz a sus bebés en el hospital y / o visitaban regularmente al pediatra fueron consideradas para el estudio y la enfermera de la investigación se puso en contacto con ellas durante las visitas programadas al hospital. Antes de la inclusión, los lactantes recibieron un examen físico y se consultaron sus historias clínicas para enfermedades previas y tratamientos farmacológicos. Los bebés sanos de 6 meses que fueron alimentados exclusivamente con fórmula fueron reclutados en el estudio entre mayo de 2008 y julio de 2009 después de que se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres o tutores. Los criterios de exclusión incluyeron trastornos gastrointestinales (antecedentes de diarrea crónica o estreñimiento, reflujo gastroesofágico), cirugía gastrointestinal, alergia a las proteínas de la leche de vaca, trastornos metabólicos (diabetes, intolerancia a la lactosa), inmunodeficiencia, prescripción de antibióticos 1 semana antes de la inclusión y uso previo de la fórmula que contienen prebióticos o probióticos.

El tamaño de la muestra se estimó basándose en los efectos sobre las infecciones gastrointestinales. Con base en datos anteriores sobre la incidencia de diarrea (16), el estudio fue diseñado para tener suficiente poder (85%) para detectar una diferencia del 20 % entre los grupos con un nivel de significancia de 0.05. El número de bebés necesarios en cada grupo fue de 83 bebés; sin embargo, reclutamos un 30 % más de lactantes para permitir los abandonos.

Se seleccionaron un total de 215 lactantes y se distribuyeron en 2 grupos de estudio según una lista de aleatorización generada por un programa informático (SIGESMU, Madrid, España). Las fórmulas administradas fueron en polvo estándar de continuación con composición nutricional de acuerdo con la normativa vigente de la Unión Europea, suplementadas con GOS (0,4 g / 100 mL) en el caso del grupo control (GC), y con las mismas cantidades de GOS más *L fermentum* CECT5716 (*L fermentum Hereditum*, Biosearch Life, Granada, España) a una dosis media de 2,108 unidades formadoras de colonias (UFC) / día en el caso del grupo experimental (EG). La concentración del probiótico en la fórmula se analizó y confirmó cada 2 meses. Ambas fórmulas se consumieron durante el período de intervención de 6 meses. Las fórmulas de continuación fueron proporcionadas por Puleva Food S. L. (Granada, España) en envases idénticos etiquetados en blanco liso con un número de código que hacía referencia a los grupos de estudio. Para asegurar el cegamiento del ensayo, ambas fórmulas fueron sometidas a una prueba sensorial por un panel de expertos que encuentra tanto productos idénticos. Los pediatras prescribieron las cantidades de fórmula por día que se administrarán a los bebés. Los padres recibieron pautas generales para la alimentación complementaria de acuerdo con las pautas actuales de la ESPGHAN (17). Se programó que los bebés recibieran una evaluación clínica al inicio del estudio a los 6 meses de edad (T0), después de los 3 meses a los 9 meses (T3) y después de los 6 meses a los 12 meses (T6). También se recolectaron muestras fecales en T0, T3 y T6. Las fórmulas del estudio se entregaron a los hogares

de los lactantes cada 2 meses y también se recogieron los envases vacíos. Los criterios de exclusión durante el estudio fueron el incumplimiento del protocolo del estudio, los efectos adversos derivados del consumo de alguna de las fórmulas del estudio y la no asistencia a las visitas programadas al hospital.

El presente estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y el protocolo fue aprobado por el comité de ética regional del Sistema Andaluz de Salud con sede en Sevilla (España).

Resultados del Estudio y Colección de Datos

El resultado primario del ensayo fue la incidencia de infecciones, incluidas infecciones gastrointestinales, respiratorias, otitis, urinarias y otras menos comunes. Los resultados secundarios fueron la evolución del peso, la longitud y el perímetro cefálico, los episodios febriles, las prescripciones de antibióticos y las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), inmunoglobulina (Ig) A y composición de la microbiota en las heces. La incidencia de infecciones respiratorias recurrentes (definidas como 3 eventos) también se consideró un resultado secundario.

