

Desarrollo de nuevos probióticos. Aplicación en la diarrea infantil causada por rotavirus

ÁLVARO GONZÁLEZ GARCINUÑO¹

Universidad de Salamanca

alvaro_gonzalez@usal.es

SUMARIO

En los últimos años la industria alimentaria camina hacia el desarrollo de alimentos funcionales, que supongan un enriquecimiento de la dieta y proporcionen una mejora considerable en la salud de quienes los consumen. El desarrollo de nuevos probióticos es una de las líneas de investigación principales en la Biotecnología Alimentaria. En este estudio se presenta una comparación de la efectividad de diferentes cepas probióticas, para la prevención de la diarrea causada por rotavirus en niños. Una enfermedad que tiene una alta incidencia en la infancia, provocando altas tasas de mortalidad y morbilidad.

Palabras clave: Probióticos, rotavirus, diarrea, vacunación.

SUMMARY

In recent years, food industries are moving in order to develop functional nourishment, which supply the diet and improve consumer health. Development of new probiotics is one of the most popular research lines nowadays in Food Biotechnology. This study shows a comparison in effectiveness between different probiotics strains, in order to prevent rotavirus diarrhea in children. This illness has a high incidence in childhood, causing high grades of mortality and morbidity.

Key words: Probiotics, rotavirus, diarrhea, vaccination.

1 Álvaro González Garcinuño es estudiante de 4º de Grado en Biotecnología por la Universidad de Salamanca.

1. LOS PROBIÓTICOS

La microbiota intestinal humana es realmente compleja e importante para procesos metabólicos y de defensa ante infecciones. Desde hace diez años, la investigación en probióticos ha aumentado considerablemente, buscándose optimizar los métodos de producción y sus propiedades para aportar mayores ventajas a los consumidores. Los probióticos se definen como microorganismos vivos, que administrados en las condiciones y cantidades adecuadas, proporcionan un beneficio en la salud del hospedador².

Los probióticos tienen particular importancia en la alimentación de niños en sus primeros años de vida. Se han desarrollado numerosos estudios que prueban la efectividad de distintos probióticos en diferentes enfermedades como infecciones gastrointestinales, úlceras, obesidad... Las bacterias más utilizadas como probióticos, suelen ser de los géneros *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Bifidobacterium*³, y en su mayoría son bacterias que producen ácido láctico.

2. LA DIARREA INFANTIL POR ROTAVIRUS. VIROLOGÍA Y VACUNAS

La diarrea por rotavirus es una de las principales causas de muerte entre los niños menores de cinco años. Cada día mueren en el mundo aproximadamente 600.000 niños a causa de esta infección por rotavirus, en su mayor parte en los países desarrollados⁴, suponiendo el cinco por ciento de las causas de muerte de los menores de cinco años. La mayoría de estas diarreas se producen en la época invernal. Por todos estos motivos se hace necesario un esfuerzo de desarrollo de alternativas para prevenir la infección por estos virus.

Los rotavirus son virus de la familia Reoviridae, compuestos por tres capas proteicas, que protegen el material genético: once copias de mRNA de doble cadena⁵.

La transmisión de los virus ocurre en pequeñas dosis; con menos de cien partículas víricas ya ocurre infección, a través de la vía fecal-oral, y los virus van a

2 J. V. Seale y M. Millar, "Probiotics: A new frontier for infection control", *Journal of Hospital Infection*, 84-1 (2013) 1-4.

3 Y. Waikar, "Review of probiotics in children", *Pediatric Infectious Disease*, 5-1 (2013) 9-12.

4 U. D. Parashar, C. J. Gibson, J. S. Bresse, R. I. Glass, "Rotavirus and severe childhood diarrhea", *Emergence Infectious Diseases*, 12-2 (2006) 304-306.

5 P. A. Gastañaduy, A. J. Hall, U. D. Parashar, "Chapter 21-Rotavirus", *Foodborne Infections and Intoxications* (2006) 303-311.

infectar los enterocitos de las vellosidades intestinales. Esta entrada provoca la producción de una enterotoxina que incrementa los niveles de calcio intracelular, provocando una liberación extra de ácido clorhídrico, lo que desencadena la diarrea⁶. La diarrea puede durar varios días y en algunos casos puede ser tan aguda que lleve a situaciones de deshidratación y con ello incluso a la muerte⁷.

