

## **1. MICROBIOTA INTESTINAL.**

El tracto gastrointestinal (GI) constituye la principal superficie de intercambio y comunicación entre el medio externo y el medio interno en el ser humano. La mucosa que lo recubre es la segunda superficie en extensión del organismo (250 m<sup>2</sup>) y constituye la principal zona de contacto y defensa del ser humano frente a agentes externos como bacterias, virus y toxinas. La microbiota presente en el tracto gastrointestinal es un complejo ecosistema compuesto por varios cientos de especies de microorganismos, la mayoría de ellos bacterias, que se localizan tanto en las superficies mucosas como en la luz del tubo digestivo. Incluye unos 100 billones de bacterias pertenecientes a entre 500 y 1.000 especies distintas (Eckburg y col., 2005) y se ha estimado que este número de bacterias que componen la microbiota intestinal alcanza recuentos diez veces superiores al de las células totales del organismo, lo que hace que pueda considerarse colectivamente como un “órgano” activo, cuyo metabolismo influye de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, ejerciendo un fuerte impacto sobre la fisiología humana (Ley y col., 2006). Esta microbiota, aunque tiene importantes beneficios sobre la salud humana puede comportarse, bajo determinadas circunstancias, tales como la alteración física o estructural de la barrera intestinal, como potencialmente patógena dada la capacidad de estos microorganismos de invadir al huésped y originar diferentes infecciones y enfermedades (Guarner y Malagelada, 2003).

### **1.1. Funciones de la microbiota intestinal.**

La microbiota intestinal juega un papel fundamental en la salud del ser humano participando en diferentes funciones. Estudios de colonización intestinal controlada han permitido identificar tres funciones primarias de la microflora intestinal (Roberfroid y col., 1995; Guarner y Malagelada, 2003):

\* **Nutrición y metabolismo**, como consecuencia de la actividad bioquímica de la flora se libera energía en forma de ácidos grasos de cadena corta, se favorece la producción de vitaminas y la absorción de calcio y hierro en el colon, entre otras.

\* **Tróficas**, sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal y sobre el desarrollo y modulación del sistema inmune.

\* **Protección**, que previenen de la invasión por agentes infecciosos externos o el sobrecrecimiento de especies residentes con potencial patógeno.

### **1.1.1. Funciones de nutrición y metabolismo.**

El metabolismo de la microbiota intestinal representa una parte importante de toda la actividad bioquímica que se desarrolla en el organismo y tiene una gran influencia en el estado nutritivo y la salud del individuo (Reid y col., 2003). Dichas funciones no sólo derivan de la acción directa de la microbiota sobre los componentes de la dieta, sino también de su acción indirecta sobre el huésped, al inducir la expresión de genes implicados en el metabolismo de nutrientes (Hooper y col., 2002). Entre las funciones metabólicas de la flora intestinal se encuentran:

- La generación de nutrientes asimilables por fermentación a partir de compuestos no digeribles como hidratos de carbono tales como polisacáridos de cadena larga (celulosa, hemicelulosa, gomas, pectinas), a partir de algunos oligosacáridos que escapan de la digestión, de azúcares no absorbidos y de alcoholes (Cummings y col., 1987; Cummings y col., 1996). El punto final es la generación de ácidos grasos de cadena corta. Estos compuestos también son generados a partir del metabolismo anaeróbico de péptidos y proteínas, pero al mismo tiempo se producen una serie de sustancias potencialmente tóxicas para

el ser humano entre las que se incluyen amonio, aminas, fenoles, tioles e indoles (Macfarlane y col., 1986; Smith y Macfarlane, 1996).

- El aporte de nuevos nutrientes (vitaminas y minerales) mediante su síntesis o acumulación, como por ejemplo la vitamina K2 y la vitamina B12. La microbiota intestinal puede sintetizar vitamina K2 o menaquinona. Las bacterias que la producen son *Bacteroides fragilis* y *Escherichia coli*. Esta vitamina es importante para la salud ósea y vascular y su déficit ha sido asociado con una disminución de la densidad mineral, incremento de fracturas, incremento de enfermedad cardiovascular y problemas de hemorragia intracraneal en recién nacidos (Greer, 2010). La biosíntesis de la vitamina B12 o cobalamina se restringe exclusivamente a los microorganismos. En la naturaleza existen dos rutas biosintéticas de vitamina B12, una aeróbica (oxígeno dependiente) que se encuentra en microorganismos como *Pseudomonas denitrificans* y una anaeróbica (oxígeno independiente) llevada a cabo en *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium shermanii* y *Salmonella tiphymurium* (Martens y col., 2002). Durante la vida fetal y la infancia, esta vitamina es importante para el crecimiento normal y el desarrollo del sistema nervioso (Hay y col., 2008).