El diagnóstico de enfermedades infecciosas fue realizado por el pediatra en cada visita basándose en síntomas específicos y definiciones estandarizadas. La infección GI se definió como deposiciones blandas o acuosas al menos 4 veces al día con o sin fiebre o vómitos. Las infecciones del tracto respiratorio superior se definieron como la presencia de mucosidad abundante y / o tos durante ≥ 2 días consecutivos con o sin fiebre, incluyendo resfriado común, laringitis, faringitis / amigdalitis, laringotraqueítis, rinitis y rinosinusitis agudas. Las infecciones del tracto respiratorio inferior se definieron como mucosidad y / o tos durante 2 o más días consecutivos con o sin fiebre y presencia de sibilancias y / o crepitantes, incluyendo bronquitis aguda, bronquiolitis y neumonía. La otitis se definió mediante los siguientes criterios: otalgia, expresada en el lactante como irritabilidad inexplicable o despertar brusco y otorrea reciente o tímpano abultado con o sin enrojecimiento intenso. Las infecciones del tracto urinario se diagnosticaron por fiebre de ≥ 38 °C, piuria (2 resultados consecutivos concordantes con recuentos de glóbulos blancos ≥ 25 / mL) y urocultivo (2 pruebas consecutivas concordantes con crecimiento de solo 1 microorganismo $\geq 100,000$ UFC / mL). En otras infecciones incluimos varicela, conjuntivitis, candidiasis oral, virus de Epstein-Barr, virus del herpes y episodios febriles de origen desconocido.

En el estudio se utilizaron tres tipos de cuestionarios: primero, el cuestionario de visitas programadas, completado por los pediatras durante las visitas programadas (T0, T3, T6), incluyó parámetros de estudio y eventos relacionados con el comportamiento de salud del lactante; segundo, diario de los padres y cuestionarios de 15 días, completados por los padres, en los que se incluye información sobre el número diario de deposiciones, síntomas respiratorios, visitas no programadas al médico, infecciones diagnosticadas, hábitos de sueño y llanto, cambios en el patrón de sueño, episodios febriles, GI se registraron molestias y prescripción de antibióticos. Los diarios se utilizaron como referencia para completar los cuestionarios de 15 días en los que se resumía la información relevante de los diarios. Se les dio instrucciones a los padres sobre cómo completar el cuestionario y se les animó a contactar al personal de investigación si fuera necesario; tercero, cuestionarios ocasionales, completados por pediatras durante visitas no programadas como resultado de una sospecha de infección o un problema de salud. En el caso de una visita al departamento de emergencias, se envió una copia del informe del paciente a pediatría para su inclusión en el archivo de investigación.

Cuantificación de Bacterias Fecales

Las muestras fecales se homogeneizaron individualmente en una solución de peptonosalina (100 mg / mL). Para estimar la concentración de grupos bacterianos, se esparcieron las diluciones apropiadas por cuadruplicado en placas de agar MRS para bacterias

ácido lácticas, agar MRS suplementado con dicloxacilina 0.5 mg / L, LiCl 1 g / L y clorhidrato L-cisteína 0.5 g / L para bifidobacterias y agar clostridial reforzado que contiene 20 mg / mL de polimixina para clostridios y agar biliar y esculina para bacteroides. Todos los medios se obtuvieron de Oxoid (Basingstoke, Reino Unido), mientras que los antibióticos y otros suplementos se obtuvieron de Sigma Chemical Co (St Louis, MO). Las placas de cultivo se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 24 a 48 horas. De manera similar, se extendió 1 mL de cada dilución adecuada en placas de conteo específicas de Petrifilm (3 mol / L; St Paul, MN) para aerobios totales. Las petrifilms se incubaron en aerobiosis a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se contaron las colonias que crecieron en el medio de cultivo selectivo y se calculó el logaritmo del número de microorganismos viables por gramo de heces (unidades formadoras de colonias por gramo) y se representó como el error estándar promedio de la media.

Cuantificación de Ácidos Grasos de Cadena Corta

Las muestras fecales se homogeneizaron con 150 mmol / L de NaHCO₃ (pH 7,8) (1:5, peso / volumen) en una atmósfera de argón. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 37 °C y se almacenaron a - 80 °C hasta la extracción. Para extraer los SCFA, se añadieron 50 µL de 100 mol / L de ácido 2-metilvalérico (patrón interno), 10 µL de ácido sulfúrico y 0,3 mL de acetato de etilo a 1 mL del homogeneizado. La mezcla se centrifugó a 10,000 g durante 5 minutos a 48 °C. Los sobrenadantes se deshidrataron con sulfato de sodio (anhidro) y se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 48°C. Posteriormente, la muestra (0.5 mL) se inoculó sin división en un cromatógrafo de gases (mod. CP-3800; Varian, Lake Forest, CA) equipado con un diámetro interno (CPWAX 52CB 60m 0.25 mm) y se conectó a un detector de ionización de llama. (Varian). Se utilizó helio como gas portador y auxiliar, con un caudal de 1,5 ml / minuto. La temperatura de inyección fue de 250 °C. Las concentraciones de acetato, propionato y butirato se calcularon automáticamente a partir de las áreas de los picos resultantes utilizando el programa Star Chromatography WorkStation (versión 5.5), que se conectó en línea al detector de ionización de llama.