Respecto a la inmunología de la enfermedad, se tiene conocimiento de la importancia que tiene para la protección de infecciones intestinales la inmunización con IgA que se obtiene de la leche materna. En niños que han estado poco tiempo alimentados con leche materna y pasan rápido a leche artificial, pueden notarse estas carencias de dosis de IgA, suponiendo una mayor susceptibilidad a estas infecciones.

Además, se ha observado que niños que resultaron infectados por rotavirus, desarrollan memoria inmunológica y son capaces de responder adecuadamente en futuras ocasiones⁸. Por eso, resulta de vital interés la posibilidad de añadir a estos preparados lácteos, bacterias que actúen como probióticos para lograr esta inmunización de los recién nacidos⁹. Hay muchos estudios probando distintas especies de bacterias, cuya síntesis presentaremos a lo largo del trabajo.

La otra alternativa al uso de probióticos para conseguir la inmunización de los recién nacidos, es el empleo de vacunas que generen memoria inmunológica en el sujeto vacunado. Se han desarrollado pruebas de diversos tipos de vacunas para prevenir la infección por rotavirus, resultando dos vacunas orales que ya han sido aprobadas en varios países (una de ellas derivada de antígeno de rotavirus humano y la otra con antígeno de rotavirus bovino)¹⁰. Las vacunas pueden tener mucha utilidad en los países desarrollados, porque se pueden incluir dentro de los planes de vacunación a los niños¹¹. Sin embargo, se han realizado diversos estudios, planteando la posibilidad de introducir estas vacunas en los planes de vacunación de

6 H. B. Greenberg, M. K. Estes, "Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination", *Gastroenterology* 136 (2009) 1939-1951.

7 M.K. Estes, A. Kapikian, "Rotaviruses" In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins (2007) 1946-1974. Philadelphia, PA.

8 F. R. Velazquez, D. O. Matson, J. J. Calva, L. Guerrero, A. L. Morrow, S. Carter-Campbell y col., "Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections", *New England Journal of Medicine* 335(1996) 1022-8.

9 M. T. Asensi, C. Martínez-Costa, and J. Buesa, "Anti-rotavirus antibodies in human milk: quantification and neutralizing activity" *Journal Pediatrics Gastroenterology Nutrition* 42 (2006) 560-567.

10 R. I. Glass y col. "Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges". *The Lancet* 368 (2006) 323-332.

11 P. H. Dennehey, "Rotavirus vaccines - an update", *Vaccine* 25 (2007) 3137-3141.

dichos países desarrollados^{12 13}, concluyéndose que el alto coste de la vacunación y su efectividad comparadas con el gasto sanitario que generan los pacientes que presentan la enfermedad, hace que la implantación de estas vacunas no sea rentable a nivel económico para los sistemas de salud nacionales. Por este motivo, se camina hacia el desarrollo de probióticos como la principal y más viable alternativa a la inmunización frente a las infecciones por rotavirus.

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EFECTIVIDAD DE LAS DIFERENTES CEPAS PROBIÓTICAS

3.1. BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM SP. INFANTIS [CECT 7210]

El grupo de investigación de Ordesa (Cataluña, España) desarrolló una cepa de *Bifidobacterium longum sp infantis*, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo, con el número 7210, y lo probó en líneas celulares in vitro y en ratones BALB/c obteniendo unos buenos resultados que parecen esperanzadores para solucionar las diarreas en los recién nacidos¹⁴. Además no aparecen resultados aparentes de toxicidad al incorporar esta cepa bacteriana.

Los resultados obtenidos con *Bifidobacterium longum sp. infantis* son los siguientes¹⁵:

- Al trabajar in vitro: Reducción de un 48% de la infección al trabajar con líneas celulares HT-29 (células epiteliales de colón de ser humano) y reducción de un 31% en la infección de la línea MA-104 (riñón de mono verde africano).
- Cuando se trabajaba in vivo-ratones: Se observa un incremento en la concentración de IgA en las heces fecales de los ratones del grupo con tratamiento, respecto al grupo sin tratamiento (30 mg/g frente a 18 mg/g). Se observa ese máximo a las 10 horas de la administración del probiótico, como se observa en la figura siguiente:

12 P. Aidelsburger, K. Grabein, K. Böhm, M. Dietl, J. Wasem, J. Koch, O. Wichmann, “Cost-effectiveness of childhood rotavirus vaccination in Germany”, *Vaccine* 32-17 (2014) 1964-1974.

