

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 848**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2001 E 09164285 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2206507**

54 Título: **Probióticos para su uso en la prevención primaria de enfermedades atópicas**

30 Prioridad:

20.06.2000 FI 20001460

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.08.2019

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Entre-deux-Villes
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**ISOLAURI, ERIKA y
SALMINEN, SEPPO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 721 848 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Probióticos para su uso en la prevención primaria de enfermedades atópicas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las profilaxis de alergias, y se refiere específicamente a la prevención primaria de enfermedades atópicas, mediante la administración de bacterias probióticas, microbios beneficiosos de la flora intestinal sana, pre y post nacimiento, para los niños con alto riesgo de enfermedades atópicas.

10

Antecedentes de la invención

En la actualidad, la alergia, manifestada como enfermedad atópica - eczema atópico, rinitis alérgica, y asma - representa un trastorno crónico de una importancia creciente en los países económicamente desarrollados a lo ancho de todo el mundo. La demostración de una asociación inversa entre las infecciones en la vida temprana y la atopía representa un substancial avance que ha conducido a un interés científico renovado en la hipótesis de higiene introducida hace una década, de acuerdo con lo cual el reciente rápido aumento en la atopía puede de hecho ser debida a una mayor higiene y a un menor tamaño familiar. Recientes estudios epidemiológicos han producido resultados tanto a favor como en contra de esta hipótesis.

20

La microflora gastrointestinal promueve procesos con un potencial para contrarrestar la alergia:

1) inmunidad a los linfocitos T, 2) generación de la transformación del factor β de crecimiento (TGF- β), el cual tiene un papel vital tanto en la supresión de la inflamación alérgica inducida por Th2 como en la inducción de tolerancia oral, y 3) producción de IgA, un componente indispensable en la defensa inmunológica de la mucosa (Sanfilippo *et al.*, 2000; Isolauri *et al.*, 2000). La microflora intestinal puede así representar un importante contrarregulador postnatal del sistema inmunológico universal, desviado por Th2, del embarazo y la edad neonatal. La confrontación con los antígenos microbianos del tracto gastrointestinal empieza inmediatamente después del nacimiento, y las células viables de una microflora intestinal plenamente establecida exceden en número a las del anfitrión multiplicadas por un factor de diez. En consecuencia, los microbios gastrointestinales que allí viven constituyen el estímulo más temprano y más substancial para el desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino.

30

Los probióticos, definidos como ingredientes vivos del alimento microbiano, beneficiosos para la salud, son bacterias que viven de forma normal en la microflora intestinal humana sana. Los géneros más frecuentemente empleados son los lactobacilos y las bifidobacterias. Los probióticos son conocidos por trastocar el aumento de la permeabilidad intestinal, característica de los niños con eczemas atópicos y alergias a la comida, y por potenciar las respuestas de la IgA específica del intestino, frecuentemente en defecto en los niños con alergia a la comida (Isolauri *et al.*, 1993; Majamaa and Isolauri, 1996; Isolauri, 1992). La promoción de la función barrera del intestino por medio de probióticos incluye también la normalización de la microecología del intestino, y de las alteraciones que han sido demostradas en individuos alérgicos. Estudios recientes indican que ciertos probióticos alivian los cambios relacionados con la inflamación alérgica, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Isolauri *et al.*, 2000; Majamaa y Isolauri, 1997). Una cepa probiótica, el *Lactobacillus casei*, ssp. *rhamnosus* (*Lactobacillus* GG; ATCC 53103), se ha demostrado segura a una edad temprana y efectiva en el tratamiento de la inflamación alérgica y de la alergia a la comida. Cepas específicas de la microflora indígena intestinal ejercen así profundos efectos sobre la fisiología e inmunología del anfitrión.

45

En el momento del nacimiento el tracto gastrointestinal humano es estéril, pero durante los primeros meses y años de vida tiene lugar una rápida colonización secuencial, que conduce a una microflora intestinal indígena estable. Simultáneamente, la inmunidad dominante universal Th2 de los recién nacidos se intensifica en los individuos atópicos, con la subsiguiente expresión de la enfermedad atópica. En adición a la microflora normal que impacta sobre el sistema gastrointestinal de los recién nacidos, se hace frente a otra fuente de antígenos masiva y constante en forma de antígenos de la dieta. Recientes estudios en animales indican que estos pueden potenciar la inmunidad del tipo atópico tanto a nivel de las mucosas como a nivel sistémico. Cualquier procedimiento diseñado para contrarregular la alergia debe por lo tanto ejercer sus principales efectos en la infancia, y de preferencia durante los encuentros iniciales con los antígenos de la dieta. Aquí es donde los probióticos son eminentemente apropiados para la tarea, no solamente en lo referente al momento sino también por su capacidad para reducir la carga de antígenos de la dieta por degradación y modificación de las macromoléculas (Pessi *et al.*, 1998).

50

Resumen de la invención

En la presente solicitud, demostramos clínicamente que los probióticos específicos reducen substancialmente la prevalencia del eczema atópico, lo cual indica que tales microbios previenen la enfermedad atópica. Por otra parte, posteriores datos obtenidos en nuestros estudios de colonización intestinal con bifidobacterias, descritos en esta solicitud, demuestran que las diferencias en la microflora intestinal preceden al desarrollo de la atopía. Tomando como base estos datos, nosotros proponemos que la exposición a cepas específicas de microflora comensal representa una llave protectora modular de inmunidad contra la atopía y las subsiguientes enfermedades atópicas y,

65

en consecuencia que los probióticos que promueven tempranamente una microflora intestinal bifidogénica, tienen un potencial preventivo de la alergia.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1, muestra el perfil del ensayo con el *Lactobacillus* GG.
- 10 La figura 2, muestra la media geométrica de las concentraciones del total de anticuerpos IgE durante los dos primeros años de vida en niños sanos (círculo blanco) y niños con eczema atópico a la edad de dos años (círculo negro). Los segmentos de error representan el intervalo de confianza del 95 %. *p=0,009 y †p=0,02, niños con eczema atópico frente a niños sanos (ensayo t desapareado).
- 15 La figura 3, muestra un dendograma que representa las similitudes relativas de los perfiles de ácido graso bacteriano en muestras fecales analizadas mediante cromatografía gas-líquida, en una escala de 0 a 100 entre muestras de atópicos y no atópicos, a las 3 semanas y a los 3 meses.