Cuantificación de IgA Fecal

Las muestras fecales se homogeneizaron individualmente en una solución de peptonesalina (100 mg / mL) y se centrifugaron a 10,000 g durante 5 minutos a 4 °C. La concentración de IgA se midió en los sobrenadantes mediante kits de cuantificación de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, siguiendo las instrucciones del fabricante (Bethyl, Montgomery, TX).

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico STATA 11.1 (StataCorp LP, College Station, TX) por un estadístico ciego. El análisis de regresión multinivel de Poisson utilizó el esquema de efectos fijos / intercepto aleatorio considerando 2 niveles de organización de datos: los factores de efectos fijos fueron el grupo (control y experimental) y el período (0-3 meses, 3-6 meses) y el efecto aleatorio factor fueron el niño anidado en el grupo y las medidas del período anidado en cada niño. Las razones de la tasa de incidencia (TIR) se calcularon como medidas del efecto cuando se utilizó el número de eventos como variable dependiente. Todos los datos sobre infecciones ocurridas durante el período de 0 a 6 meses se agruparon y analizaron mediante regresión de Poisson clásica y se calcularon regresiones logísticas clásicas para las variables dependientes correspondientes. Los IR se calcularon como el número de diagnósticos (numerador) dividido por la persona-tiempo contribuido. Las TIR con valores de IC y P del 95 % fueron los resultados del análisis.

Cuando las variables eran numéricas se utilizó el modelo de regresión lineal multinivel como en el caso del anterior. Los resultados de los diferentes centros también se trataron por separado y se compararon y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

RESULTADOS

Población

De los 215 niños aleatorizados en 2 grupos de estudio, 27 fueron excluidos del ensayo: 7 en el GC y 20 en el GE por las siguientes razones: 3 niños se mudaron fuera del área de estudio (1 en el GC y 2 en el GE), 7 bebés no recibieron la fórmula experimental probiótica y el error se detectó después de que no asistieron a la primera visita médica, se excluyeron 7 bebés después de la finalización del estudio debido a la recopilación de datos incompleta (2 en el grupo GC y 5 en el grupo EG) y 10 bebés no acudir a visitas médicas basales (4 en el grupo GC y 6 en el grupo GE). Así, el número total de voluntarios analizados (por protocolo) fue de 188, de los cuales 91 estaban en el grupo GC y 97 en el grupo GE. La figura 1 es un diagrama de flujo de los participantes en el estudio. Antes de la inclusión, ninguno de los niños reclutados consumía fórmula probiótica porque en el momento del reclutamiento no existía fórmula infantil (de 0 a 6 meses) suplementada con probióticos en el mercado español. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros basales analizados (Tabla 1).

Cinco pediatras participaron en el reclutamiento y seguimiento de los niños (JM, FC, FV, ARS y EN) en representación de 3 centros, Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España), Hospital Clínico (Granada, España) y Hospital de Poniente (Almería, España). El número de lactantes reclutados y seguidos por cada centro fue de 68, 64 y 56, respectivamente.

Ingesta de Fórmula y Tolerancia y Crecimiento

Ambas fórmulas de estudio fueron bien toleradas y el cumplimiento fue bueno. No se informaron efectos adversos relacionados con el consumo de las fórmulas (incluidos los síntomas del tracto gastrointestinal superior, como regurgitación) y ninguno de los voluntarios abandonó el ensayo durante el período de intervención. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio con respecto a la ingesta diaria de fórmula (GC: 741 ± 146 mL / día vs EG: 732 ± 150 mL / día; Tabla 1). Los valores iniciales mostraron diferencias significativas entre los grupos para la longitud (P = 0,047) y la circunferencia de la cabeza (P = 0,029) como resultado de la aleatorización. No se encontraron diferencias de peso, longitud, perímetro cefálico y tasa de crecimiento entre los grupos de estudio en los tiempos T3 y T6, lo que indica que el consumo de la fórmula de estudio fue seguro (Tabla 2).

Salud de los Bebés

Durante la intervención de 6 meses, el 72,5% de los lactantes experimentaron infecciones respiratorias, el 15,7% infecciones gastrointestinales, el 5,7% otitis, el 1,8% infecciones urinarias y el 4,2% otras infecciones según se definen en la sección de métodos (Tabla 3).