- La reducción de compuestos perjudiciales o antinutrientes (por ejemplo, el colesterol y los fitatos) por asimilación, degradación o inhibición de su síntesis endógena.

Como resultado de estas complejas actividades metabólicas se produce energía y sustratos absorbibles para el hospedador, pero concomitantemente también se genera energía y productos nutritivos que permiten y favorecen el crecimiento y proliferación de las bacterias presentes en la microbiota.

### **1.1.2. Funciones tróficas.**

La proliferación y la diferenciación de las células epiteliales intestinales está influenciada por la interacción con los microorganismos residentes en la flora intestinal (Hooper y col., 2001; Gordon y col., 1997). Posiblemente, el papel más importante de los ácidos grasos de cadena corta, uno de los compuestos generados por el metabolismo de la flora bacteriana, sobre la fisiología del colon es su efecto trófico sobre el epitelio intestinal. Por ejemplo, el butirato es casi íntegramente consumido por el epitelio del colon, y supone una gran fuente de energía para los colonocitos (Cummins y col., 1987).

Existen millones de interacciones entre las bacterias, el epitelio y el tejido inmunológico subyacente, que paso a paso van programando y modulando un sistema de defensa muy potente y complejo. Así, la interacción entre el tejido linfóide asociado a la mucosa del intestino y la microbiota en las primeras etapas de la vida es crucial para el desarrollo de la propia mucosa y de los circuitos reguladores del sistema inmune.

### **1.1.3. Funciones protectoras: Efecto barrera.**

Las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal constituyen una línea crucial de resistencia frente a la colonización por microorganismos exógenos y, por tanto, son fundamentales en la prevención de la invasión de tejidos por diferentes patógenos. Es el denominado “efecto barrera”.

En esta línea de resistencia, además de las bacterias residentes también participan bacterias oportunistas, presentes en el intestino pero que tienen un crecimiento restringido. El equilibrio entre las diferentes especies de bacterias residentes en la flora aporta estabilidad en la población microbiana dentro de un mismo individuo bajo condiciones normales. Sin embargo, algunas circunstancias como el uso de antibióticos puede alterar el balance ecológico y permitir el

sobrecrecimiento de especies con potencial patogenicidad tales como *Clostridium difficile*, asociado con colitis pseudomembranosa (Van der Waaij, 1989).

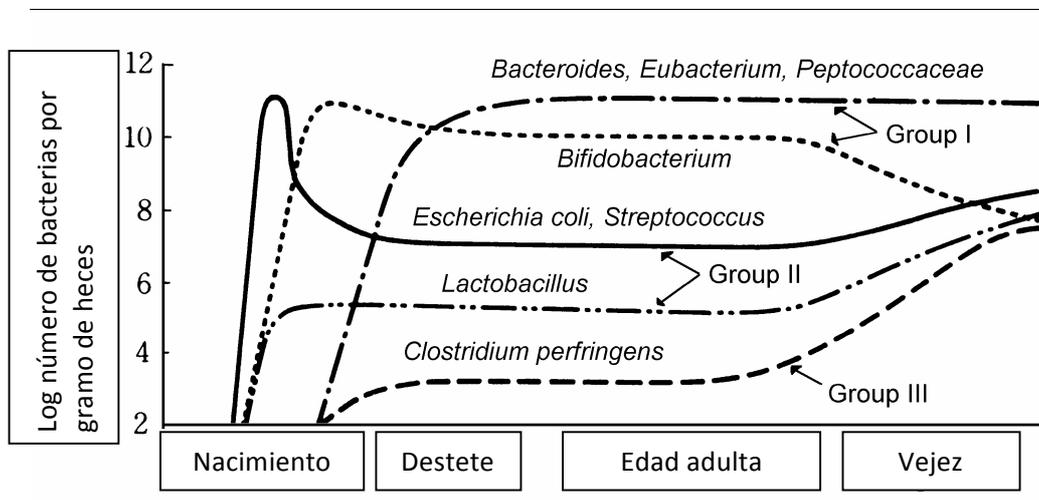
El efecto barrera del intestino depende también de la integridad de la mucosa y de la reactividad de algunos factores de defensa dinámicos tales como la sangre circulante de la mucosa, secreciones epiteliales y células inmunocompetentes.