Descripción detallada de la invención

- 20 La invención se define por las reivindicaciones.
- 25 La presente invención proporciona bacterias probióticas para su uso en una composición para la prevención primaria de enfermedades atópicas en un niño con alto riesgo de dichas enfermedades, administrándose en dicho método a una mujer embarazada una dosis diaria de bacterias probióticas vivas durante por lo menos dos semanas antes del alumbramiento, y después del alumbramiento, se administra una dosis diaria de bacterias probióticas vivas de al niño recién nacido, durante por lo menos 2 meses.
- 30 Después del alumbramiento, las bacterias probióticas pueden ser administradas vía madre lactante o directamente al niño recién nacido. Puede emplearse cualquier dosis diaria de bacterias que den el efecto deseado, siendo una dosis adecuada, desde 1×10^8 hasta 1×10^{10} unidades formadoras de colonias de bacterias probióticas.
- 35 Por consiguiente, la invención también se refiere al uso de bacterias probióticas para la preparación de una composición útil para la prevención primaria de enfermedades atópicas en un niño que se encuentre en alto riesgo de enfermedades atópicas, para su administración de acuerdo con la pauta indicada anteriormente.
- 40 Las bacterias probióticas que pueden usarse en esta invención son, por ejemplo, bacterias del ácido láctico o bifidobacterias. Una cepa bacteriana del ácido láctico adecuada es *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (ATCC 53103) y una cepa bifidobacteriana adecuada es *Bifidobacterium lactis* Bb-12. Asimismo, pueden usarse otras cepas bacterianas que hayan mostrado características probióticas. Además, puede administrarse una mezcla de bacterias del ácido láctico y bifidobacterias.
- 45 Los probióticos preferidos a efectos de la presente invención son bacterias probióticas que tienen las características de promover tempranamente una microflora intestinal bifidogénica. Tales probióticos refuerzan la integridad del intestino y aumentan la proporción de bifidobacterias en la microflora intestinal.
- 50 Cuando se administran las bacterias probióticas de acuerdo con la presente invención a un niño con alto riesgo, con el fin de prevenir primariamente la enfermedad atópica, la flora intestinal del niño se ve afectada propiciamente. Cuando se comienza el tratamiento durante el embarazo de la madre, la cantidad de factores de protección tales como las citocinas antiinflamatorias de la leche del pecho, aumentarán. Mediante la prevención de un estado inflamatorio alérgico de esta manera, es posible prevenir la aparición de una enfermedad atópica.
- 55 La expresión "prevención primaria" empleada en la presente solicitud significa un tratamiento profiláctico con la finalidad de prevenir totalmente la aparición de una enfermedad en un individuo de riesgo. Por otra parte, la expresión "prevención secundaria" empleada en la técnica, se entiende que incluye los medios para prevenir o aliviar los síntomas de una enfermedad alérgica ya aparecida o desarrollada, por ejemplo la prevención de alergia a la comida mediante la eliminación de los ingredientes alimenticios de la dieta que producen la alergia.
- 60 El presente estudio es la primera demostración prospectiva clínica de un microbio específico que previene la enfermedad atópica y esta nueva idea puede proporcionar una excelente oportunidad para diseñar nuevas estrategias contra la alergia.
- 65 En el presente estudio, el *Lactobacillus* GG (ATCC 53103) se introdujo prenatalmente por vía de la madre y postnatalmente durante 6 meses a los niños con alto riesgo de enfermedades atópicas en una prueba de doble ciego, randomizado controlado por placebo, de prevención de la enfermedad atópica.
- Un criterio de inclusión para el estudio fue la historia familiar de enfermedad atópica, es decir, uno o más miembros de la familia (madre, padre y/o hermanos mayores) con eczema atópico, rinitis alérgica o asma. Las familias fueron

reclutadas en clínicas antenatales en la ciudad de Turku (población 170.000) entre febrero de 1997 y enero de 1998, durante un año, para evitar el efecto del mes de nacimiento sobre la sensibilización atópica. Un total de 159 madres fueron randomizadas por medio de un ordenador para recibir dos cápsulas de placebo (celulosa microcristalina) o 1×10^{10} unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* GG (Valio Ltd, Finlandia) una vez al día durante 2 a 4 semanas antes del alumbramiento. Después del alumbramiento, las madres lactantes tuvieron la opción de consumir ellas mismas las cápsulas, o de otra manera, los agentes se introdujeron en las dietas de los niños. En el último caso, los contenidos de la cápsula se administraron con cuchara después del mezclado en agua. Los dos modos de administración, vía madre o al niño, se ha demostrado que dan por resultado cantidades comparables de *Lactobacillus* GG en las heces de los niños (Majamaa Isolauri, 1997). El *Lactobacillus* GG y las cápsulas de placebo y sus contenidos tenían idéntico aspecto, olor y sabor. Las cápsulas fueron consumidas durante 6 meses post natalmente. Los códigos fueron guardados por el suministrador hasta que todos los datos fueron recogidos y analizados. El estudio fue aprobado por el Comité de Prácticas Éticas del Hospital de la Universidad de Turku y la Oficina de Sanidad de la ciudad de Turku. El consentimiento informado por escrito se obtuvo de los padres de los niños.

Los niños fueron clínicamente e inmunológicamente examinados durante el periodo neonatal y después de visitas de estudio subsiguientes, a las edades de 3, 6, 12, 18 y 24 meses de vida. Un examen médico, efectuado siempre por el mismo médico, incluyó la inspección de ojos, orejas, nariz y piel, auscultación del corazón y pulmones, palpación del abdomen, y evaluación del crecimiento y desarrollo neurológico. Los padres fueron interrogados acerca de las señales de sus niños y síntomas posiblemente relacionados con enfermedades atópicas (piel: rojez, sequedad, moqueo, rasguños (prurito); ojos y nariz: rojez, descarga, estornudos, rozaduras (prurito); pulmones: tos, jadeo, insuficiencia respiratoria). Se efectuaron ensayos del IgE total en suero y anticuerpos específicos de IgE a la leche, huevos, ácaros del polvo de la casa y del gato, con el inmunoensayo CAP FEIA de Pharmacia en un analizador automático UniCAP 100 (Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un valor de IgE específico del antígeno, mayor de 0,35 kU/l, se consideró que había aumentado. Las reacciones del ensayo de punción en la piel se leyeron a los 10 minutos, y la mitad del dihidrocloruro de histamina (10 mg/ml; ALK Abellö, Horsholm, Dinamarca; ALK), tamaño de reacción (2+) o más, se registró como positivo con la condición de que el diámetro medio de la roncha fuera por lo menos de 3 mm y el control negativo (ALK) en el mismo tiempo fue de 0 mm.