El GE mostró una reducción significativa del 46% en el IR de las infecciones GI (0,196 0,51) en comparación con el control (0,363 0,53) al final del período de estudio (índice de IR 0,54, IC del 95%: 0,307–0,950, P \leq 0,032). Con respecto a las infecciones respiratorias totales, el GE mostró una reducción significativa del 26% (P = 0,022) en el IR (1,093 1,09) en comparación con el control (1,473 1,31) al final del período (cociente IR 0,74, IC 95% 0,580 –0,957, P \leq 0,022). El 90% del total de infecciones respiratorias fueron infecciones del tracto respiratorio superior. Observamos una reducción del 27% en la

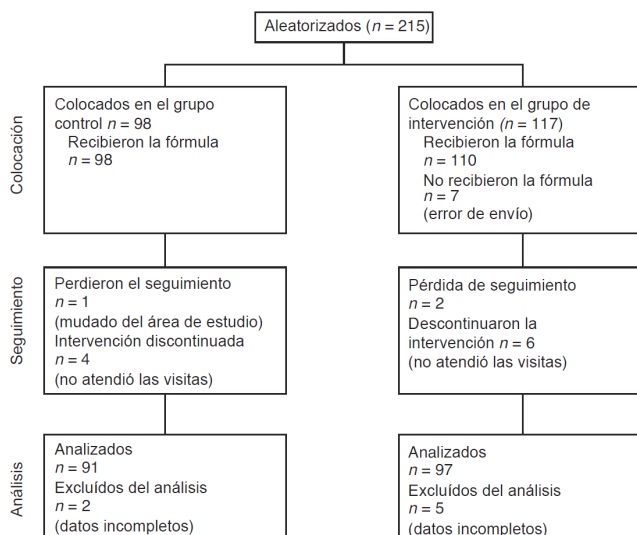


Figura 1. Diagrama de flujo de los participantes

incidencia de infecciones de las vías respiratorias superiores en el GE en comparación con los controles (índice de IR 0,729; IC del 95 %: 0,46–1,38; $p = 0,026$), sin diferencias significativas con respecto a la tasa de infecciones de las vías respiratorias inferiores. El GE también redujo la incidencia de infecciones respiratorias recurrentes en un 72%.

No se encontraron diferencias significativas para las IR de otitis, tracto urinario y otras infecciones posiblemente debido al bajo número de eventos obtenidos en ambos grupos de estudio. Cuando se analizó el número total de infecciones, el GE mostró una reducción significativa del 30% en el IR ($1,464 \pm 1,15$) en comparación con el control ($2,077 \pm 1,59$) en T6 (tasa de IR 0,70, IC del 95 %: 0,46–1,38, $P = 0,003$).

En cuanto al tratamiento antibiótico y al número de episodios febriles, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se detectaron episodios de diarrea asociados con tratamientos con antibióticos en el 17,5 % de los lactantes de control frente al 9,6 % de los lactantes en el GE (no significativo, $p = 0,234$).

Parámetros Fecales

Las muestras fecales de solo 145 lactantes (80 %) en T0, T3 y T6 llegaron al laboratorio en buenas condiciones y fueron analizadas.

Con respecto a la microbiota intestinal (Tabla 4), los recuentos bacterianos tanto de lactobacilos como de bifidobacterias fueron significativamente más altos ($P = 0,008$ y $P = 0,022$, respectivamente) en el GE en comparación con los controles al final del estudio. Las comparaciones dentro del grupo T0 versus T6 solo mostraron tendencias crecientes en el GE para los lactobacilos y bifidobacterias, y tendencias decrecientes en el GC. No se observaron diferencias significativas para los otros grupos bacterianos analizados, y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en AGCC fecales como los ácidos butírico, propiónico y acético. Finalmente, la concentración de IgA en las muestras fecales no cambió durante el estudio en ninguno de los grupos.