Entre los mecanismos implicados en las funciones de protección de la microbiota frente a la invasión de microorganismos patógenos se encuentran:

- a) Competición de las bacterias comensales por lugares de unión situados en el borde en cepillo de las células epiteliales intestinales. La adhesión de bacterias no patógenas puede prevenir la unión y posterior penetración de bacterias patógenas enteroinvasivas entre las células epiteliales (Bernet y col., 1994).
- b) Competición de las bacterias comensales por los nutrientes evitando que éstos sean utilizados por bacterias patógenas u oportunistas. En la relación simbiótica que se establece entre la flora y el hospedador, éste proporciona activamente a las bacterias comensales los nutrientes necesarios para su metabolismo, que los utilizan y evitan un exceso de estos, lo que favorecería el consumo por parte de otros microorganismos con potencial patogenicidad para el hospedador.
- c) Producción de sustancias antimicrobianas llamadas bacteriocinas por parte de las bacterias residentes que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. La mayoría de ellas son proteínas degradables por proteasas digestivas (Brook, 1999; Lievin y col., 2000).

### 1.2. Composición de la microbiota intestinal.

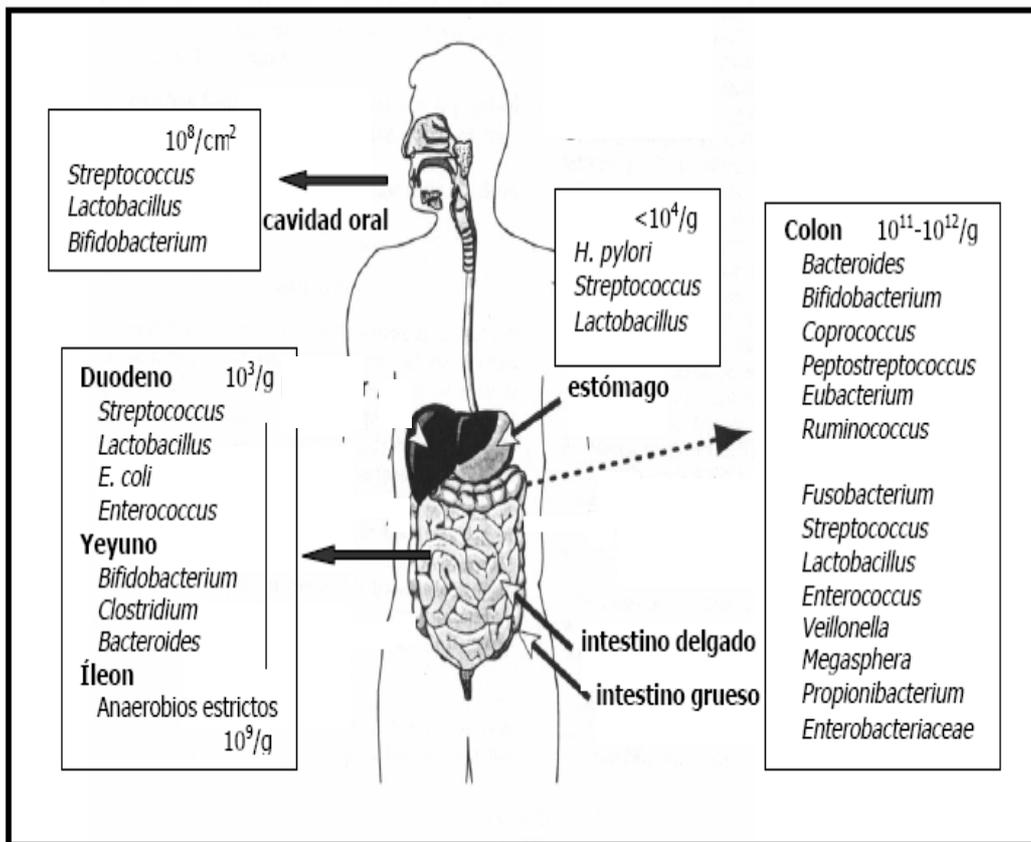
Cada individuo desde su nacimiento y, hasta que alcanza la edad adulta, va adquiriendo una microbiota intestinal relativamente estable (**Figura 1**). En la microbiota del adulto se ha visto que pueden coexistir cientos de especies pertenecientes a un mismo género, con una combinación particular de especies predominantes, estable en cada individuo, pero que puede variar de unos individuos a otros (Simon y Gorbach, 1984; Roberfroid y col., 1995; Kimura y col., 1997; Sghir y col., 2000).



**Figura 1.** Evolución de la composición de la flora intestinal desde el nacimiento hasta la vejez (Mitsuoka 1984).

Además de por la edad, el tipo y la concentración de bacterias también varía en función de la localización anatómica dentro del tubo digestivo (**Figura 2**).

En la cavidad oral, el número de bacterias es aproximadamente de  $10^7$  a  $10^8$  unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (ufc/cm<sup>2</sup>) y las principales especies encontradas pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.



