

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 797**

51 Int. Cl.:

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 09164284 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2201955**

54 Título: **Bifidobacterium lactis Bb-12 en 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:

20.04.2020

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 2 754 797 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

Bifidobacterium lactis Bb-12 en prevención primaria de enfermedades atópicas

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de profilaxis de alergias y se refiere específicamente a la prevención primaria de enfermedades atópicas administrando bacterias probióticas, microbios beneficiosos de la flora intestinal saludable, de forma pre y posnatal a niños en alto riesgo de enfermedades atópicas.

10

Antecedentes de la invención

15 Actualmente la alergia, manifestada como enfermedades atópicas - eccema atópico, rinitis alérgica y asma - representa un trastorno crónico de cada vez mayor importancia en países económicamente desarrollados en todo el mundo. La demostración de una asociación inversa entre las infecciones tempranas en la vida y la atopía representa un avance sustancial que ha dado lugar a un interés científico renovado en la hipótesis de higiene introducida hace una década, de acuerdo con la que un rápido aumento reciente en atopía puede deberse, de hecho, a higiene mejorada y un tamaño familiar reducido. Los estudios epidemiológicos recientes han producido resultados tanto a favor como en contra de esta hipótesis.

20

La microflora gastrointestinal promueve procesos con un potencial de contrarrestar alergias:

25 1) la inmunidad de tipo T auxiliar 1, 2) la generación del factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), que tiene una función vital tanto en la supresión de inflamación alérgica inducida por Th2 como en la inducción de tolerancia oral y 3) la producción de IgA, un componente indispensable en la defensa inmunitaria de la mucosa (Sanfilippo *et al.*, 2000; Isolauri *et al.*, 2000). La microflora intestinal, por tanto, puede representar un cotrarregulador posnatal del sistema inmunitario universal desviado a Th2 del embarazo y la edad neonatal. La confrontación con antígenos microbianos en el tubo gastrointestinal empieza justo después del nacimiento y las células viables de una microflora intestinal completamente establecida sobrepasa las del hospedador en un factor de diez. Por consiguiente, los microbios gastrointestinales comensales constituyen el primer estímulo y más sustancial para el desarrollo de tejido linfoide asociado al intestino.

35 Los probióticos, definidos como ingredientes alimenticios microbianos vivos beneficiosos para la salud, son bacterias comensales normales de la microflora intestinal humana saludables. Los géneros más frecuentemente usados son lactobacilos y bifidobacterias. Se sabe que los probióticos invierten la permeabilidad intestinal aumentada característica de los niños con eccema atópico y alergia a alimentos, y potencian las respuestas de IgA específicas del intestino, frecuentemente defectuosas en niños con alergia alimenticia (Isolauri *et al.*, 1993; MaJamaa e Isolauri, 1996; Isolauri, 1992). Promover la función de la barrera intestinal mediante probióticos también incluye la normalización de la microecología intestinal, en la que se han demostrado alteraciones en sujetos alérgicos. Estudios recientes indican que determinados probióticos alivian los cambios relacionados con inflamación alérgica tanto *in vitro* como *in vivo* (Isolauri *et al.*, 2000; MaJamaa y Isolauri, 1997). Una cepa probiótica, *Lactobacillus casei*, ssp. *rhamnosus* (*Lactobacillus* GG; ATCC 53103), ha demostrado ser segura a una edad temprana y eficaz en el tratamiento de la inflamación alérgica y en alergia alimenticia. Por tanto, cepas específicas en la microflora autóctona intestinal ejercen efectos profundos sobre la fisiología e inmunología del hospedador.

45

Al nacimiento, el tubo gastrointestinal humano es estéril, pero durante los primeros meses y años de vida se produce una rápida colonización secuencial, que da lugar a la microflora intestinal autóctona estable. Simultáneamente, la inmunidad Th2 dominante universal de los recién nacidos se intensifica en individuos atópicos, con la posterior expresión de enfermedad atópica. Además de la microflora normal que influye en el sistema gastrointestinal neonatal, otra fuente antigénica masiva y constante se confronta en forma de antígenos de la dieta. Los recientes estudios en animales indican que estos pueden potenciar la inmunidad de tipo atópica tanto a nivel de mucosa como sistémica. Cualquier proceso diseñado para contrarregular la alergia, por tanto, debe ejercer sus efectos principales en la infancia y, preferiblemente, durante los encuentros iniciales con antígenos de la dieta. Aquí, los probióticos son eminentemente apropiados para la tarea, no solamente con respecto a la cronología, sino también en su capacidad de reducir la carga antigénica en la dieta degradando y modificando las macromoléculas (Pessi *et al.*, 1998).

50

55 Bjorksten *et al.*, Clinical and experimental Allergy, vol. 29, n.º 3, enero de 1999, pág. 342-346, indica la función de la microflora intestinal en relación con el desarrollo de la inmunidad infantil y las posibles consecuencias posteriores en la vida para una enfermedad alérgica requieren estudio adicional. Este documento no se refiere a *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

60

Sumario de la invención

65 En la presente solicitud, se demuestra clínicamente que probióticos específicos reducen sustancialmente la prevalencia de eccema atópico, lo que indica que dichos microbios previenen la enfermedad atópica. Por otro lado, datos adicionales obtenidos en nuestros estudios de colonización intestinal con bifidobacterias, presentados en esta

solicitud, demuestran que diferencias en la microflora intestinal preceden al desarrollo de atopía. Basándose en los datos, se propone que la exposición a cepas específicas de microflora comensal representa un protector modular clave de inmunidad contra atopía y posteriores enfermedades atópicas y, por consiguiente, que los probióticos que promueven la microflora intestinal bifidogénica temprana tienen un potencial preventivo en alergia.