DISCUSIÓN

Hemos demostrado que los bebés que recibieron una fórmula de continuación enriquecida con *L. fermentum* demostraron una reducción de las infecciones gastrointestinales y respiratorias. El estudio de los efectos de *L. fermentum* administrado a lactantes se ha realizado por primera vez. Se eligió *L. fermentum* debido a su presencia natural en la leche materna humana (10). Esta cepa también puede colonizar la glándula mamaria cuando se administra a madres lactantes en una cápsula, en comparación con los controles (15). Aparte del origen de *L. fermentum* y su capacidad para colonizar el intestino humano (14), esta cepa fue seleccionada por sus propiedades de seguridad (13, 18), antiinfecciosas (19) e inmunomoduladoras (20). Además, 2 RTCs en adultos han demostrado la capacidad de *L. fermentum* para reducir la incidencia de episodios asociados con la influenza cuando se administra antes y después de la vacunación (14), y para ser una alternativa eficaz al uso de antibióticos para el tratamiento de la mastitis infecciosa durante la lactancia (15). Para investigar los beneficios para la salud del *L. fermentum* en niños sanos, diseñamos este ensayo. Se usó una fórmula de continuación estándar que contiene cantidades moderadas de GOS para ambos grupos, con el objetivo de mejorar teóricamente los efectos de la cepa probiótica, sabiendo que se ha descrito que GOS estimula el crecimiento y la actividad de la flora intestinal beneficiosa (8, 9). Los resultados indican que los bebés que recibieron la fórmula experimental que contiene *L. fermentum* mostraron una incidencia reducida de infecciones gastrointestinales, infecciones respiratorias, incluidas infecciones de las vías respiratorias superiores, y menos enfermedades infecciosas en general al finalizar el estudio, en comparación con los bebés alimentados con la fórmula de control.

El reclutamiento duró 13 meses, incluidas las temporadas durante las cuales las tasas de infecciones respiratorias y gastrointestinales son altas. La definición utilizada para calificar para una infección

Tabla 1. Características basales de los sujetos participantes en el estudio.

	Grupo control, n = 91	Grupo experimental n = 97
Hombre / mujer, n (%)	40/51 (44/56)	54/43 (56/44)
Edad al momento de la inscripción, meses, media \pm DE	6.5 \pm 1.3	6.5 \pm 1.2
Parto por cesárea,%	45	45
Edad gestacional, semanas, media \pm DE	38.9 \pm 1.4	38.8 \pm 1.4
Amamantado antes del periodo de estudio,%	71	69
Duración total de la lactancia materna exclusiva, meses, (rango)	2.8 (0.5–6.5)	3.0 (0.5–6.5)
Volumen diario de fórmula de continuación prescrita, ml, media	741 \pm 146	732 \pm 150
DE Alimentación complementaria,%	100	100
Vacunación contra rotavirus,%	75	74
Guardería o niñera,%	25	27
Mascotas en casa,%	13	16
Tabaquismo durante el embarazo o la lactancia,%	21	21
Fumar en el hogar,% %	37	38

DE = desviación estándar

TABLA 2. Mediciones antropométricas al inicio, T3 y T6 meses, y ganancia T0-T6 de los bebés que recibieron fórmula de control o probiótica

Parámetros de crecimiento	Grupo control				Grupo experimental			
	T0	T3 m	T6 m	Ganancia	T0	T3 m	T6 m	Gain
Peso, kg	7.8 ± 1.0	9.2 ± 1.58	9.9 ± 1.5	2.3 ± 0.7	7.4 ± 1.0	8.8 ± 1.1	9.7 ± 1.5	2.4 ± 0.7
Longitud, cm	66.6 ± 3.2	71.5 ± 2.8	75.2 ± 3.0	8.8 ± 2.4	65.6 ± 3.3*	70.2 ± 4.0	74.3 ± 3.8	8.7 ± 2.3
Circunferencia de la cabeza, cm	43.7 ± 1.4	45.7 ± 1.4	47.1 ± 1.4	3.4 ± 0.9	43.2 ± 1.4*	45.4 ± 1.4	46.6 ± 1.6	3.5 ± 1.0

Los valores son promedio ± SEM.

* P < 0.05 vs control

gastrointestinal (heces blandas o acuosas 4 veces / día) fue más estricta, pero en línea con la definición de diarrea de la Organización Mundial de la Salud (21) o la definición de la ESPGHAN de gastroenteritis aguda (22) y se ha utilizado extensamente en ensayos clínicos que investigan la prevención de la diarrea (23). Utilizando esta definición, las tasas de infección gastrointestinal obtenidas en ambos grupos de estudio coinciden con las IRs comunicadas para los lactantes de este grupo de edad en el sur de España, que varían entre 0,4 y 0,6, con una media de 0,47 episodios al año (24). Las tasas obtenidas en el ensayo para las infecciones respiratorias también coincidieron con los valores informados para los lactantes de esta edad (1).