**Figura 2.** Tipos de flora bacteriana según su localización dentro del tubo digestivo (adaptado de Hartemink, 1999).

La microflora del estómago está formada, fundamentalmente, por microorganismos grampositivos en concentraciones bajas, alrededor de  $10^3$  ufc/g. Son microorganismos altamente tolerantes al medio ácido y residen en la mucosa situada sobre el epitelio gástrico. Esta microflora la constituyen especies de los géneros *Estreptococos*, *Lactobacilos* y, en ocasiones, *Clostridium perfringens* y *Helicobacter pylori*.

En los tramos intestinales altos persiste un pH relativamente ácido por lo que la colonización es similar a la del estómago. Según se avanza en el intestino delgado, la acidez va disminuyendo, se va estableciendo un medio alcalino y la colonización por bacterias aumenta progresivamente desde concentraciones de  $10^4$  ufc/g en el duodeno proximal hasta de  $10^7$  ufc/g en íleon terminal,

encontrando desde especies aerobias y anaerobias facultativas tales como *Streptococos*, *Estafilococos*, *Lactobacilos* y alguna especie de *Enterobacterias* y *Clostridios*, hasta especies anaerobias estrictas como *Veillonella spp.*, *Bacteroides spp.*, *Eubacterium spp.*, etc.

En el colon, el tiempo de tránsito se reduce y el pH es más neutro y apropiado para el crecimiento bacteriano, por lo que la población de microorganismos es mucho mayor, alcanzando concentraciones de  $10^{11}$ - $10^{12}$  ufc/g. Esto supone que más del 95% de la población bacteriana total del intestino se concentra en el íleon distal (Simon y Gorbach, 1984), y que una alta proporción de la masa fecal, aproximadamente el 60%, lo constituyen bacterias (Borriello, 1986).

En general, en el colon predominan las especies de bacterias anaerobias estrictas sobre las especies de anaerobias facultativas, con proporciones que varían desde 10:1 hasta 1000:1 (Ducluzeau, 1993). Existe una flora dominante constituida por *Bacteroides*, *Bifidobacterias* y *Peptococos* y una flora satélite formada por *Enterobacterias*, *Streptococos* y *Lactobacilos* (Eckburg y col., 2005).

A pesar de la gran diversidad de bacterias que constituyen la flora intestinal, estudios recientes han demostrado que la mayoría de estas especies (aproximadamente el 98%) pertenecen a cuatro divisiones bacterianas: *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%) y *Actinobacteria* (3%) (Hattori y Taylor, 2009).

La división ***Firmicutes*** fue creada originalmente para incluir a todas las bacterias gram positivas, pero más recientemente se ha restringido a un grupo base de formas relacionadas, llamado grupo de contenido guanina más citosina bajo (G+C), en contraposición con la división *Actinobacteria* que tiene alto contenido en G+C. Las *firmicutes* tienen forma de coco o de bacilo. El grupo se

divide típicamente en tres clases: Bacilli (aerobios facultativos u obligados), Clostridia (organismos anaerobios) y Mollicutes.

La división **Bacteroidetes** incluye tres clases. La clase *Bacteroidetes* es con diferencia la más estudiada e incluye el género *Bacteroides*, que son patógenos oportunistas. Las otras dos clases de *Bacteroidetes* raramente son patógenas para los seres humanos y son las denominadas *Flavobacteria* y *Sphingobacteria*.

La división **Proteobacteria** se divide en cinco grupos, generalmente considerados clases y formados por bacterias gramnegativas de morfología muy variable. Se clasifican en base a la homología de las secuencias de nucleótidos de la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr). Estos grupos se denominan según las letras griegas de alpha a epsilon. Las proteobacterias gamma abarcan varios grupos importantes entre los que se encuentran las bacterias pertenecientes a la Familia **Enterobacteriaceae**.

La división **Actinobacteria** es un grupo de bacterias gram positivas con un alto contenido en G+C. Dentro de este grupo se incluyen: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* y *Streptomyces*.

### 1.3. Métodos de estudio de la microbiota intestinal.

El estudio de la flora intestinal es complejo. El método tradicional es el cultivo convencional. En éste, se lleva a cabo el análisis bacteriológico de la flora fecal por aislamiento de bacterias en medios de crecimiento selectivos. De esta forma, se ha demostrado que las bacterias anaerobias estrictas superan en número a las anaerobias facultativas por un factor de 100 a 1000. No obstante, muchas de las bacterias que pueden ser observadas mediante examen microscópico de muestras fecales diluidas no crecen en medios de cultivo. Se

estima que esta cifra ronda el 40-80% (Wilson y Blitchington, 1996; Suau y col., 1999). Por tanto, a pesar de ser importantes desde un punto de vista biológico, los métodos de cultivo convencionales proporcionan una información limitada, por lo que son necesarios otros métodos de estudio que permitan una completa caracterización de la microbiota. Estos métodos se basan en técnicas de biología molecular que permiten caracterizar, entre otras, las bacterias no cultivables, detectando y analizando genes de bacterias en heces de humanos. En la actualidad mediante estos métodos se están identificando especies no conocidas previamente (Suau y col., 1999; Zoetendal y col., 2004), permitiendo además conocer las especies predominantes en diferentes localizaciones intestinales (Zoetendal y col., 2002).