- 5 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 muestra el perfil del ensayo GG de *Lactobacillus*.
- 10 La figura 2 muestra la media geométrica de las concentraciones de anticuerpos IgE totales durante los dos primeros años de vida en niños sanos (círculo vacío) y niños con eccema atópico a la edad de dos años (círculo relleno). La barra de error representa un intervalo de confianza del 95 %. *p = 0,009 y †p = 0,02, niños con eccema atópico frente a niños sanos (ensayo de la t para datos independientes).
- 15 La figura 3 muestra un dendrograma que representa similitudes relativas de los perfiles de ácido graso bacterianos en muestras fecales analizadas por cromatografía de gases-líquidos en una escala de 0 a 100 entre muestras de pacientes atópicos y no atópicos a las 3 semanas y 3 meses.

20 Descripción detallada de la invención

La invención se define por las reivindicaciones. La presente invención proporciona bifidobacterias de la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb-12 para su uso en un método para prevención primaria de enfermedades atópicas en un lactante en alto riesgo de dichas enfermedades, en cuyo método se administra a una mujer embarazada una dosis diaria de bacterias probióticas vivas *Bifidobacterium lactis* Bb-12 durante al menos dos semanas antes del parto y, después del parto, se administra una dosis diaria de bacterias probióticas vivas al lactante recién nacido durante al menos 2 meses.

Después del parto, las bacterias probióticas pueden administrarse mediante la madre que amamanta, o directamente al lactante recién nacido. Puede usarse cualquier dosis diaria de las bacterias que de un efecto deseado, una dosis adecuada es de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de colonias de bacterias probióticas.

Por consiguiente, la invención también se refiere al uso de bacterias probióticas *Bifidobacterium lactis* Bb-12 para la preparación de una composición útil para prevención primaria de enfermedades atópicas en un lactante en alto riesgo de enfermedades atópicas, a administrarse de acuerdo con el patrón indicado anteriormente.

Las bacterias probióticas que pueden usarse en esta invención son bifidobacterias de la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

Además, puede administrarse una mezcla de bacterias acidolácticas y bifidobacterias.

Las bacterias probióticas *Bifidobacterium lactis* Bb-12 tienen las características de promover la microflora intestinal temprana. Dichos probióticos refuerzan la integridad del intestino y aumentan la proporción de bifidobacterias en la microflora intestinal.

Administrando bacterias probióticas de acuerdo con la presente invención a un lactante en alto riesgo, para prevenir principalmente enfermedades atópicas, la flora intestinal del lactante se ve afectada favorablemente. Al empezar el tratamiento durante el embarazo de la madre, la cantidad de factores protectores, tales como citocinas antiinflamatorias de la leche materna, aumentará. Mediante la prevención de un estado inflamatorio alérgico de esta manera, es posible prevenir el brote de una enfermedad atópica.

La expresión "prevención primaria" usada en la presente solicitud significa un tratamiento profiláctico con el fin de prevenir totalmente el brote una enfermedad en un sujeto en riesgo. Por otro lado, se entiende que la expresión "prevención secundaria" usada en la técnica incluye el significado de prevenir o aliviar los síntomas de una enfermedad alérgica que ya ha brotado o se ha desarrollado, por ejemplo, prevenir alergia alimenticia eliminando los ingredientes alimenticios alérgenos de la dieta.

El presente estudio es la primera demostración clínica prospectiva de un microbio específico que previene enfermedades atópicas, y el nuevo conocimiento puede proporcionar una excelente oportunidad de idear estrategias contra la alergia.

En el presente estudio, se introdujo *Lactobacillus* GG (ATCC 53103) de forma prenatal mediante las madres y de forma posnatal durante 6 meses a lactantes en alto riesgo de enfermedades atópicas en un ensayo con doble enmascaramiento, aleatorizado controlado con placebo de prevención de enfermedad atópica.

Un criterio de inclusión para el estudio fue antecedentes familiares de enfermedad atópica, es decir, uno o más miembros de la familia (madre, padre y/o hermano mayor) con eccema atópico, rinitis alérgica o asma. Las familias

se reclutaron en clínicas prenatales en la ciudad de Turku (población de 170 000) entre febrero de 1997 y enero de 1998, durante un año, para evitar el efecto del mes de nacimiento en la sensibilización atópica. En conjunto, se distribuyeron aleatoriamente 159 madres mediante un ordenador para recibir dos cápsulas de placebo (celulosa microcristalina) o 1×10^{10} formadoras de colonias de *Lactobacillus* GG (Valio Ltd, Finlandia) una vez al día durante 2 a 4 semanas antes del parto. Después del parto, las madres que amamantaban tenían la opción de consumir las cápsulas por sí mismas o de lo contrario los agentes se introducían en las dietas de los lactantes. En el último caso, los contenidos de la cápsula se administraban mediante una cucharilla después de mezclarlo en agua. Estos dos modos de administración, mediante la madre o al lactante, han demostrado producir cantidades comparables de *Lactobacillus* GG en las heces de lactantes (Majamaa y Isolauri, 1997). Las cápsulas de *Lactobacillus* GG y placebo y sus contenidos parecían, olían y sabían idénticas. Las cápsulas se consumieron durante 6 meses de forma posnatal. Los códigos los mantuvo el proveedor hasta que se recogieron y se analizaron todos los datos. El estudio se aprobó por el comité sobre práctica ética del Hospital Universitario de Turku y la Oficina de Sanidad de la ciudad de Turku. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los progenitores de los niños.