La tasa de reducción de la infección gastrointestinal observada en el GE es comparable a la de otros ensayos que informaron una prevención exitosa de las infecciones gastrointestinales adquiridas en la comunidad o episodios de diarrea utilizando una fórmula infantil probiótica. Por ejemplo, la administración de una fórmula que contenía 10⁷ UFC / g de *Bifidobacterium lactis* o 10⁷ UFC / g de *Lactobacillus reuteri* a niños de 4 a 10 meses durante un período de 3 meses redujo el número de episodios de diarrea en comparación con el control en 58 % y 92 %, respectivamente (7). En otro estudio que utilizó una fórmula que contenía 2 x 10⁷ UFC / g de *B. lactis* y 14 mg / g de una mezcla prebiótica, la tasa de diarrea se redujo en un 20 % en comparación con el control (25). Un gran ensayo reciente mostró que la administración de 10⁷ UFC / g de *B. longum*, 10⁶ UFC / g de *Streptococcus thermophilus* y 28 mg / g de FOS durante un período de 3 meses redujo la incidencia de infecciones gastrointestinales en un 50 % (26).

Este ensayo mostró una modesta reducción del 26 % en el número total de infecciones respiratorias. Este hallazgo se aplica solo a las

infecciones del tracto respiratorio superior, quizás debido al bajo número de infecciones que afectan al tracto respiratorio inferior (12 en EG y 13 en GC).

Tres estudios también han demostrado reducciones en las infecciones respiratorias con la administración de cepas probióticas a los bebés. En un RCT con 571 niños entre 1 y 6 años, la administración de *Lactobacillus GG* durante un período de 7 meses resultó en una reducción del 17 % en el número de niños que experimentaron infecciones del tracto respiratorio con complicaciones (16). Otro RCT con 281 niños (rango de edad de 1 a 7 años), la administración de *Lactobacillus GG* durante 3 meses, resultó en una reducción del 33 % del riesgo de infecciones del tracto respiratorio superior en comparación con el control (27). Los resultados de un RCT reciente con 69 recién nacidos indican que la administración de *Bifidobacterium animalis* BB-12 redujo el número de infecciones respiratorias en aproximadamente un 30 % en comparación con el control (6). Estudios adicionales informaron tendencias (28) o ningún efecto (7, 16, 26).

Se analizaron muestras fecales para investigar el posible mecanismo responsable de la reducción de las infecciones gastrointestinales. Aunque la producción de SCFA e IgA no cambió durante el estudio, la ingesta de la fórmula experimental resultó en un aumento del 78 % en lactobacillus y del 70 % en bifidobacterias al final del estudio. Estos cambios en la flora intestinal podrían explicar, al menos en parte, las reducciones en el número de episodios gastrointestinales observados en este grupo.

Curiosamente, la población de bifidobacterias aumentó significativamente en el EG a pesar de la suplementación con

TABLA 3. Incidencia de enfermedades infecciosas, episodios febriles y tratamiento antibiótico durante el período de intervención.

	Grupo control, n = 91		Grupo experimental, n = 97		Proporción de la tasa de incidencia (95% CI)	Disminución de la tasa de incidencia, %	P
	No. de eventos	Tasa de incidencia (SD)	No. de eventos	Tasa de incidencia (SD)			
Infecciones gastrointestinales	33	0.363 (0.53)	19	0.196 (0.51)*	0.54 (0.31–0.95)	46	0.032
Infección respiratoria	134	1.470 (1.31)	106	1.093 (1.00)*	0.74 (0.58–0.96)	26	0.022
Respiratorio superior	121	1.330 (1.23)	94	0.969 (0.96)*	0.73 (0.56–0.95)	27	0.021
Respiratorio inferior	13	0.143 (0.35)	12	0.124 (0.33)	0.87 (0.40–1.90)	13	0.719
Otitis	12	0.132 (0.34)	7	0.072 (0.26)	0.55 (0.22–1.32)	45	0.177
Infecciones del tracto urinario	5	0.055 (0.22)	1	0.010 (0.10)	0.19 (0.02–1.56)	81	0.083
Otras infecciones *	5	0.055 (0.22)	9	0.093 (0.29)	1.69 (0.50–1.85)	–69	0.326
Infecciones totales	189	2.08 (1.59)	142	1.46 (1.16)*	0.70 (0.57–0.88)	30	0.002
Episodios febriles	78	0.857 (0.90)	67	0.690 (0.88)	0.81 (0.68–0.94)	19	0.203
Tratamientos con antibióticos	57	0.626 (0.90)	52	0.536 (0.70)	0.86 (0.59–1.24)	14	0.445

IC = intervalo de confianza; SD = desviación estándar.

Otras infecciones incluyen varicela, virus de Epstein-Barr, herpesvirus, candidiasis oral, conjuntivitis y episodios febriles de origen desconocido.