Las técnicas de biología molecular que permiten explorar la diversidad de las comunidades bacterianas en la microflora intestinal, que desde hace ya una década vienen complementando a las de cultivo convencional, se han basado en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes 16S de ADNr.

El 16S ADNr, que codifica el 16S ARNr, es un marcador molecular de un gran valor filogenético porque diferentes fragmentos de su secuencia presentan niveles diferentes de variabilidad. Así, el ADNr de las especies presentes en las muestras estudiadas es amplificado, clonado y secuenciado. La comparación con secuencias almacenadas en base de datos de especies conocidas permite el reconocimiento de las presentes en el hábitat intestinal (Vaughan y col., 2000). Si en vez de la secuenciación directa del fragmento amplificado, éste actúa como diana de sondas de oligonucleótidos con secuencias conocidas del ADNr 16S se habla de técnicas de hibridación. Si además las sondas van marcadas con un agente fluorescente la técnica se denomina hibridación fluorescente (Tannock, 2001).

Inicialmente estas técnicas de biología molecular, a pesar de haber supuesto grandes avances en la caracterización de la microbiota intestinal, no aportaron una rigurosa información cuantitativa de los diferentes grupos microbianos. Posteriormente, se han desarrollado métodos de cuantificación de grupos bacterianos de la microflora intestinal tales como “Dot blot hibridización” (Sghir y col., 2000) y “PCR a tiempo real” (Matsuki y col., 2004).

Otros métodos relacionados con el estudio de la microbiota intestinal, no ya como herramienta filogenética para la identificación de las diferentes especies bacterianas sino para la comparación entre cepas de una misma especie, son los métodos de tipificación molecular (Tannock, 2001). La comparación entre las cepas de una misma especie permite el estudio de la dinámica de la microflora intestinal a lo largo del tiempo y así, diferenciar las cepas residentes que permanecen periodos de tiempo prolongados en la microflora, de aquellas transitorias, que aparecen puntualmente. Alguno de estos métodos de tipificación molecular son: el análisis del ADN cromosómico mediante macrorestricción como la electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE), el análisis de ADN mediante procedimientos de restricción e hibridación como el ribotipado y el estudio de polimorfismos de ADN mediante amplificación múltiple arbitraria realizando una PCR con iniciadores arbitrarios: AP-PCR (“*arbitrary primer PCR*”), o utilizando como cebadores iniciadores específicos de secuencias repetidas encontradas a lo largo del genoma: REP-PCR (“*repetitive extragenic palindromic PCR*”).

Recientemente, existen autores que plantean la necesidad de realizar los estudios de la composición de la microbiota intestinal en el ser humano no de forma aislada sino teniendo en cuenta también al hospedador, ya que las interacciones microbianas ocurren entre la superficie del epitelio intestinal y los microorganismos. En este planteamiento se basa el conocido “*the human microbiome project (HMP)*”, que fue iniciado en 2007 con el objetivo de conocer e integrar la información genómica de la microbiota y del hospedador (Hattori y

Taylor, 2009). Los métodos de estudio de este proyecto se basan en lo que se conoce como metagenómica. La metagenómica es un potente método de estudio para analizar la información de los genes presentes, estudiando la proporción de las regiones codificantes de proteínas que existen en el genoma (Noguchi y col., 2006)

## **2. DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL RECIÉN NACIDO.**

### **2.1. Cronología de la colonización intestinal en el neonato.**

La colonización del tracto gastrointestinal del neonato, estéril al inicio del parto, comienza durante éste y en las primeras cuarenta y ocho horas tras el nacimiento. La secuencia de colonización por las diferentes especies bacterianas está regulada, en su inicio, por las características físico-químicas del entorno intestinal. Al principio, un potencial de oxido-reducción positivo (alto contenido de oxígeno) en el intestino del recién nacido promueve la expansión de bacterias aerobias o anaerobias facultativas tales como *E. coli* y otras Enterobacterias, Enterococos y Estafilococos. Gradualmente, el consumo de oxígeno por estas bacterias y la producción de nuevos metabolitos, transforman el ambiente intestinal a uno más reducido, lo que permite el establecimiento de una población anaerobia estricta dominada por Bifidobacterias (que suelen aparecer sobre los primeros cuatro o cinco días), Bacteroides y Clostridios, cuyo papel en la maduración intestinal es muy importante (Penders y col., 2006). Posteriormente tiene lugar la colonización por Lactobacilos y otras bacterias anaerobias facultativas (Morelli, 2008).