Los antígenos ensayados incluyeron la leche conteniendo 1,5 % de grasa, harina de trigo diluida 1:10 (w/v) con cloruro de sodio al 0,9 % (w/v), harina de centeno diluida 1: 10 (w/v) con cloruro de sodio al 0,9 % (w/v), gliadina diluida 1:1000 (w/v) con cloruro de sodio al 0,9 % (w/v), blanco de huevo (ALK), bacalao (ALK), habas de soja (ALK), látex (Stallergens, Francia), abedul (ALK), seis pastos locales (todos de ALK), gato (ALK), perro (ALK) y el alérgeno *Dermatophagoides pteronyssimus* Der p1 (ALK). Además, se ensayaron los plátanos, patatas y zanahorias mediante la técnica de la punción-punción. Los resultados de la punción en la piel fueron considerados positivos cuando un niño mostró por lo menos una reacción positiva al antígeno ensayado.

El eczema atópico recurrente crónico, a la edad de dos años, fue considerado el punto final primario, dado que representa la principal manifestación de enfermedades atópicas durante los primeros años de vida. Los individuos se agruparon en los que sufrían este trastorno (niños con eczema atópico), o no (niños sanos). El eczema atópico se confirmó cuando se detectaron los siguientes hechos: prurito, lesión facial y/o del músculo extensor, curso recurrente crónico. El criterio últimamente mencionado se cumplió cuando hubo un eczema manifiesto con una duración de un mes o más en la visita de estudio a los 24 meses y después de por lo menos una visita previa. El cuarto criterio importante, una historia familiar de enfermedad atópica, fue un criterio de inclusión para el estudio. El diagnóstico de una rinitis alérgica se estableció si dos o más subsiguientes síntomas fueron experimentados en la mayoría de los días: descarga nasal, bloqueo, estornudo, y comezón. Una relación temporal de estos síntomas con la exposición al alérgeno, reavivamiento de los síntomas después del tratamiento antihistamínico, y evidencia de una sensibilización atópica (es decir, ensayo de punción cutánea positivo y/o ensayo radioalergosorbente positivo) fueron *sine qua non*. El diagnóstico del asma se basó en un algoritmo creado por un grupo pediátrico internacional de consenso sobre el asma. El asma se diagnosticó cuando el niño tuvo tos crónica o recurrente, respiración sibilante y/o insuficiencia respiratoria sospechosa de asma, cuando fueron excluidos diagnósticos alternativos, y cuando el ensayo de tratamiento antiasmático fue efectivo.

Las características de la línea base de los individuos del estudio fueron similares en los grupos de placebo y de *Lactobacillus* GG (Tabla 1). Un total de 132/159 (83 %) de individuos completaron los 2 años de estudio. Con por lo menos 56 individuos en ambos grupos, pudo ser detectada una reducción absoluta del riesgo del 25 % (50 % del riesgo en el grupo placebo y 25 % en el grupo del *Lactobacillus* GG) de prevalencia de una enfermedad atópica a un nivel del 5 % de significancia con un 80 % de potencia. Las respectivas proporciones de discontinuación fueron comparables (figura 1).

El eczema atópico se diagnosticó en 46/132 (35 %) niños a la edad de dos años. Cinco de estos niños cumplieron también los criterios de diagnóstico para el asma, y uno para el asma y la rinitis alérgica. La duración de la lactancia fue comparable entre niños que habían manifestado un eczema atópico, 7,0 (5,8 a 8,2) meses y los que no, 6,7 (5,9 a 7,5) meses; media (95 % CI) ($p=0,65$ en el ensayo t desparejado). La edad de aparición de síntomas del eczema atópico fue de 4,9 (3,9 a 6,2) meses; media geométrica (95 % CI)). El objetivo SCORED a la edad de 24 meses fue

de 10 (9 a 11) en niños con eczema atópico; media geométrica (95 % CI). En los niños con eczema atópico, las concentraciones progresivas de IgE se manifestaron a la edad de dos años (figura 2). El ensayo de punción cutánea, de la reactividad a los antígenos medioambientales comunes fue más corriente en los niños con eczema atópico que en niños sanos a la edad de 12 y 14 meses ($p=0,03$ y $p=0,01$, respectivamente mediante el ensayo de χ^2), mientras que la frecuencia de las mayores concentraciones de la IgE específica para un antígeno, en suero, fue comparable entre los grupos ($p=0,22$ y $0,31$, respectivamente mediante el ensayo χ^2). Los antígenos más corrientes que indujeron reacciones positivas por cualquier método fueron los huevos y la leche de vaca.

El predominio de un eczema atópico se redujo a la mitad en niños a los que se dio el probiótico, 15/64 (23 %), comparado con aquellos que habían recibido el placebo 31/68 (46 %) ($p=0,008$ mediante el ensayo χ^2). El número necesario para tratar con el 95 % de CI fue 4,5 (2,6 a 15,6).

La mayoría de madres, 28/43 (65 %), del grupo probiótico que daban de mamar durante por lo menos 6 meses, escogieron la opción de consumir ellas mismas las cápsulas probióticas. El efecto preventivo no dependió del modo de administración dado que el eczema atópico del grupo de intervención *Lactobacillus* GG, se diagnosticó en 9/36 (25 %) casos cuando los niños consumieron los probióticos ellos mismos, y en 6/28 (21 %) casos, cuando la cepa fue consumida por las madres lactantes ($p=0,74$ mediante el ensayo χ^2). El efecto preventivo del *Lactobacillus* GG fue más acentuado en los niños que ya mostraban anticuerpos IgE en el cordón umbilical; 3/20 (15 %) niños con IgE detectable en el cordón umbilical que recibieron *Lactobacillus* GG, desarrollaron un eczema atópico, comparado con 9/19 (47 %) que habían recibido el placebo; riesgo relativo 0,32 (0,10 a 0,99) ($p=0,03$ mediante el ensayo χ^2). La concentración de IgE total y las frecuencias de las mayores concentraciones de IgE específicas de un antígeno, y de las reacciones positivas en los ensayos de punción cutánea, fueron comparables entre niños que consumieron el probiótico y aquellos que recibieron el placebo (tabla 2). La frecuencia de los casos con una concentración total alta de IgE ($>93,3$ kU/l), tuvo tendencia a ser menor en el grupo probiótico, 11/61 (18 %), que en el grupo placebo, 17/63 (27 %), a los dos años; riesgo relativo (95 % CI) 0,67 (0,34 a 1,29). La concentración total de IgE fue estimada alta, cuando fue mayor que la concentración geométrica media de la IgE total + la desviación estándar en los niños sin enfermedad atópica.