TABLA 4. Recuentos de microbiota intestinal en muestras fecales de lactantes (como logaritmo de UFC / g), concentración fecal de SCFA e IgA

	Grupo control, n = 70			Grupo experimental, n = 75		
	T0	T3 m	T6 m	T0	T3 m	T6 m
Grupo bacteriano						
<i>Lactobacillus</i> spp	7.85 ± 0.1	7.72 ± 0.1	7.68 ± 0.1	7.81 ± 0.1	7.86 ± 0.1	8.06 ± 0.1*
<i>Bifidobacterium</i> spp	8.07 ± 0.1	7.84 ± 0.1	7.81 ± 0.1	7.93 ± 0.1	8.06 ± 0.1	8.16 ± 0.1*
<i>Clostridium</i> spp	7.77 ± 0.1	7.57 ± 0.1	7.54 ± 0.1	7.74 ± 0.1	7.64 ± 0.1	7.61 ± 0.1
<i>Bacteroides</i> spp	7.64 ± 0.1	7.65 ± 0.1	7.61 ± 0.1	7.86 ± 0.1	7.86 ± 0.1	7.65 ± 0.1
SCFA, mg/g de heces						
Acetato	10.7 ± 0.8	10.0 ± 1,3	10.1 ± 0.8	9.9 ± 1.03	9.6 ± 0.5	11.3 ± 1.1
Propionato	1.85 ± 0.1	2.17 ± 0.2	2.17 ± 0.2	2.20 ± 0.4	2.30 ± 0.4	2.35 ± 0.3
Butirato	2.15 ± 0.2	2.76 ± 0.4	2.94 ± 0.2	2.53 ± 0.5	3.05 ± 0.3	2.92 ± 0.3
IgA, µg/g en heces	328 ± 244	ND	322 ± 212	329 ± 170	ND	316 ± 242

Los valores son promedios ± SEM. IgA = inmunoglobulina A; ND = no determinado; SCFA = Ácido graso de cadena corta.

* P < 0,05 frente al control.

lactobacilos solamente. Este fenómeno se ha observado para otras cepas probióticas (29, 30). Se ha sugerido que un aumento de bifidobacterias puede ser el resultado de la actividad metabólica, la competencia de nutrientes y las tasas de adhesión de las células intestinales de los lactobacilos, lo que puede favorecer el crecimiento de bifidobacterias. Utilizando estudios in vitro e in vivo, hemos demostrado que *L. fermentum* presenta una alta tasa de adhesión celular, produce una serie de sustratos antimicrobianos, libera cantidades significativas del antioxidante glutatión y es capaz de sintetizar carbohidratos bifidogénicos bajo ciertas condiciones (11, 19). Además, estudios in vitro han demostrado que *L. fermentum* inhibe la adhesión de determinadas bacterias patógenas al moco intestinal y aumenta la expresión de mucinas, lo que también podría estar implicado en el efecto antiinfeccioso mostrado por esta cepa probiótica (19). Aunque estudios previos han demostrado que *L. fermentum* puede colonizar el intestino (14), *L. fermentum* no fue cuantificado durante este ensayo, lo que limita la interpretación de los resultados. Otra limitación fue que las heces de los bebés diagnosticados con infecciones gastrointestinales no se analizaron para detectar patógenos individuales.

En cuanto al mecanismo de los efectos sobre las infecciones respiratorias, un RCT previo en adultos realizado con *L. fermentum* en combinación con una vacuna antigripal mostró una reducción significativa de la enfermedad pseudogripal (incluidos los síntomas respiratorios) en el GE. La reducción se explicó por aumentos significativos en las proporciones de células asesinas naturales, linfocitos T auxiliares y T-citotóxicos medidos en el EG en comparación con el control (14). En el presente estudio no observamos diferencias en la concentración fecal de IgA. Debido a que no se obtuvieron muestras de sangre de los bebés en el estudio, solo podemos especular que la estimulación de la respuesta inmune es un posible mecanismo responsable de la reducción de las infecciones respiratorias. Además, otra limitación del presente estudio fue la ausencia de un grupo de lactancia materna exclusiva para la comparación.

Se ha informado que la leche materna contiene oligosacáridos que tienen propiedades antiinflamatorias y antiinfecciosas (31). Debido a que ambas fórmulas contenían GOS (0,5 g / 100 Kcal), los efectos observados en el presente estudio no pueden atribuirse a su contenido de GOS. *L. fermentum* y GOS juntos pueden tener un efecto sinérgico que podría ser superior a los beneficios para la salud de los componentes individuales. Sin embargo, estaba fuera del alcance del presente estudio investigar los posibles efectos sinérgicos de la combinación de *L. fermentum* y GOS, que deberían investigarse en estudios futuros.