Estas bacterias que se establecen en los primeros días en el neonato proceden principalmente de la madre, siendo adquiridas por inoculación oral a partir de flora vaginal e intestinal materna, y también del medio ambiente.

Aproximadamente tras la primera semana de vida, la flora comienza a definirse y establecerse, existiendo variaciones interindividuales hasta al menos el primer año de vida, momento a partir del cual el ecosistema microbiano de cada niño, aunque todavía cambiante, se va asemejando cada vez más al de la flora intestinal de un adulto (Moreau y col., 1986; Palmer y col., 2007).

Desde un punto de vista cuantitativo, tras el nacimiento, la concentración de bacterias oscila entre  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^4$  ufc/g de heces, produciéndose un aumento rápido y regular de esta cantidad durante la primera semana de vida, hasta alcanzar niveles de  $10^9$  ufc/g de heces (Bezirtzoglou, 1997).

Las principales especies bacterianas aisladas al inicio son *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, y Enterobacterias, entre las que se encuentran *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* como especies predominantes, y con menor frecuencia *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* Otros bacilos gramnegativos no pertenecientes al grupo de las Enterobacterias como *Pseudomonas aeruginosa* también pueden aislarse, pero de forma excepcional.

A medida que transcurre el tiempo y siguiendo la secuencia de colonización, estas bacterias anaerobias facultativas son desplazadas por bacterias anaerobias estrictas como *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides grupo fragilis* así como otras especies de *Eubacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Veillonella spp.*, y *Fusobacterium spp.* (Bezirtzoglou, 1997; Favier y col., 2002).

## **2.2. Factores que influyen en la colonización intestinal del neonato.**

El establecimiento y diversidad de la microbiota intestinal en el neonato es un complejo proceso que está influenciado tanto por factores internos como por factores externos tales como la edad gestacional, el tipo de parto, la

hospitalización, diferencias geográficas, la administración de antibióticos y, fundamentalmente, el tipo de alimentación infantil (Fanaro y col., 2003).

### **2.2.1. Edad gestacional.**

No existe demasiada información sobre la influencia de la edad gestacional en el desarrollo de la flora intestinal del neonato, aunque parece estar claro que en el intestino de los niños nacidos pretérmino el patrón de colonización intestinal es diferente al de los niños nacidos a término. En general, los niños pretérmino muestran un retraso en la colonización y, ésta se produce por un número limitado de especies bacterianas, quizás debido a que, con frecuencia, suelen estar ingresados en unidades neonatales y reciben antibióticos tan pronto como nacen (Bennet y col., 1986). Las especies anaerobias, como por ejemplo las Bifidobacterias, colonizan más tarde a estos niños, aproximadamente a partir de los diez días, estableciéndose alrededor de los cuatro días en los nacidos a término. Por el contrario, la colonización por especies del género *Clostridium spp.*, tales como *C. difficile*, es más frecuente en los niños prematuros que en los nacidos a término (64% vs 23%) y, además se encuentran a mayores concentraciones (Penders y col., 2006).

En cuanto a la colonización por bacterias aerobias o anaerobias facultativas se ha comprobado que en niños pretérmino, en la primera semana de vida se encuentran altas concentraciones de Enterobacterias y Estreptococos. Entre las Enterobacterias, existe un predominio de especies de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* frente a las especies *E. coli* (Sakata y col., 1985) alcanzando proporciones del 55% en niños prematuros de bajo peso frente al 20% en los niños nacidos a término (Bennet y col., 1986).

### 2.2.2. Tipo de parto.

El tipo de parto es el primer factor y uno de los más importantes que afecta a la colonización intestinal del neonato. Durante el parto vía vaginal el niño encuentra un enorme número de especies bacterianas en el canal vaginal y área perineal de la madre adquiriendo, esencialmente, esta microflora materna. Se ha demostrado una fuerte asociación, tanto cualitativa como cuantitativa, entre la microflora materna y la del recién nacido. En estos niños, durante los primeros días, la flora está constituida principalmente por Estreptococos, aunque también se aíslan Estafilococos, Corinebacterias, cocos anaerobios, y Bacteroides. Posteriormente, se colonizan por Enterobacterias y, por último, por Bifidobacterias. Las especies de Lactobacilos, frecuentemente encontradas en las madres, raramente se aíslan en los recién nacidos (Mändar y Mikelsaar, 1996).

Por el contrario, en niños nacidos por cesárea, y por tanto sin contacto con la flora vaginal y perineal de la madre, el medio ambiente externo es extremadamente importante en la colonización bacteriana intestinal. Los niños son expuestos inicialmente a bacterias del ambiente hospitalario y a las del personal sanitario (Muroño y col., 1993) lo que determina de forma importante la composición de su microbiota intestinal.