13 A. T. Newall, P. Beutels, K. Macartney, J. Wood, C. R. MacIntyre, “The cost-effectiveness of rotavirus vaccination in Australia”, *Vaccine*, 25-52 (2014) 8851-60.

14 Es, E.-V. 2012. European patent application (51), I(19), 1-28.

15 J. A. Moreno y col., “Novel Probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 Strain Active against Rotavirus Infections”, *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2011) 8775-87883.

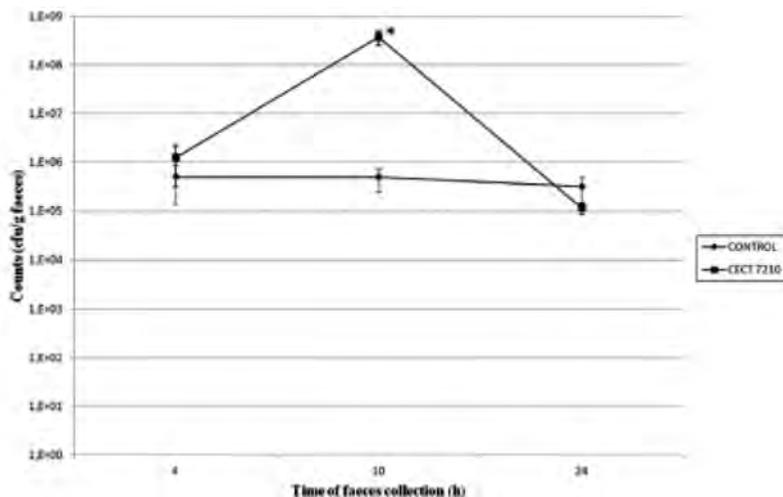


Imagen 1. Fuente: J. A. Moreno y col. 2011

- Estudios de viabilidad por el tracto digestivo: se probó la resistencia de la cepa a su paso por el tracto gastro-intestinal, obteniéndose estos resultados:
 - a) Viabilidad de bacterias al llegar al intestino tras jugos gástricos - 300000 de cada 100000000; aproximadamente 0.2%. Mucho menor rendimiento que el ya comercializado de LGG.
 - b) Resistencia al crecimiento en ácidos biliares; sí es capaz de crecer en ácidos biliares. Muy similar a LGG.
 - c) Adhesión a la mucosa intestinal; aproximadamente un 10% se adhiere. Mismo resultado que presenta LGG.
- Realización de estudios de toxicología. Se buscaron posibles metabolitos derivados de la actividad de este probiótico que pudieran resultar tóxicos o poco deseables para los recién nacidos que ingirieran este probiótico. Los resultados de toxicidad arrojaron valores muy bajos de compuestos nocivos, situándose dentro de los valores tolerados por la legislación FAO OMS.

3.2. *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG*

Esta bacteria fue la primera en ser descrita como posible probiótico para la prevención de la diarrea por rotavirus. En el estudio que presentamos¹⁶ se probó la

16 S. Misra, T. K. Sabui, N. K. Pal, “A randomized controlled trial to evaluate the efficacy of lactobacillus GG in infantile diarrhea” *The Journal of Pediatrics*, 155-1(2009) 129-32.

eficiencia como medida paliativa, es decir, en niños que ya se encontraban infectados. Aunque los resultados pueden interpretarse para el propósito preventivo, ya que el interés es analizar si mejoran o no la respuesta inmunológica.

Se sometieron al estudio 229 niños, la mitad de ellos fueron tratados con *Lactobacillus GG* (LGG) y la otra mitad con placebo, obteniéndose los siguientes resultados:

- a) Si analizamos la media de duración de la diarrea, el grupo tratado con LGG redujo la duración de la misma en un 40%.
- b) Si analizamos el número de pacientes con una deshidratación media o moderada, no encontramos diferencias entre los tratados con LGG y la muestra control-placebo.
- c) Si nos fijamos en el número de niños que vomitan a causa de la patología, el número es mayor incluso en los tratados que en los no tratados.