Los niños se examinaron clínica e inmunológicamente durante el periodo neonatal y en visitas posteriores del estudio a las edades de 3, 6, 12, 18 y 24 meses de vida. Un examen físico, realizado siempre por el mismo médico, incluía inspección de los ojos, los oídos, la nariz y la piel, auscultación del corazón y los pulmones, palpación del abdomen y evaluación del crecimiento y del desarrollo neurológico. Se preguntó a los progenitores sobre los signos y síntomas del lactante posiblemente relacionados con enfermedades atópicas (piel: eritema, sequedad, supuración, escarificación (prurito); ojos y nariz: eritema, secreción, estornudos, escoriación (prurito); pulmones: tos, sibilancias, dificultad respiratoria). Los ensayos para anticuerpos IgE totales en suero e IgE específicos contra la leche, huevo, gato y ácaros del polvo doméstico se realizaron con el inmunoensayo Pharmacia CAP FEIA en el analizador automático UniCAP 100 (Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un valor de IgE específica de antígeno de más de 0,35 kU/l se consideró elevado. Se leyeron las reacciones del ensayo de punción epidérmica a los 10 minutos y se registró la mitad del tamaño de reacción a diclorhidrato de histamina (10 mg/ml; ALK Abellò, Horsholm, Dinamarca; ALK) (2+) o más como positivo con la condición de que el diámetro medio del habón fuera de al menos 3 mm y el control negativo (ALK) al mismo tiempo fuera de 0 mm. Los antígenos ensayados incluían leche que contenía un 1,5 % de grasa, harina de trigo diluida 1:10 (p/v) con un 0,9 % (p/v) de cloruro de sodio, harina de centeno diluida 1:10 (p/v) con un 0,9 % (p/v) de cloruro de sodio, clara de huevo (ALK), bacalao (ALK), soja (ALK), látex (Stallergens, Francia), abedul (ALK), seis gramíneas locales (todas de ALK), gato (ALK), perro (ALK) y alérgeno Der p1 *Dermatophagoides pteronyssimus* (ALK). Además, se ensayó plátano, patata y zanahoria mediante la técnica de punción-punción. Los resultados de la punción epidérmica se consideraron positivos si un lactante manifestaba al menos una reacción positiva a los antígenos ensayados.

El eccema atópico recidivante crónico a la edad de dos años se consideró el criterio de valoración principal, ya que representa la manifestación principal de enfermedades atópicas durante los primeros años de vida. Los sujetos se agruparon como los que padecen este trastorno (niños con eccema atópico) o no (niños sanos). El eccema atópico se confirmó si se detectaban las siguientes características: prurito, afectación facial y/o del músculo extensor, y evolución recidivante crónica. El último criterio mencionado se cumplió si había eccema patente con una duración de un mes o más en la visita del estudio de 24 meses y en al menos una visita previa. El cuarto criterio principal, antecedentes familiares de enfermedad atópica, fue un criterio de inclusión para el estudio. El diagnóstico de rinitis alérgica se estableció si dos o más síntomas posteriores se experimentaban en la mayoría de los días: secreción nasal, congestión, estornudos y comezón. Una relación temporal de estos síntomas con exposición al alérgeno, alivio de los síntomas tras tratamiento con antihistamínico y evidencia de sensibilización atópica (es decir, ensayo de punción epidérmica positivo y/o ensayo radioalergoabsorbente positivo) fueron *sine qua non*. El diagnóstico de asma se basó en un algoritmo creado por un grupo de consenso de asma pediátrico internacional. El asma se diagnosticó si un lactante tenía tos crónica o recurrente, sibilancias y/o dificultad respiratoria que sugiere asma, y si se excluyeron diagnósticos alternativos, y si el tratamiento antiasmático del ensayo era eficaz.

Las características basales de los sujetos del estudio fueron similares en los grupos de placebo y *Lactobacillus* GG (tabla 1). Un total de 132/159 (83 %) sujetos completaron el estudio de 2 años. Con al menos 56 sujetos en ambos grupos, se pudo detectar una reducción del riesgo absoluto de un 25 % (50 % de riesgo en el grupo del placebo y 25 % en el grupo de *Lactobacillus* GG) en la prevalencia de enfermedad atópica a un nivel del 5 % de significación con una potencia del 80 %. Las tasas de interrupción respectivas fueron comparables (figura 1).

El eccema atópico se diagnosticó en 46/132 (35 %) niños a la edad de dos años. Cinco de estos niños también cumplían los criterios de diagnóstico para asma y uno tanto para asma como para rinitis alérgica. La duración del amamantamiento fue comparable entre los lactantes que manifestaban eccema atópico, 7,0 (de 5,8 a 8,2) meses, y aquellos que no, 6,7 (de 5,9 a 7,5) meses; media (CI del 95 %) ($p = 0,65$ por ensayo de la t para datos independientes). La edad de la aparición de los síntomas de eccema atópico fue 4,9 (de 3,9 a 6,2) meses; media geométrica (CI del 95 %). El objetivo de SCORAD a la edad de 24 meses fue 10 (de 9 a 11) en niños con eccema atópico; media geométrica (CI del 95 %). En niños con eccema atópico, las concentraciones progresivas de IgE llegaron a manifestarse a la edad de dos años (figura 2). La reactividad del ensayo de punción epidérmica a antígenos ambientales comunes fue más común en niños con eccema atópico que en niños sanos a las edades de 12 y 24 meses ($p = 0,03$ y $p = 0,01$, respectivamente, por ensayo de la X^2) mientras que la frecuencia de las

concentraciones aumentadas de IgE específica de antígeno en suero fue comparable entre los grupos ($p = 0,22$ y $0,31$, respectivamente, por ensayo de la X^2). Los antígenos más comunes que provocaban reacciones positivas por cualquier método fueron huevo y leche de vaca.

- 5 La prevalencia de eccema atópico se redujo a la mitad en lactantes a los que se administró probiótico, 15/64 (23 %), en comparación con la de aquellos que recibieron placebo, 31/68 (46 %) ($p = 0,008$ por ensayo de la X^2). El número necesario a tratar con CI del 95 % fue 4,5 (de 2,6 a 15,6).