Tabla 1: comparación de las características de la línea base de los individuos del estudio

	Grupo placebo (n=82)	<i>Lactobacillus</i> GG grupo (n=77)
Historial familiar:		
Enfermedad materna atópica	63/82 (77 %)	55/77 (71 %)
Hermanos mayores	30/82 (37 %)	26/37 (34 %)
Padre(s) fumador(es)	17/82 (21 %)	9/77 (12 %)
Animal peludo en casa	9/82 (11 %)	16/77 (21 %)
Características del nacimiento:		
Semanas de gestación ^{a)}	39,4 (39,0 a 39,7)	39,4 (39,0 a 39,7)
Género masculino	43/82 (52 %)	49/77 (64 %)
IgE del cordón umbilical (kU/l) ^{b)}	0,04 (0,02 a 0,06)	0,06 (0,03 a 0,12)
Circunferencia de la cabeza (cm) ^{a)}	35,0 (34,7 a 35,3)	35,2 (34,8 a 35,5)
Peso (g) ^{a)}	3610 (3510 a 3720)	3630 (3520 a 3740)

Los valores son números (tantos por ciento) de casos de enfermedad atópica materna, hermanos mayores, padre(s) fumador(es) y animal peludo en casa.

^{a)} El valor representa la media (intervalo de confianza del 95 %)

^{b)} El valor representa la media geométrica (intervalo de confianza del 95 %)

Tabla 2: Sensibilización atópica de los grupos intervinientes

	Grupo placebo (n=68)	Grupo del <i>Lactobacillus</i> GG (n=64)	Valor p
IgE total (kU/l) ^{a)} :			
3 meses	3,0 (2,4 a 3,7)	3,1 (2,5 a 4,0)	0,79 ^{d)}
12 meses	9,7 (7,0 a 13,4)	11,2 (8,0 a 15,7)	0,55 ^{d)}
24 meses	32,7 (22,6 a 47,3)	31,3 (22,8 a 43,0)	0,85 ^{d)}
Lecturas aumentadas de RAST ^{b)} :			
3 meses	2/66 (3 %)	2/58 (3 %)	0,90 ^{e)}
12 meses	15/66 (23 %)	16/62 (26 %)	0,68 ^{e)}
24 meses	16/64 (25 %)	17/62 (27 %)	0,76 ^{e)}
Reactividad del ensayo de punción cutánea ^{c)} :			
6 meses	7/68 (10 %)	11/64 (17 %)	0,25 ^{e)}
12 meses	12/68 (18 %)	17/63 (27 %)	0,20 ^{e)}
24 meses	9/65 (14 %)	11/61 (18 %)	0,52 ^{e)}

(continuación)

Grupo placebo (n=68)	Grupo del <i>Lactobacillus</i> GG (n =64)	Valor p
<p>^{a)} El valor representa la media geométrica (intervalo de confianza del 95 %). El valor representa los números (tantos por cientos) de los niños que muestran por lo menos ^{b)} una concentración aumentada (> 0,35 kU/l) de IgE específica de un antígeno, en un ensayo radioalergosorbente (RAST), o ^{c)} una reacción positiva en el ensayo de punción cutánea. ^{d)} Ensayo t desparejado, y ^{e)} ensayo χ^2 (placebo frente a <i>Lacto-bacillus</i> GG).</p>		

Estudios de colonización del intestino

5 En los estudios con bifidobacterias hemos seguido prospectivamente 76 niños con alto riesgo desde el nacimiento hasta la edad de un año, determinándose el desarrollo de la sensibilidad atópica mediante el ensayo de punción cutánea. Dado que la estimulación microbiana principal y primaria tiene lugar durante el establecimiento de la microflora intestinal, formulamos la hipótesis de que las exposiciones a infecciones esporádicas sobrepasaban la microflora comensal, y que esto podía estar relacionado con otros cambios que predisponían a la atopía, representando así un modulador clave del sistema inmunológico del recién nacido.

10 La investigación sobre la microflora gastrointestinal mediante el cultivo convencional de bacterias se ha visto perjudicada por la falta de sensibilidad de los métodos de dictamen, puesto que casi la mitad de las bacterias en el intestino son incultivables, pero sin embargo, viables. Por lo tanto utilizamos, además del cultivo de las bacterias dos métodos independientes del cultivo: la cromatografía líquida de gases (GLC) de los ácidos grasos celulares bacterianos y la hibridación *in situ* por fluorescencia cuantitativa (FISH) de las células bacterianas, para caracterizar la microflora intestinal durante los primeros meses de vida de los niños después de desarrollar o no desarrollar la atopía.

20 Individuos y diseño del estudio

25 El grupo humano del estudio comprendió 76 familias voluntarias con 76 niños recién nacidos, seleccionadas al azar entre la población de un estudio de prevención de la alergia evaluando el potencial preventivo de probióticos en la atopía. En esta población de estudio, 30/76 (39 %) niños tenían uno y 46/76 (61 %) tenían varios primeros grados estrechamente relacionados con el eczema atópico, la rinitis alérgica o el asma.

30 El estudio fue aprobado por el Comité de Prácticas Éticas del Hospital Central de la Universidad de Turku, y por la Oficina de Sanidad de la ciudad de Turku. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres de los niños.

35 Los niños habían nacido entre las 36 y 42 semanas de gestación (40 de promedio). Habían sido clínicamente examinados con una edad de 2 días, 3 semanas, y 3, 6 y 12 meses. Se registraron todas las señales y síntomas de una enfermedad atópica. La sensibilización atópica a la edad de 12 meses, evaluada mediante el ensayo de punción cutánea, se consideró un punto final primario. Los niños fueron considerados atópicos cuando evidenciaron por lo menos una reacción positiva a los antígenos ensayados, mientras que aquellos sin reacción positiva fueron considerados no atópicos. Se aplicó un método con leche de vaca controlado por placebo, doble ciego, cuando los síntomas, señales clínicas, o ensayos de punción cutánea, sugirieron una alergia a la leche de vaca.