Desde un punto de vista cualitativo, la microflora intestinal de los recién nacidos por cesárea está compuesta por un menor diversidad de géneros bacterianos en comparación con la de los niños nacidos por vía vaginal. La colonización gastrointestinal en estos niños se caracteriza por menor presencia de Bifidobacterias y especies del género *Bacteroides*, y por mayores recuentos de *Clostridium difficile* y *E. coli* (Orrhage y Nord, 1999, Penders y col., 2006). Igualmente se ha visto una mayor prevalencia de *Clostridium perfringens* en los niños nacidos por cesárea, hecho que se relaciona con la influencia del ambiente hospitalario (Bezirtzoglou, 1997). Sin embargo, la capacidad de colonización de estas bacterias es muy baja durante los primeros siete días de vida y,

transcurrido este periodo, el recuento de bacterias en el intestino del neonato depende en mayor medida de otros factores como el contacto con su madre y el tipo de alimentación (Morelli, 2008). Por tanto, aunque la colonización anaeróbica, especialmente Bacteriodes y Bifidobacterias, está retrasada en los niños nacidos por cesárea con respecto a los nacidos por parto vaginal, estas diferencias tienden a desaparecer durante el primer mes de vida (Bezirtzoglou, 1997).

### **2.2.3. Hospitalización.**

La hospitalización de los niños, independientemente de los tratamientos antibióticos recibidos durante ésta, produce cambios en su microbiota intestinal. En general, en los recién nacidos que requieren ingreso hospitalario, la colonización intestinal por diferentes especies de Enterobacterias como *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* y *E. coli*, y por especies de *Pseudomonas spp.* es más frecuente (Shooter y col., 1966). También se ha descrito que existen variaciones en los perfiles de colonización intestinal de los niños recién nacidos no sólo según los diferentes hospitales donde se encuentren ingresados sino también dentro de cada uno de estos, según las diferentes unidades neonatales. Estos patrones están influenciados por la carga microbiana del medio ambiente inmediato al que se expongan (Mackie y col., 1999; Orrhage y Nord, 1999).

### **2.2.4. Diferencias geográficas.**

Algunos estudios de colonización gastrointestinal en neonatos realizados en diferentes áreas geográficas han determinado que este factor también influye en los patrones de colonización. Los niveles de industrialización y desarrollo, así como las rutinas higiénicas ligadas a determinadas prácticas de actuación en diferentes áreas geográficas, tienen una fuerte influencia en la colonización de los recién nacidos (Hall y col., 1990; Fanaro y col., 2003).

Por ejemplo, se ha demostrado que en niños nacidos en países en vías de desarrollo, donde las condiciones higiénicas son limitadas, la colonización con especies de Enterobacterias es la misma independientemente de la influencia de otros factores como tipo de parto, etc (Mackie y col., 1999; Adlerberth y col., 1991). En estas condiciones, esta flora adquirida de forma temprana es inestable y estas Enterobacterias son patógenos potenciales que pueden invadir y causar infecciones extraintestinales. En los países más altamente industrializados, el problema puede ser opuesto. La higiene estricta usada en el cuidado neonatal puede retardar el establecimiento de una microflora funcionalmente activa con capacidad protectora.

#### **2.2.5. Uso de antibióticos.**

La administración de antibióticos en el neonato también influye en la colonización intestinal provocando una alteración global de la flora, entre cuyos principales efectos están una importante disminución de bacterias anaerobias tales como *Bifidobacterium spp.*, y *Bacteroides fragilis*, quedando como únicas especies anaerobias detectables las pertenecientes al género *Clostridium spp.* Por el contrario, las concentraciones de bacilos gramnegativos aerobios como *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, y *Pseudomonas spp.* aumentan (Adlerberth y col., 1999).

La magnitud del efecto de los antibióticos sobre el establecimiento de la microbiota está en función del tipo de antibiótico administrado (Penders y col., 2006). No obstante, tras algunas semanas desde la finalización del tratamiento, la mayoría de los microorganismos intestinales recuperan sus concentraciones iniciales (Dethlefsen y col., 2007).

### 2.2.6. Tipo de alimentación.

El tipo de alimentación se considera uno de los factores más importantes e influyentes en los patrones de colonización intestinal del neonato, sobre todo tras la primera semana de ingesta, momento en el que, bien con la alimentación con leche materna, o con fórmulas infantiles, la flora comienza a definirse en el recién nacido (Fanaro y col., 2003).