10 La mayoría de las madres, 28/43 (65 %), en el grupo probiótico que amamanta durante al menos 6 meses eligieron la opción de consumir las cápsulas probióticas por sí mismas. El efecto preventivo no dependía del modo de administración, ya que en el grupo de intervención de *Lactobacillus* GG se diagnosticó eccema atópico en 9/36 (25 %) casos si los lactantes consumían los probióticos por sí mismos y en 6/28 (21 %) casos si la cepa se consumía por las madres que amamantaban ($p = 0,74$ por ensayo de la X^2). El efecto preventivo de *Lactobacillus* GG fue más pronunciado en niños que ya manifestaban anticuerpos IgE en sangre de cordón umbilical; 3/20 (15 %) lactantes con IgE detectable en cordón umbilical que recibieron *Lactobacillus* GG desarrollaron eccema atópico en comparación con 9/19 (47 %) que recibieron placebo; riesgo relativo de 0,32 (de 0,10 a 0,99) ($p = 0,03$ por ensayo de la X^2). La concentración de IgE total y las frecuencias de concentraciones aumentadas de IgE específica de antígeno y de reacciones positivas en ensayos de punción epidérmica fueron comparables entre lactantes que consumieron el probiótico y aquellos que recibieron el placebo (tabla 2). La frecuencia de casos con elevada concentración total de IgE ($> 93,3$ kU/l) tendió a ser inferior en el grupo de probiótico, 11/61 (18 %), que en el grupo de placebo, 17/63 (27 %), a los dos años; riesgo relativo (CI del 95 %) 0,67 (de 0,34 a 1,29). La concentración total de IgE se clasificó alta, si era mayor que la media geométrica de la concentración de IgE total + una desviación típica en niños sin enfermedad atópica.

25 Tabla 1: Comparación de características basales de los sujetos del estudio

	Grupo de placebo (n = 82)	Grupo de <i>Lactobacillus</i> GG (n = 77)
Antecedentes familiares:		
Enfermedad atópica materna	63/82 (77 %)	55/77 (71 %)
Hermano mayor	30/82 (37 %)	26/37 (34 %)
Tabaquismo de uno o más progenitores	17/82 (21 %)	9/77 (12 %)
Mascota peluda en el hogar	9/82 (11 %)	16/77 (21 %)
Características de nacimiento:		
Semanas de gestación ^{a)}	39,4 (de 39,0 a 39,7)	39,4 (de 39,0 a 39,7)
Género masculino	43/82 (52 %)	49/77 (64 %)
IgE sanguínea en cordón umbilical (kU/l) ^{b)}	0,04 (de 0,02 a 0,06)	0,06 (de 0,03 a 0,12)
Circunferencia craneal (cm) ^{a)}	35,0 (de 34,7 a 35,3)	35,2 (de 34,8 a 35,5)
Peso (g) ^{a)}	3610 (de 3510 a 3720)	3630 (de 3520 a 3740)
Los valores son números (porcentajes) de casos de enfermedad atópica materna, hermano mayor, uno o más progenitores fumadores y mascota peluda en el hogar		
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 en los grupos de intervención

	Grupo de placebo (n = 68)	Grupo de <i>Lactobacillus</i> GG (n = 64)	valor-p
IgE total (kU/l) ^{a)} :			
3 meses	3,0 (de 2,4 a 3,7)	3,1 (de 2,5 a 4,0)	0,79 ^{d)}
12 meses	9,7 (de 7,0 a 13,4)	11,2 (de 8,0 a 15,7)	0,55 ^{d)}
24 meses	32,7 (de 22,6 a 47,3)	31,3 (de 22,8 a 43,0)	0,85 ^{d)}
Lecturas de RAST aumentadas ^{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 en el 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)}

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

El valor representa los números (porcentajes) de lactantes que manifiestan al menos ^{b)} una concentración de IgE específica de antígeno aumentada ($>0,35$ kU/l) en ensayo radioalergoabsorbente (RAST) o ^{c)}una reacción positiva en ensayo de punción epidérmica.

^{d)}Ensayo de la t para datos independientes y ^{e)} ensayo de la X^2 (placebo frente a *Lactobacillus* GG)

Los estudios de colonización intestinal

5 En los estudios con bifidobacterias, se hizo un seguimiento prospectivo de 76 lactantes de alto riesgo desde el nacimiento hasta la edad de un año, cuando se determinó el desarrollo de sensibilización atópica por ensayo de punción epidérmica. Como la estimulación microbiana más importante y principal se produce junto con el establecimiento de la microflora intestinal, se sugirió la hipótesis de que exposiciones a microflora comensal sobrepasan las infecciones esporádicas y que esto puede relacionarse con otros cambios que predisponen a atopía, lo que representa, por tanto, un modulador clave del sistema inmunitario en el recién nacido.

10 La investigación sobre la microflora gastrointestinal mediante cultivo bacteriano convencional se ha visto impedida por la ausencia de sensibilidad en los métodos de evaluación, ya que casi la mitad de las bacterias en el intestino no se pueden cultivar, si acaso son viables. Por lo tanto, se utilizó, además de cultivo bacteriano, dos métodos independientes de cultivo: cromatografía de gases-líquidos (GLC) de ácidos grasos celulares bacterianos e hibridación *in situ* de fluorescencia cuantitativa (FISH) de células bacterianas para caracterizar la microflora intestinal durante los primeros meses de vida en lactantes después de desarrollar o de no desarrollar atopía.

Sujetos y diseño del estudio

20 La cohorte del estudio comprendía 76 familias voluntarias con 76 lactantes recién nacidos, seleccionados aleatoriamente de la población de un estudio de prevención de alergia que evalúa el potencial preventivo de los probióticos en atopía. En esta población del estudio, 30/76 (39 %) lactantes tenían uno y 46/76 (61 %) varios parientes cercanos de primer grado con eccema atópico, rinitis alérgica o asma.

25 El estudio se aprobó por el comité sobre práctica ética del Hospital Central Universitario de Turku y la Oficina de Sanidad de la ciudad de Turku. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los progenitores de los niños.