3.3. USO DE *LACTOBACILUS PERICASEI* ST11

Se probó el uso de esta cepa en niños con diarrea causada por rotavirus y por otros agentes distintos al rotavirus¹⁷. Se observó una disminución en el número y frecuencia de las deposiciones, así como en el grado de deshidratación de los niños infectados por virus distintos al rotavirus, y no se observó ningún efecto en las diarreas causadas por rotavirus. Por tanto, *Lactobacillus pericasei* ST11 no parece ser apropiado para la prevención ni para el tratamiento de la diarrea infantil por rotavirus.

3.4. USO DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* COMBINADO CON *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

En otro estudio se probó la eficacia de la administración en leche preparada de una combinación de las bacterias *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus*¹⁸. Estas son dos bacterias que siempre han sido muy usadas como probióti-

17 S. Sarker, S. Sultana, G. J. Fuchs, N. H. Alam, T. Azim, H. Brüssow, L. Hammarström, "*Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh", *Pediatrics* 116-2(2005) 221-8.

18 J. M. Saavedra, N. Bauman, I. Oung, J. Perman, R. H. Yolken, "Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus", *The Lancet*, 344-8929(1994), 1046-9.

cos, como suplemento a la leche¹⁹. Ahora se trata de probar su efectividad en la prevención de la diarrea por rotavirus.

Se administró a algunos niños leche con estas dos especies y a otros se les dejó con muestra control o placebo. Posteriormente se analizó la frecuencia de sus diarreas durante los siguientes meses. Se comprobó cómo la incidencia de las diarreas en los niños es mucho mayor en aquellos que incorporaron la fórmula bacteriana. Como se observa en la gráfica siguiente, un 90% de los niños que recibieron probiótico no volvieron a presentar diarrea en los meses siguientes. Sin embargo, sólo el 30% de los niños de la muestra control no volvieron a presentar esa diarrea. Por tanto, conseguimos una inmunización frente a rotavirus con esta fórmula probiótica.

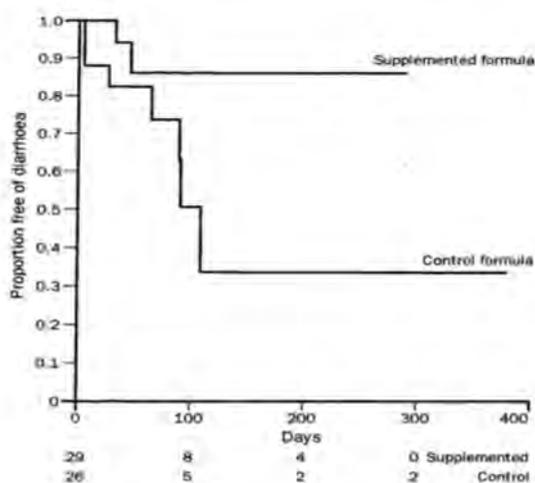


Imagen 2. Fuente: J. Saavedra y col. (1994).

Sin embargo, en el estudio se comprobó que este probiótico no afectaba al grado de deshidratación de los niños, ni al número y cantidad de las deposiciones durante la enfermedad. Tan sólo reducía el número de episodios y de incidencia de la enfermedad.

19 T. Takano, N. Yamamoto, 2002. "Health effects of fermented milks", *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2 (2002) 483-488.

3.5. USO DE SACCHAROMYCES BOULARDII

Esta será la única levadura que estudiemos como posible probiótico para combatir la diarrea por rotavirus, ya que como comentamos anteriormente, suelen ser bacterias lácticas las que realizan esta función. Se administró *Saccharomyces boulardii* a un grupo de niños de veintidós meses²⁰, y se observó que la capacidad de rehidratación tras los días principales de la diarrea mejoraba en los niños que habían sido alimentados con el suplemento de la levadura. Aún así, esta levadura no reducía ni los vómitos, ni las deposiciones, ni reducía la incidencia de la diarrea en la población.

3.6. USO DE BIFIDOBACTERIUM LACTIS

Bifidobacterium lactis es una de las principales bacterias que se encuentran presentes en el intestino humano. En el mismo estudio que el expuesto en el apartado anterior se probó su eficiencia como probiótico para las diarreas en niños²⁰, y se observó que esta bacteria sí reducía la duración media de la diarrea en los niños, y además reducía las hospitalizaciones; es decir, reducía la incidencia de la enfermedad a quienes habían consumido *Bifidobacterium lactis*.