40 Diagnóstico de dermatitis atópica

El diagnóstico de dermatitis atópica se basó sobre criterios previamente descritos (Hanifin, 1991). En resumen, la dermatitis atópica se confirmó cuando se detectaron los siguientes tres hechos principales: prurito, morfología y distribución típicas, y dermatitis crónica (duración de un mes o más).

45 Evaluación de la sensibilización atópica

50 La sensibilización atópica se evaluó mediante un ensayo de punción cutánea como se ha descrito previamente (Majamaa e Isolauri, 1997). Las reacciones se registraron a los 10 minutos, y la mitad del dihidrocloruro de histamina (10 mg/ml; ALK Abelló, Horsholm, Dinamarca; ALK), tamaño de reacción (+2) o más, se registró como positivo con la condición de que el diámetro medio de la roncha fue de por lo menos de 3 mm, y el control negativo (ALK) en el mismo tiempo fue de 0 mm. Los antígenos ensayados incluyeron la leche conteniendo 1,5 % de grasa, la harina de trigo diluida 1:10 (w/v) con cloruro de sodio al 0,9 % (w/v), harina de centeno diluida 1:10 (w/v) con cloruro de sodio al 0,9 % (w/v), gliadina diluida 1:1000 con cloruro de sodio al 0,9 % (w/v), blanco de huevo (ALK), bacalao (ALK), habas de soja (ALK), látex (Stallergens, Francia), abedul (ALK), 6 pastos locales (ALK), gato (ALK), perro (ALK) y el alérgeno Der p1 *Dermatophagoides pteronyssimus* (ALK). Además, el plátano, la patata y la zanahoria, se ensayaron mediante la técnica de la punción cutánea.

Diagnóstico de la alergia a la leche de vaca

El diagnóstico de la alergia a la leche de vaca se basó sobre una inequívoca relación entre la ingestión de la leche de vaca y los síntomas clínicos, es decir, los síntomas desaparecieron después de la eliminación de la leche de vaca de la dieta, y tuvo lugar una inequívoca recaída en un estudio de la leche de vaca controlado por placebo, doble ciego. Este estudio se efectuó como se ha descrito en otra parte (*Kalliomäki et al.*, 1999).

Cultivo de muestras madre

Una muestra fecal del niño fue tomada bien por el personal de enfermeras en una visita programada, o bien inmediatamente antes de la misma, por los padres. En este último caso, la muestra se conservó a 4 °C y se envió al hospital antes de 24 horas para su cultivo inmediato. Se obtuvo una muestra madre a partir de 71 niños con una edad de 20 días (18 a 21 días), y de 69 con una edad de 14 semanas (13 a 14 semanas); media (95 % de CI). El resto de la muestra se congeló inmediatamente y se almacenó a -20 °C hasta que se analizó mediante GLC y FISH. Se emplearon métodos de cultivo no cuantitativos. Las bacterias se cultivaron sobre 6 diferentes medios recién preparados, es decir, agar de sangre (Pronadisa, Madrid, España) para bastones gramnegativos; agar (Leiras, Turku, Finlandia), suplementado con peptona micológica (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), y glucosa para levaduras y hongos; Bile Eskulin Azide Agar (Difco, Detroit, USA) para los enterococos, agar de sangre (Pronadisa) suplementado con glucosa, extracto de levadura (LAB M, Bury, Reino Unido), L-cisteína HCl (Merck, Darmstadt, Alemania), metadona (Merck), y sulfato de neomicina (Sigma, St Louis, USA) para los anaerobios; agar de *Clostridium difficile* (Oxoid) suplementado con hemina (Sigma), rojo neutro (Merck), D-cicloserina (Sigma), huevo y cefoxitina (MSD, Haarlem, Holanda) para el *Clostridium difficile*; y agar de rogosa SL (Difco) para las bacterias tipo *Lactobacillus*. Los tres primeros medios se incubaron aeróbicamente y los últimos tres anaeróbicamente a 35 °C durante 48 horas. A continuación, se efectuó la identificación de las diferentes especies, de acuerdo con su crecimiento sobre medios selectivos, colonias, color y morfología de las células.

Cromatografía líquida de gases de ácidos grasos bacterianos

El método ha sido previamente descrito en detalle (Eerola y Lehtonen, 1988). Después de la separación del material bacteriano de las fibras vegetales fecales y los ácidos grasos libres, la muestra se mezcló de nuevo y se dejó sedimentar durante 15 minutos. A continuación, el componente bacteriano se aisló por centrifugación a 1000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se separó el sobrenadante. La masa de bacterias recogidas se saponificó y se metiló. Los ácidos grasos metilados se extrajeron a continuación con éter etílico y hexano. El análisis GLC se efectuó con un cromatógrafo de gases HP5890A (Hewlett-Packard) y de una columna capilar de sílice fundida Ultra 2004-11-09B (0,2 mm por 25 m; fenil metil siliconada reticulada 5 %; Hewlett-Packard). Se empleó un programa de identificación bacteriana computarizada recientemente desarrollado, para el análisis de los perfiles de la GLC de las muestras fecales. El análisis se basó sobre la correlación y análisis en grupos, de los espectros de ácidos grasos de muestras individuales. Todos los picos de los ácidos grasos individuales de los cromatogramas se emplearon para comparaciones.