30 Los lactantes nacieron entre la semana 36 y 42 de gestación (media de 40). Se examinaron clínicamente a las edades de 2 días, 3 semanas y 3, 6 y 12 meses. se registró cualquier signo y síntoma de enfermedad atópica. La sensibilización atópica a la edad de 12 meses, evaluada por ensayo de punción epidérmica, se consideró un criterio de valoración principal. Los lactantes se consideraron atópicos si manifestaban al menos una reacción positiva a los antígenos ensayados, mientras que aquellos sin reacción positiva no se consideraron atópicos. Se aplicó exposición a leche de vaca controlada con placebo con doble enmascaramiento cuando los síntomas, signos clínicos y ensayos de punción epidérmica sugerían alergia a leche de vaca.

35 Diagnóstico de dermatitis atópica

40 El diagnóstico de dermatitis atópica se basó en criterios descritos previamente (Hanifin, 1991). En resumen, la dermatitis atópica se confirmó si se detectaban las tres siguientes características principales: prurito, morfología y distribución típica y dermatitis crónica (duración de un mes o más).

Evaluación de sensibilización atópica

45 La sensibilización atópica se evaluó por ensayo de punción epidérmica como se describe previamente (Majamaa y Isolauri, 1997). Las reacciones se leyeron a los 10 minutos y la mitad del tamaño de reacción a diclorhidrato de histamina (10 mg/ml; ALK Abellø, Horsholm, Dinamarca; ALK) (2+) o más como positivo con la condición de que el diámetro medio del habón fuera de al menos 3 mm y el control negativo (ALK) al mismo tiempo fuera de 0 mm. Los antígenos ensayados incluían leche que contenía un 1,5 % de grasa, harina de trigo diluida 1:10 (p/v) con un 0,9 % (p/v) de cloruro de sodio, harina de centeno diluida 1:10 (p/v) con un 0,9 % (p/v) de cloruro de sodio, gliadina diluida 1:1000 (p/v) con un 0,9 % (p/v) de cloruro de sodio, clara de huevo (ALK), bacalao (ALK), soja (ALK), látex (Stallergens, Francia), abedul (ALK), seis gramíneas locales (ALK), gato (ALK), perro (ALK) y alérgeno Der p1 *Dermatophagoides pteronyssimus* (ALK). Además, se ensayó plátano, patata y zanahoria mediante la técnica de punción-punción.

55 Diagnóstico de alergia a leche de vaca

60 El diagnóstico de alergia a leche de vaca se basó en una relación inequívoca entre la ingesta de leche de vaca y síntomas clínicos, es decir, los síntomas desaparecían después de eliminar la leche de vaca de la dieta, y se producía una recidiva inequívoca en una exposición a leche de vaca controlada con placebo con doble enmascaramiento. Esta exposición se realizó como se describe en otra parte (Kalliomäki *et al.*, 1999).

Cultivo de muestras de heces

65 Se tomó una muestra fecal de lactante por el personal de enfermería en la visita programada o inmediatamente antes de la misma por los progenitores. En el último caso, la muestra se almacenó a 4 °C y se proporcionó al hospital en 24 horas para el cultivo inmediato. Se obtuvo una muestra de heces de 71 lactantes a la edad de 20 días

(de 18 a 21 días) y de 69 a la edad de 14 semanas (de 13 a 14 semanas); media (CI del 95 %). El resto de la muestra se congeló inmediatamente y se almacenó a -20 °C hasta que se analizó por GLC y FISH. No se emplearon métodos de cultivo cuantitativos. Las bacterias se cultivaron en 6 medios recién preparados diferentes, es decir, agar con sangre (Pronadisa, Madrid, España) para bacilos gramnegativos; agar (Leiras, Turku, Finlandia) complementado con peptona micológica (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y glucosa para levaduras y hongos; agar con acida de esculina biliar (Difco, Detroit, EE. UU.) para enterococos; agar con sangre (Pronadisa) complementado con glucosa, extracto de levadura (LAB M, Bury, Reino Unido), L-cisteína HCl (Merck, Darmstadt, Alemania), metadiona (Merck) y sulfato de neomicina (Sigma, St. Louis, EE: UU.) para anaerobios; agar de *Clostridium difficile* (Oxoid) complementado con hemina (Sigma), rojo neutro (Merck), D-cicloserina (Sigma), huevo y cefoxitina (MSD, Haarlem, Países Bajos) para *Clostridium difficile*; y agar de Rogosa SL (Difco) para bacteria de tipo *Lactobacillus*. Los tres primeros medios se incubaron de forma aeróbica y los tres últimos de forma anaeróbica a 35 °C durante 48 h. Posteriormente, si hizo la identificación de diferentes especies de acuerdo con su crecimiento en medio selectivo, las colonias, el color y la morfología celular.

15 Cromatografía de gases-líquidos de ácidos grasos bacterianos

El método se ha descrito previamente 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 volvió a mezclar y se permitió que sedimentara durante 15 min. Después de ello, el componente bacteriano se aisló por centrifugación a 1000 g durante 15 min a temperatura ambiente y retirando el sobrenadante. La masa bacteriana recogida se saponificó y metiló. Los ácidos grasos metilados entonces se éter etílico y hexano. El análisis de GLC se realizó con un cromatógrafo de gases HP5890A (Hewlett-Packard) y una columna capilar de sílice fundida Ultra 2004-11-09B (de 0,2 mm por 25 m; fenilmetilsilicona al 5 % reticulada; Hewlett-Packard). Se usó un programa de identificación bacteriana informatizado recientemente desarrollado para analizar los perfiles de GLC de las muestras fecales. El análisis se basó en la correlación y análisis de grupos de los espectros de ácidos grasos de muestras individuales. Todos los picos de ácidos grasos individuales en los cromatogramas se usaron en las comparaciones.