4. OTRA ALTERNATIVA A LA DIARREA: TRATAMIENTO QUÍMICO CON NITAZOXANIDA

Desde hace años se trabaja en descubrir posibles alternativas a los probióticos, con productos de la química tradicional. Se ha probado la eficiencia de la nitazoxanida para este fin en la diarrea infantil²¹.

La nitazoxanida es una benzammina nitrotiazólica, que se ha visto efectiva en el tratamiento de numerosas enfermedades causadas por parásitos (protozoos y helmintos) tales como: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Ascaris lumbricoides*. El mecanismo de acción de esta droga radica en su

20 O. Erdoğan, B. Tanyeri, E. Torun, E. Gönüllü, H. Arslan, U. Erenberk, F. Oktem, "The comparison of the efficacy of two different probiotics in rotavirus gastroenteritis in children", *Journal of Tropical Medicine* (2012) 1-5.

21 H. M. Gilles, P.S. Hoffman, "Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanida" *Trends in Parasitology*, 18-3(2002) 95-97.

capacidad para bloquear la oxidoreductasa del piruvato dependiente de ferredoxina, clave en el transporte de electrones de estos parásitos²². También se ha descrito la posibilidad de controlar algunas enfermedades víricas como la hepatitis B, o la diarrea causada por rotavirus.

En varios estudios se ha probado la eficiencia de la nitazoxanida como compuesto químico que reduce la duración de la diarrea en los niños²³. Como observamos en la gráfica siguiente, tomada del estudio en cuestión, los pacientes tratados con este compuesto reducen el tiempo de duración de la diarrea, terminando la diarrea una media de dos días antes que el grupo control.

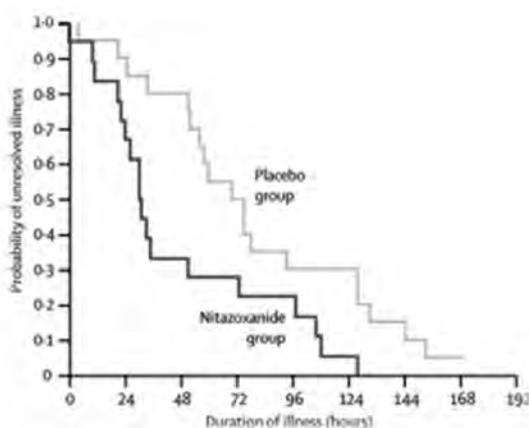


Imagen 3. Fuente: J. F. Rossignol y col. (2006).

La nitazoxanida presenta además la ventaja de ser un compuesto químico bien tolerado por el organismo, sin importantes efectos adversos, sin alterar el electrocardiograma ni las constantes vitales y hematológicas de quienes lo consumen. Sólo en un porcentaje inferior al uno por ciento se han detectado pequeños efectos secundarios tales como vómitos, incremento del apetito, salivación descontrolada, etc.²⁴

22 O. Kayser, A. F. Kiderlen, S. L. Croft, “Bioactive Natural Products”, *Studies in Natural Products Chemistry* 26 (2011) 779-848.

23 J. F. Rossignol, M. Abu-Zekry, A. Hussein, M. G. Santoro, “Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhea: randomised double-blind placebo-controlled trial” *The Lancet* 368-9530(2006), 124-9.

24 L.M. Fox, L. D. Saravolatz, “Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent”, *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40-8(2005), 1173-80.

Se ha comparado la eficiencia de la nitazoxanida con la de los probióticos en algún estudio, y se ha visto que pueden ser productos prácticamente sustitutivos²⁵. Se administró a un grupo de pacientes nitazoxamida en dosis de 15mg/kg/día; a otro grupo, un coctel de probióticos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*...) a razón de 2,5 millones de células por día; y se reservó otro grupo control. Se estudió la duración de la diarrea en los tres grupos y se observó que el descenso ocurría según se observa en el gráfico:

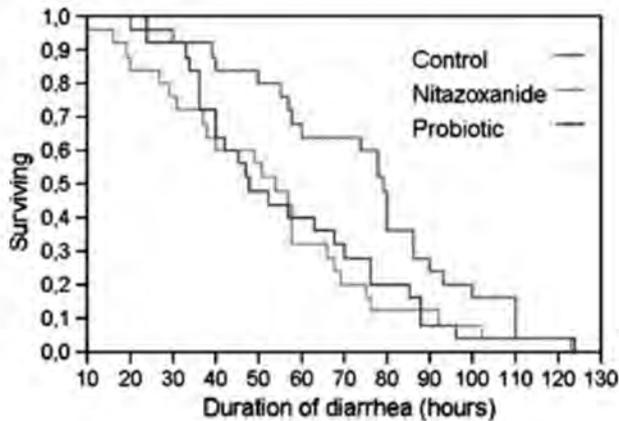


Imagen 4. Fuente: C. G. Teran, C. N. Teran, P. Villarroel (2009).

Por tanto, observamos cómo es prácticamente indiferente el tratamiento con uno o con otro, ya que las curvas van parejas, a una distancia considerable del grupo control. Es cierto que se aprecia, y resulta de vital interés, que el efecto de la nitazoxanida es más inmediato, pues comienza a reducir prácticamente desde el momento de la incorporación del fármaco, mientras que el probiótico realiza su función a partir de las 36 horas desde su incorporación; desde ese momento, va reduciendo más rápido la infección que el tratamiento químico. Sin embargo, este estudio no refleja los efectos benéficos que puede presentar la incorporación de probióticos para futuras infecciones a través de la inmunización del organismo; hecho que un compuesto químico no puede realizar.

25 C. G. Teran, C. N. Teran-Escalera, P. Villarroel, "Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children", *International Journal of Infectious Diseases: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 13-4(2009) 518-23.

5. CONCLUSIONES

Durante este estudio se han presentado las diferentes alternativas posibles para reducir el problema de la diarrea infantil causada por rotavirus. Se han analizado las vacunas preventivas utilizando antígenos purificados del virus, diferentes cepas probióticas, cada una con diferente efectividad, y finalmente el tratamiento químico utilizado, la nitazoxanida. En la tabla siguiente, se presentan, a modo resumen las diferentes opciones, con las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas.

Opción	Ventajas	Inconvenientes
Vacunas	Inmunización previa a la infección por rotavirus	Elevado coste-beneficio de implantar el sistema
Bifidobacterium bifidum sp. infantis	Buenos resultados en cultivos y ratones. Comprobada su capacidad preventiva.	No hay datos en seres humanos.
Lactobacillus rhamnosus GG	Reducen bastante la duración de la diarrea.	No reducen ni los vómitos ni la deshidratación.
Lactobacillus pericasei St11	Efecto en diarreas causadas por otros patógenos.	Sin efecto en la diarrea causada por rotavirus.
Bifidobacterium bifidum + Streptococcus thermophilus	Buena prevención de la diarrea. Reducción en un 90%	No reducen ni la deshidratación ni las deposiciones en quienes presentan la diarrea.
Saccharomyces boulardii	Mejora la rehidratación tras la diarrea.	No mejora ni vómitos, ni deposiciones, ni previene de futuras infecciones.
Bifidobacterium lactis	Reduce la deshidratación y previene la infección (bajan las hospitalizaciones)	
Nitazoxanida	Reduce la duración de la diarrea. No hay efectos secundarios.	No sirve para prevención. No consigue inmunizar.

Una de las conclusiones a las que se llega con este estudio es la necesidad de seguir trabajando en el desarrollo de nuevas formas para prevenir la diarrea infantil causada por rotavirus.

Por otra parte, el tratamiento químico con nitazoxanida parece resultar muy apropiado y rentable a nivel de implantación en el sistema nacional de salud. La opción de vacunar parece de momento descartada, y sólo se podrá implantar si se reduce su precio de venta.

Por último, cabe destacar que los probióticos, en sus diferentes especies, ofrecen la alternativa más natural y viable para la prevención de la infección. En particular *Bifidobacterium bifidum* sp. *infantis* y *Bifidobacterium lactis*. Estas dos especies consiguen aumentar la cantidad de IgA en los niños que no han sido suficientemente inmunizados con leche materna. Un sistema a continuar investigando sería la implantación de un coctel de probióticos, aprovechando los beneficios que cada uno aporta al organismo, para conseguir una protección plena frente a los rotavirus.