Fluorescencia de la hibridación *in situ* de células bacterianas

Se suspendieron muestras fecales en solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (pH 7,0), para dar una concentración final del 10 % (w/v). Las suspensiones se homogeneizaron y centrifugaron a baja potencia (250 g durante 2 minutos) para eliminar la materia en partículas. Las células bacterianas se fijaron y se efectuó el análisis FISH como se ha descrito previamente (Langendijk et al., 1995). En resumen, las células se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4 % (v/v), a 4 °C, se lavaron dos veces en PBS y se almacenaron a -20 °C en una solución de PBS: etanol (1:1). Submuestras de las células fijadas se hibridaron durante la noche en tampón de hibridación con 5 ng x μL^{-1} Cy3 de una sonda de oligonucleótidos marcada con indocarbocianina. Las sondas incluidas fueron la Bac303 (CCAATGTGGGGACCTT) específica para bacteroides, la Bif164 (CATCCGGCATTACCACCC) para las bifidobacterias, la His 150 (TTATGCGGTATTA-ATCT(C/T)CCTTT) para la clostridia, y la Lab158 (GGTATTAGCA(T/C)CTGTTTCCA) para los lactobacilli y enterococci; (secuencia 5' → 3'). Los números de células totales se contaron empleando la tintura del ácido nucleico con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las células se lavaron con tampón de hibridación, se filtraron a través de un filtro de policarbonato de 0,2 μm (Millipore Corporation, Bedford, USA) y se aplicaron sobre un portaobjetos con SlowFade® (Molecular Probes Inc., Eugene, USA). Se contaron visualmente empleando un microscopio de epifluorescencia Leica Laborlux D montado con filtros específicos Cy3 y DAPI. Se contaron quince campos microscópicos por ensayo.

Estadísticas

Los datos normalmente distribuidos se expresan como medias con el 95 % de intervalo de confianza (CI) y los distribuidos oblicuamente se expresaron como medias geométricas con el 95 % de CI después de una transformación logarítmica (log). Se aplicó el ensayo t desparejado para comparar valores entre los grupos. El ensayo χ^2 se empleó para comparar proporciones entre los grupos.

El análisis completo de los datos de la GLC se basó sobre comparaciones entre pares de muestras individuales y el cálculo de índices similares entre los mismos. Los índices de similitud fueron presentados como matrices de correlación y además analizados mediante análisis de grupos pesados por parejas de medias aritméticas. Las muestras fecales se dividieron en cuatro grupos diferentes para el análisis de los resultados de la GLC de los ácidos grasos celulares bacterianos, de acuerdo con el estatus atópico del niño (atópico frente a no-atópico) y edad del muestreo (3 semanas de edad frente a 3 meses). La significancia estadística entre atópicos y no atópicos en diferentes momentos, se calculó mediante la comparación de los perfiles de ácidos grasos dentro de los grupos con la variación entre los grupos. La variación dentro del grupo se determinó calculando la media (SD) de los índices de similitud de todas las comparaciones emparejadas dentro del grupo. La comparación entre dos diferentes grupos se obtuvo mediante el cálculo de la media (SD) de todos los índices de similitud emparejados entre muestras de ambos grupos. A continuación, la variación entre los grupos se comparó con la variación dentro de los grupos calculando un valor Z como se ha descrito previamente. El valor Z se empleó para determinar el valor p por medio de una tabla Z. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Sensibilización atópica y características clínicas

A la edad de 12 meses se observó una sensibilización atópica en 22/76 (29 %) niños. Se observó una reactividad al ensayo de punción cutánea al huevo, leche de vaca, trigo, gato y látex, en 19/22 (86 %), 5/22 (23 %), 3/22 (14 %), 2/22 (9 %) y 1/22 (5 %) atópicos, respectivamente. No se observó ninguna otra reactividad al ensayo de punción cutánea a ningún otro antígeno ensayado. Cinco atopías fueron polisensibilizadas, es decir, evidenciaron una reactividad al ensayo de punción cutánea positiva a por lo menos dos antígenos diferentes. La mitad de los atópicos, 11/22 (50 %) manifestaron una dermatitis atópica y 9/22 (41 %) fueron alérgicos a la leche de vaca como se diagnosticó mediante el ensayo con leche de vaca controlado por placebo, doble ciego.

Se observó una historia atópica materna en 19/22 (86 %) atópicos y 45/54 (83 %) no atópicos ($p = 0,74$). Los atópicos y no atópicos fueron comparables en cuanto a las características del nacimiento. La medias de longitud, peso y circunferencia de la cabeza en el nacimiento fueron de 51,2 (50,3 a 52,8)cm, 3600 (3410 a 3790)g y 35,1(34,5 a 35,7)cm, respectivamente, en los atópicos, y 50,6 (50,1 a 51,1)cm, 3610 (3480 a 3740)g y 35,1 (34,7 a 35,5)cm, respectivamente, en los no atópicos ($p = 0,24$, $p = 0,94$, $p = 0,98$, respectivamente; media (95 % CI).

A las edades de 3 semanas y 3 meses, las características de la dieta fueron comparables entre los atópicos y los no atópicos (tabla 3). A los 3 meses, 9/54 (17 %) de no atópicos, pero ninguno de los atópicos, había recibido antibióticos, $p = 0,04$.

Microflora gastrointestinal neonatal

De acuerdo con el cultivo bacteriano, no hubo ninguna diferencia en la microflora intestinal neonatal entre niños que desarrollaron la atopía y niños que no la desarrollaron (tabla 4). Al mismo tiempo, sin embargo, hubo una diferencia estadística significativa entre los grupos en el perfil de ácido graso celular bacteriano de las muestras madre (figura 3) ($p = 0,005$). Con el fin de detectar la bacteria responsable posiblemente de la discrepancia, se efectuó un FISH de bacterias fecales sobre 29 muestras; los resultados demostraron que el ratio de bifidobacterias a clostridias se redujo en los atópicos, 19 (3 a 122) comparado con los de los no atópicos, 185 (57 a 604); media geométrica (95 % CI) ($p = 0,03$). La diferencia fue causada por una tendencia hacia cuentas más bajas de bifidobacterias y cuentas más altas de clostridias en atópicos (tabla 5).

Microflora gastrointestinal a la edad de 3 meses

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la microflora intestinal entre atópicos y no atópicos a la edad de 3 meses. Los respectivos espectros de los ácidos grasos celulares bacterianos fueron comparables (figura 3). Tampoco difirieron los resultados de los cultivos bacterianos entre los grupos, aunque los no atópicos tendieron a tener levaduras en sus bacterias madre con más frecuencia que los atópicos (tabla 4) ($p = 0,07$).