Hibridación de fluorescencia *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 de un 10 % (p/v). Las suspensiones se homogeneizaron y centrifugaron a baja potencia (250 g durante 2 min) para eliminar la materia en partículas. Las células bacterianas se fijaron y se realizó FISH como se describe previamente (Langendijk *et al.*, 1995). En resumen, las células se fijaron durante una 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). Se hibridaron submuestras de las células fijadas durante una noche en tampón de hibridación con 5 ng x μl^{-1} de sonda oligonucleotídica marcada con Cy3 indocarbocianina. Las sondas incluidas eran Bac303 (CCAATGTGGGGACCTT) específica para bacteroides, Bif164 (CATCCGGCATTACCACCC) para bifidobacteria, His150 (TTATGCGGTATTA-ATCT(C/T)CCTTT) para clostridios y Lab158 (GGTATTAGCA(T/C)CTGTTTCCA) para lactobacilos y enterococos; (secuencia 5'→3'). Los números totales de células se contaron usando un tinte de ácido nucleico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las células se lavaron con el tampón de hibridación, se filtraron a través de un filtro de policarbonato de 0,2 μm (Millipore Corporation, Bedford, EE. UU.) y se montaron en un portaobjetos con SlowFade® (Molecular Probes Inc., Eugene, EE. UU.). Se contaron visualmente usando un microscopio de epifluorescencia Leica Laborlux D montado con filtros específicos de Cy3 y DAPI. Se contaron quince campos microscópicos por ensayo.

45 Estadística

Los datos distribuidos de forma normal se expresan como la media con un intervalo de confianza (CI) del 95 % y los de distribución sesgada como las medias geométricas con un CI del 95 % después de transformación logarítmica (log). Se aplicó el ensayo de la *t* para datos independientes para comparar los valores entre los grupos. Se usó el ensayo de la X^2 para comparar las proporciones entre los grupos.

El análisis completo de los datos de GLC se basó en comparaciones emparejadas entre muestras individuales y el cálculo de índices de similitud entre ellas. Los índices de similitud se presentaron como matrices de correlación y se analizaron adicionalmente mediante análisis de agrupación por parejas de grupos ponderados de medias aritméticas. Las muestras fecales se dividieron en cuatro grupos diferentes para el análisis de los resultados de GLC de ácidos grasos celulares bacterianos de acuerdo con el estado atópico del lactante (atópico frente a no atópico) y el momento de muestreo (edad de 3 semanas frente a 3 meses). La significación estadística entre los atópicos y no atópicos en diferentes puntos temporales se calculó comparando la variación en los perfiles de ácidos grasos dentro de los grupos con la que hay entre los grupos. La variación dentro del grupo se determinó calculando la media (DT) de los índices de similitud de todas las comparaciones emparejadas dentro del grupo. La que hay entre dos grupos diferentes se obtuvo calculando la media (DT) de todos los índices de similitud emparejados entre muestras en ambos grupos. Posteriormente, la variación entre los grupos se comparó con la de dentro de los grupos calculando un valor-Z como se describe previamente. El valor-Z se usó para determinar el valor-p mediante una tabla-Z. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Sensibilización atópica y características clínicas

5 A la edad de 12 meses, se observó sensibilización atópica en 22/76 (29 %) niños. Se observó reactividad en el ensayo de punción epidérmica 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 reactividad en punción epidérmica a ningún otro antígeno ensayado. Cinco atópicos estaban polisensibilizados, es decir, manifestaban reactividad en ensayo de punción epidérmica positivo a al menos dos antígenos diferentes. La mitad de los atópicos, 11/22 (50 %), manifestaron dermatitis atópica y 9/22 (41 %) eran alérgicos a la leche de vaca, diagnosticados por exposición a leche de vaca contralada con placebo con doble enmascaramiento.

15 Se observaron antecedentes atópicos maternos en 19/22 (86 %) atópicos y 45/54 (83 %) no atópicos ($p = 0,74$). Los atópicos y no atópicos fueron comparables por las características de nacimiento. Las medias de estatura, peso y circunferencia craneal al nacimiento fueron 51,2 (de 50,3 a 52,8) cm, 3600 (de 3410 a 3790) g y 35,1 (de 34,5 a 35,7) cm, respectivamente, en atópicos y 50,6 (de 50,1 a 51,1) cm, 3610 (de 3480 a 3740) g y 35,1 (de 34,7 a 35,5) cm, respectivamente, en no-atópicos ($p = 0,24$, $p = 0,94$, $p = 0,98$, respectivamente); media (CI del 95 %).

20 A las edades de 3 semanas y 3 meses, las características de alimentación eran comparables entre los atópicos y los no atópicos (tabla 3). A los 3 meses, 9/54 (17 %) no atópicos, pero ningunos de los atópicos habían recibido antibióticos, $p = 0,04$.

Microflora gastrointestinal neonatal

25 De acuerdo con el cultivo bacteriano, no hubo diferencias en la microflora intestinal neonatal entre lactantes que desarrollan y que no desarrollan atopía (tabla 4). Al mismo tiempo, sin embargo, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en el perfil de ácidos grasos celulares bacterianos de las muestras de heces (figura 3) ($p = 0,005$). Para detectar las bacterias posiblemente responsables de la discrepancia, se aplicó FISH de bacterias fecales a 29 muestras; los resultados demostraron que la relación de bifidobacterias a clostridios estaba reducida en atópicos, 19 (3 a 122), en comparación con la de no atópicos, 185 (57 a 604); media geométrica (CI del 95 %) ($p = 0,03$). La diferencia estaba causada por una tendencia hacia recuentos inferiores de bifidobacterias y recuentos mayores de clostridios en atópicos (tabla 5).

Microflora gastrointestinal a la edad de 3 meses

35 No hubo diferencias estadísticamente significativas en la microflora intestinal entre los atópicos y los no atópicos a la edad de 3 meses. Los espectros de ácidos grasos celulares bacterianos respectivos fueron comparables (figura 3). Ni tampoco los resultados del cultivo bacteriano diferían entre los grupos, aunque los no atópicos tendían a tener levaduras en sus heces más frecuentemente que los atópicos (tabla 4) ($p = 0,07$).