En conclusión, considerando la disminución significativa en el número de infecciones, la administración de una fórmula de continuación enriquecida con *L. fermentum* puede ser útil para la prevención de infecciones gastrointestinales y respiratorias superiores extrahospitalarias en bebés. Se necesitan estudios clínicos controlados adicionales que investiguen los efectos de *L. fermentum*, solo o en combinación con otras cepas, en diferentes entornos, utilizando biomarcadores y bebés de diferentes grupos de edad antes de poder hacer recomendaciones.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Dr. Juan de Dios Luna del Departamento de Bioestadística de la Universidad de Granada por sus útiles contribuciones al análisis estadístico de datos y a la aleatorización de los lactantes a los diferentes grupos de intervención. Los autores también agradecen a Puleva Food por la fórmula de continuación utilizada en el ensayo y a Biosearch Life S.A. (antes Puleva Biotech S.A.) por los probióticos.

REFERENCIAS

- Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL, Alfaro M. Indicadores de salud 2009. Evolución de los indicadores del estado de salud en España y su magnitud en el contexto de la Unión Europea. Madrid: Ministerio de Sanidad y Política Social; 2009:128.
- Wold AE, Adlerberth I. Breast feeding and the intestinal microflora of the infant—implications for protection against infectious diseases. *Adv Exp Med Biol* 2000;478:77–93.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1035S–45S.
- The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding. Report of an Expert Consultation. WHO/NHD/01.09, WHO/FCH/CAH/01.24. Geneva: World Health Organization; 2001.
- Wolvers D, Antoine JM, Myllyluoma E, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *J Nutr* 2010;140:698S–712S.
- Taipale T, Pienihäkkinen K, Isolauri E, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr* 2010;24:1–7.
- Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 2005;115:5–9.
- Boehm G, Stahl B. Oligosaccharides from milk. *J Nutr* 2007;137 (3 suppl 2):847S–9S.
- Schley PD, Field CJ. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr* 2002;87(suppl 2):S221–30.
- Martin R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003;143:754–8.

11. Martin R, Olivares M, Marin ML, et al. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Hum Lact* 2005;21:8–17.
12. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, et al. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* 2007;98(suppl 1): S96–100.
13. Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, et al. Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Dairy Res* 2009;76:216–21.
14. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007;23:254–60.
15. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, et al. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010;15: 1551–8.
16. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 2001;322:1327.
17. Agostoni C, Decsi T, Fewtrell M, et al. ESPGHAN Committee on Nutrition. Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46:99–110.
18. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA on the introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J* 2007;587:1–16.
19. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, et al. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006;101:72–9.
20. Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 2007;102:337–43.
21. World Health Organization. Diarrhea (definition and sequelae). <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en>. Accessed November 18, 2011.
22. Guarino A, Albano F, Ashkenazi S, et al. ESPGHAN/ESPID, European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/ European Society for Paediatric Infectious Diseases. Evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46:619–21.
23. Johnston BC, Shamseer L, da Costa BR, et al. Measurement issues in trials of pediatric acute diarrheal diseases: a systematic review. *Pediatrics* 2010;126:e222–31.
24. Calderon S. Incidencia de diarreas en una cohorte de niños de la ciudad de Sevilla. *An Esp Pediatr* 1990;32:114–8.
25. Binns CW, Lee AH, Harding H, et al. The CUPDAY Study: prebiotic/probiotic milk product in 1-3-year-old children attending childcare centres. *Acta Paediatr* 2007;96:1646–50.
26. Picaud JC, Chapalain V, Paineau D, et al. Incidence of infectious diseases in infants fed follow-on formula containing synbiotics: an observational study. *Acta Paediatr* 2010;99:1695–700.
27. Hojsak I, Snovak N, Abdovic S, et al. *Lactobacillus GG* in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr* 2010;29:312–6.
28. Puccio G, Cajazzo C, Meli F, et al. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. *Nutrition* 2007;23:1–8.
29. Gueimonde M, Sakata S, Kalliomäki M, et al. Effect of maternal consumption of *Lactobacillus GG* on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:166–70.
30. Sierra S, Lara-Villoslada F, Sempere L, et al. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults. *Anaerobe* 2010;16:195–200.
31. Kunz C, Rudloff S. Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol* 2008; 606:455–65.