Tabla 3: Características de la dieta y empleo de los antibióticos en niños a las 3 semanas y a los tres meses

	Atópicos ^a (n= 22)	No atópicos ^a (n= 54)	Ensayo χ^2
3 semanas:			
Exclusivamente lactantes	16/22 (73 %)	37/54 (68 %)	0,31
Parcialmente lactantes	6/22 (27 %)	15/54 (28 %)	0,96
Totalmente con biberón	0/22	2/54 (4 %)	0,36
Antibióticos ^b	0/22	3/54 (6 %)	0,26
3 meses:			
Exclusivamente lactantes	11/22 (50 %)	29/54 (54 %)	0,77
Parcialmente lactantes	6/22 (27 %)	14/54 (26 %)	0,90
Totalmente con biberón	5/22 (23 %)	11/54 (20 %)	0,82
Antibióticos ^b	0/22	9/54 (17 %)	0,04

(continuación)

	Atópicos ^a (n= 22)	No atópicos ^a (n= 54)	Ensayo χ^2
^a) los niños con por lo menos una reacción positiva en el ensayo de punción cutánea, fueron considerados atópicos, y los sin ninguna, no atópicos.			
^b) y ^c) representan el número de niños que han recibido antibióticos sistémicos (oralmente o por vía intravenosa) con una edad de 3 semanas y 3 meses, respectivamente			

Tabla 4: microflora fecal cultivada, en niños a las tres semanas y a los tres meses

	Levaduras y hongos ^a	Bastones gramnegativos ^a	Anaeróbicos ^a	<i>Clostridium difficile</i> ^a	Lactobacilos ^a	Enterococos ^a
3 semanas:						
Atópicos ^b	0/20	15/20	18/20	0/20	16/20	18/20
No atópicos ^b	45/51	2/51	39/51	45/51	2/51	41/51
Ensayo χ^2	0,37	0,90	0,83	0,37	0,97	0,83
3 meses:						
Atópicos ^b	0/20	20/20	18/20	1/20	18/20	20/20
No atópicos ^b	47/49	7/49	45/49	40/49	6/49	44/49
Ensayo χ^2	0,07	0,19	0,39	0,37	0,98	0,36

^a) los números de las columnas representan el número de niños que tienen la bacteria/bacterias en muestras fecales analizadas mediante el cultivo bacteriano

^b) los niños, con por lo menos una reacción positiva en el ensayo de punción cutánea fueron considerados atópicos, y los sin ninguna, no-atópicos.

5 Tabla 5: cuentas de bacterias en muestras fecales analizadas mediante hibridación in situ de fluorescencia, a la edad de 3 semanas

	Atópicos ^a	No atópicos ^a	Ensayo t desapareado ^c
Clostridias ^b	9,3(3,8 a 22,9) x 10 ⁷	3,3 (1,8 a 6,1) x 10 ⁷	0,04
Bifidobacterias ^b	1,8(0,4 a 7,6) x 10 ⁹	6,1(2,5 a 14,6) x 10 ⁹	0,11
Lactobacilos/ enterococos ^b	2,4 (1,1 a 5,2) x 10 ⁸	3,4(1,5 a 7,6) 10 ⁸	0,53
Bacteroides ^b	1,1(0,3 a 4,4) x 10 ⁸	0,5(0,2 a 1,4) x 10 ⁸	0,30
Cuentas celulares totales ^b	8,9(4,0 a 19,4) x 10 ⁹	9,6 (5,3 a 17,3) x 10 ⁹	0,87

^a) Los niños con por lo menos una reacción positiva en el ensayo de punción cutánea fueron considerados atópicos y los sin ninguna reacción, no-atópicos.

^b) Representa la media geométrica (95 % CI) del número fecal de bacterias/g.

^c) El ensayo t desapareado se aplicó después de la transformación logarítmica de las cuentas de bacterias.

Referencias

10 Eerola E, Lehtonen OP. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:1745-1753.

Hanifin JM. Atopic dermatitis in infants and children. Pediatr. Clin. North Am. 1991; 38:763-789.

15 Isolauri E, Suomalainen H, Kaila M, et al. Local immune response in patients with cow milk allergy: follow-up with patients retaining allergy or becoming tolerant. J. Pediatr. 1992; 120:9-15.

Isolauri E, Arvola T, Sütas Y, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. Clin. Exp. Allergy 2000; 30:1605-1610.

20 Isolauri E, Majamaa H, Arvola T. et al. Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. Gastroenterology 1993; 105: 1643-1650.

25 Kalliomäki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. J. Allergy Clin. Immunol. 1999; 104:1251-1257.

Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61:3069-75.

30 Majamaa H, Isolauri E. Evaluation of the gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. J. Allergy Clin. Immunol. 1996; 97: 985-990.

Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 99:179-185.

5 Pessi T, Sütas Y, Marttinen A, Isolauri E. Down-regulation of anti-CD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolysed with *Lactobacillus* GG-derived enzymes. *J. Nutr.* 1998; 128:2313-2318.

10 Sanfilippo L, Li CK, Seth R, Balwin TJ, Menozzi MG, Mahida YR. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) by human colonic epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 119:456-463.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Bacterias probióticas, que tienen las características de promover la microflora bifidogénica intestinal temprana, para su uso en un método para la prevención primaria de enfermedades atópicas en un niño en alto riesgo de enfermedades atópicas, en donde las bacterias probióticas se administran a una mujer embarazada durante al menos dos semanas antes del alumbramiento y después del alumbramiento, al niño recién nacido durante al menos 2 meses.
- 10 2. Bacterias probióticas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde tras el alumbramiento, se efectúa la administración vía de la madre lactante.
- 15 3. Bacterias probióticas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde tras el alumbramiento, la administración se efectúa directamente al niño recién nacido.
- 20 4. Bacterias probióticas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se administra una dosis diaria de 1×10^8 a 1×10^{10} unidades formadoras de colonias de bacterias probióticas.
- 25 5. Bacterias probióticas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las bacterias probióticas son bacterias del ácido láctico.
- 30 6. Bacterias probióticas para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las bacterias del ácido láctico son de la cepa *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (ATCC 53103).
7. Bacterias probióticas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las bacterias probióticas son bifidobacterias.
8. Bacterias probióticas para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las bifidobacterias son de la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb-12.
9. Bacterias probióticas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las bacterias probióticas comprenden una mezcla de bacterias del ácido láctico y bifidobacterias.