Tabla 3: Características alimenticias y uso de antibióticos en lactantes a las 3 semanas y a los 3 meses

	Atópicos ^{a)} (n=22)	No atópicos ^{a)} (n=54)	ensayo de la X ²
3 semanas:			
exclusivamente amamantados	16/22 (73 %)	37/54 (68 %)	0,31
parcialmente amamantados	6/22(27 %)	15/54 (28 %)	0,96
totalmente alimentados con biberón	0/22	2/54 (4 %)	0,36
antibióticos ^{b)}	0/22	3/54 (6 %)	0,26
3 meses:			
exclusivamente amamantados	11/22 (50 %)	29/54 (54 %)	0,77
parcialmente amamantados	6/22(27 %)	14/54 (26 %)	0,90
totalmente alimentados con biberón	5/22 (23 %)	11/54 (20 %)	0,82
antibióticos ^{c)}	0/22	9/54 (17 %)	0,04

^{a)} Lactantes con al menos una reacción positiva en el ensayo de punción epidérmica se consideraron atópicos, aquellos que no, no atópicos.

^{b)} y ^{c)} representan el número de lactantes que han recibido antibióticos sistémicos (por vía oral o intravenosa) a la edad de 3 semanas y 3 meses, respectivamente

Tabla 4: Microflora fecal cultivada en lactantes a las 3 semanas y 3 meses

	Levaduras y hongos ^{a)}	Bacilos gramnegativos ^{a)}	Anaeróxicos ^{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 de la X ²	0,37	0,90	0,83	0,37	0,97	0,83
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 de la X ²	0,07	0,19	0,39	0,37	0,98	0,36

^{a)} Los números en las columnas representan el número de lactantes que tienen la bacteria/bacterias en muestra fecal analizadas por cultivo bacteriano

^{b)} Lactantes con al menos una reacción positiva en el ensayo de punción epidérmica se consideraron atópicos, aquellos que no, no atópicos.

Tabla 5: Recuentos bacterianos en muestras fecales analizadas por hibridación de fluorescencia *in situ* a la edad de 3 semanas

	Atópicos ^{a)}	No atópicos ^{a)}	Ensayo de la t para datos independientes ^{c)}
Clostridios ^{b)}	9,3 (de 3,8 a 22,9) x 10 ⁷	3,3 (de 1,8 a 6,1) x 10 ⁷	0,04
Bifidobacterias ^{b)}	1,8 (de 0,4 a 7,6) x 10 ⁹	6,1 (de 2,5 a 14,6) x 10 ⁹	0,11
Lactobacilos/enterococos ^{b)}	2,4 (de 1,1 a 5,2) x 10 ⁸	3,4 (de 1,5 a 7,6) x 10 ⁸	0,53
Bacteroides ^{b)}	1,1 (de 0,3 a 4,4) x 10 ⁸	0,5 (de 0,2 a 1,4) x 10 ⁸	0,30
Recuento celular total ^{b)}	8,9 (de 4,0 a 19,4) x 10 ⁹	9,6 (de 5,3 a 17,3) x 10 ⁹	0,87

^{a)} Lactantes con al menos una reacción positiva en el ensayo de punción epidérmica se consideraron atópicos, aquellos que no, no atópicos.

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

^{c)} El ensayo de la t para datos independientes se aplicó después de transformación logarítmica de recuentos bacterianos.

5

Referencias

Errola 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.

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.

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.

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.

Majamaa H, Isolauri E. Evaluation of the gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic excema. *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.

30

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.

5 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. Uso de bifidobacterias probióticas de la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb-12, para la preparación de una composición útil para prevención primaria de enfermedades atópicas en un lactante en alto riesgo de enfermedades atópicas.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición se administra a una mujer embarazada durante al menos dos semanas antes del parto y, después del parto, al lactante recién nacido durante al menos 2 meses.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que, después del parto, la composición se administra mediante la madre que amamanta.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición contiene de 1×10^8 a 1×10^{10} unidades formadoras de colonias de las bacterias.
- 15 5. Bifidobacterias de la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb-12 para su uso en un método para prevención primaria de enfermedades atópicas en un lactante en alto riesgo de enfermedades atópicas.

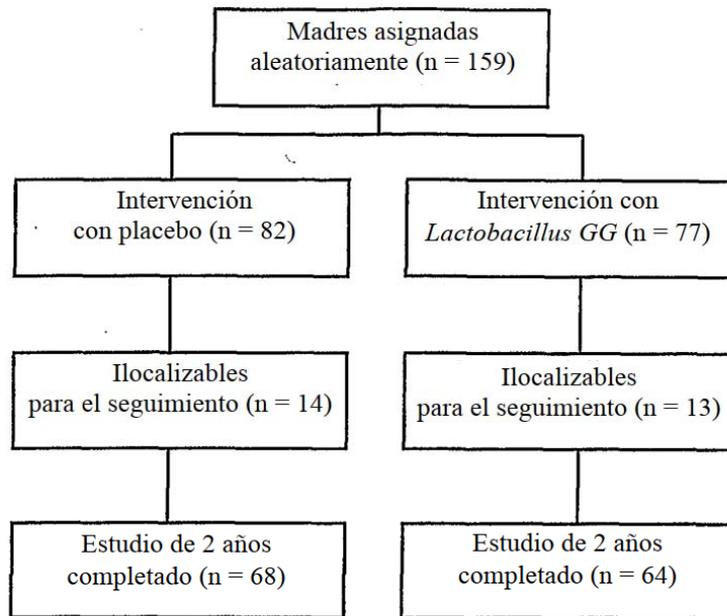


Figura 1

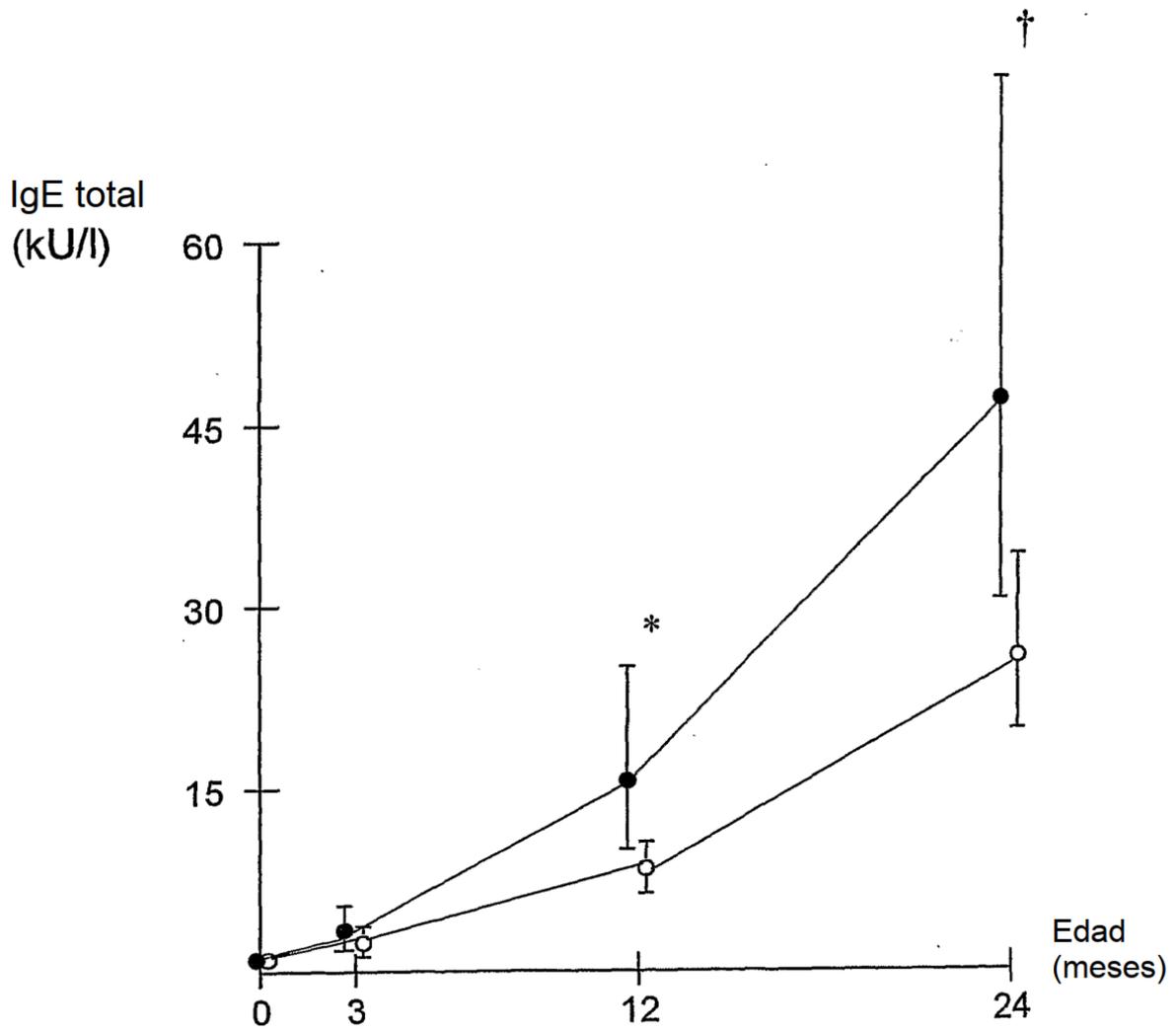


Figura 2

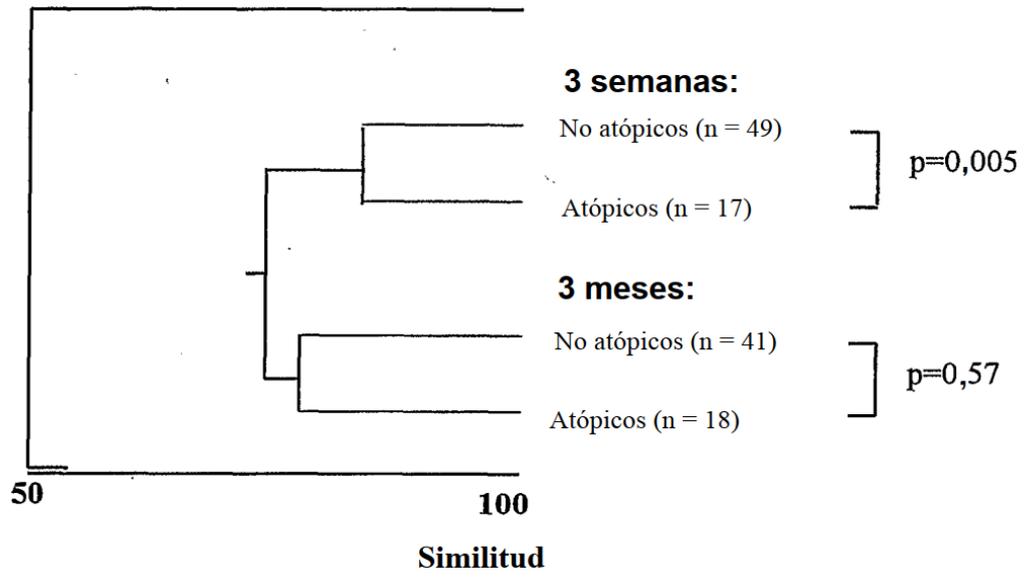


Figura 3