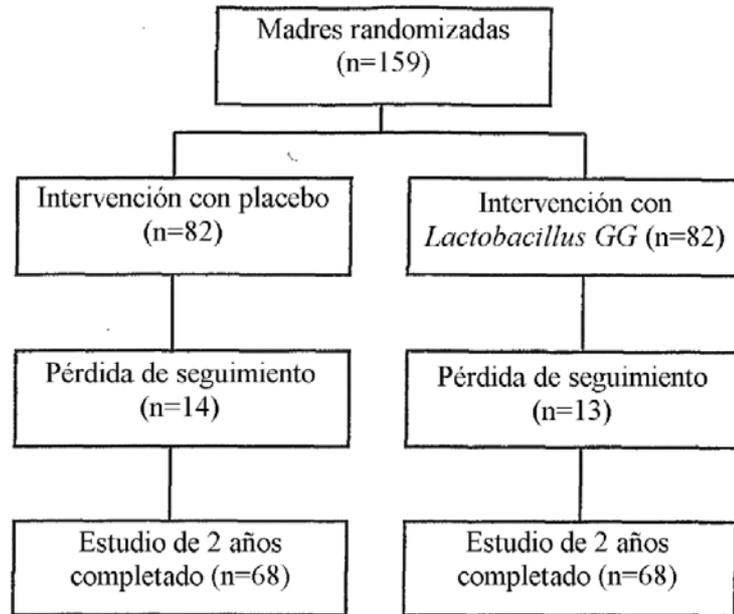


Figura 1

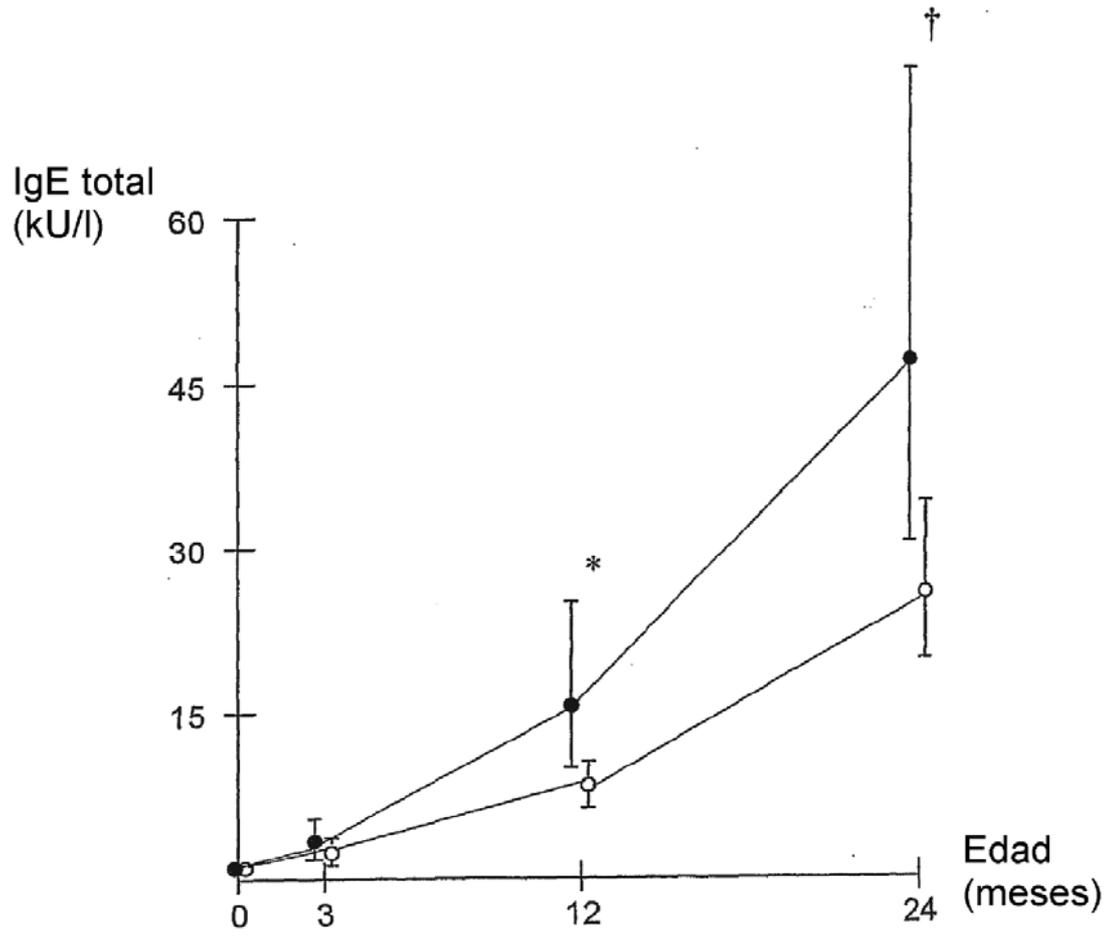


Figura 2

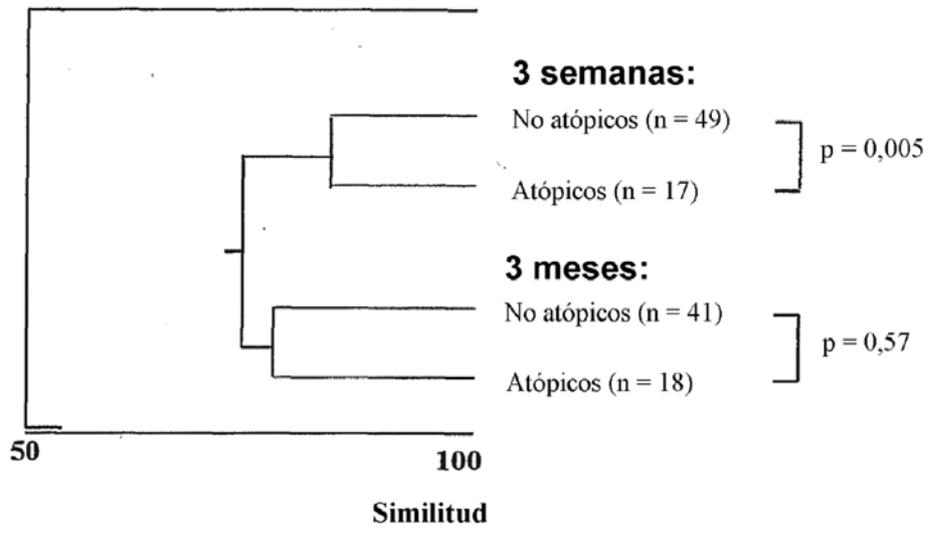


Figura 3