En general, la composición de la flora de niños que reciben lactancia materna, suele estar constituida principalmente por Bifidobacterias, y tras el inicio de la alimentación, la concentración de estas bacterias se incrementa rápidamente llegando a ser la especie dominante aproximadamente a los cinco días del inicio de la ingesta. Además, otros microorganismos como Estafilococos, Enterococos y Enterobacterias, también están presentes. Varios autores han destacado los altos niveles de especies de Estafilococos en las heces de neonatos alimentados con lactancia materna (George y col., 1996; Lundquist y col., 1985; Kay y col., 1990). Especies de los géneros *Clostridium* y *Bacteroides* se encuentran en menor proporción, especialmente éste último.

La leche de las mujeres sanas contiene más de  $10^9$  ufc/L de bacterias, cuyo perfil incluye fundamentalmente Estafilococos, Estreptococos, Corinebacterias, Lactobacilos, Micrococos, Propionobacterias y Bifidobacterias (Mackie y col., 1999). Recientemente se ha sugerido que la leche humana podría ser una fuente importante de Lactobacilos para el recién nacido ya que, en algunos trabajos se ha podido demostrar que cepas de Lactobacilos aisladas en la leche materna son idénticas a las encontradas en las muestras fecales de sus hijos (Martín y col., 2007).

Por el contrario, la microbiota de los niños alimentados con fórmulas artificiales contiene mayor concentración de *Bacteroides*, Clostridios y Enterobacterias (Rubaltelli, 1998). También se aíslan Bifidobacterias pero en

concentraciones inferiores a las encontradas en la flora fecal de niños alimentados con leche materna (Roberts y col., 1992; Penders y col., 2006). Estas diferencias se han confirmado tanto utilizando técnicas microbiológicas de cultivo como mediante técnicas moleculares (Mackie y col., 1999).

Pero quizás, las diferencias más importantes debidas a la alimentación sean más patentes en la presencia de diferentes especies dentro de cada género bacteriano que en los distintos géneros que componen la microbiota fecal del lactante. En relación a las Bifidobacterias, las especies más frecuentemente encontradas en niños con lactancia materna han sido *B. breve*, *B. bifidum* y *B. longum* subespecie *infantis* (Sakata y col., 2005; Matsuki y col., 2004). Con respecto a las fórmulas infantiles, se ha observado el mismo orden de aparición de las especies citadas en niños alimentados con fórmulas con prebióticos en relación a los niños que toman fórmulas sin prebióticos. Estos últimos presentan mayores recuentos de *B. catenatum* y *B. adolescentes*, especies que predominan en la microbiota fecal de los adultos (Haarman y Knol, 2005).

En la actualidad, y en contraposición a los datos previos, algunos autores han descrito perfiles microbianos similares en la flora fecal de los niños alimentados con leche materna y los niños alimentados con fórmulas artificiales avanzadas a las que se les han añadido ingredientes prebióticos como galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) que consiguen incrementar el número de Bifidobacterias y Lactobacilos intestinales, alcanzando una composición más similar a la leche materna (Adlerberth y Wold, 2009).

### **3. COMPOSICIÓN E INFLUENCIA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE ALIMENTACIÓN EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL NEONATO.**

La leche materna es el alimento preferido para la nutrición del recién nacido ya que le proporciona los nutrientes necesarios y en la cantidad adecuada para su crecimiento normal, además de protegerle frente a procesos infecciosos.

Por tanto, debe ser la única fuente de alimentación durante al menos los primeros 6 meses de vida (OMS, 2006).

La particular microbiota intestinal de los niños lactados a pecho está involucrada en los procesos que favorecen la salud intestinal del lactante protegiéndolo de sufrir infecciones gastrointestinales durante los primeros meses de vida, periodo que se caracteriza por la inmadurez intestinal y el desarrollo de la inmunidad adquirida.

La composición de la microbiota intestinal adquirida en el recién nacido alimentado con leche materna se relaciona con la presencia en ésta de determinadas sustancias biológicamente activas capaces de resistir el pH ácido del estómago y la acción de las sales biliares y que, a su vez estimulan selectivamente el desarrollo y la actividad de las Bifidobacterias y Lactobacilos. Estos compuestos son principalmente oligosacáridos, aunque también algunas proteínas del suero como la alfa-lactoalbúmina sirven como sustrato para el crecimiento de las bacterias en el tracto gastrointestinal. Los nucleótidos y la lactoferrina presentes en la leche materna constituyen otro grupo de sustancias con capacidad para modular la microbiota intestinal del lactante y favorecer la proliferación de Bifidobacterias (Coppa y col., 2006). Además la leche materna presenta una reducida capacidad tampón que permite que el contenido luminal de los lactantes sea acidificado más fácilmente como consecuencia de la fermentación bacteriana en el colon. Estos factores se han considerado otra razón para el menor crecimiento de anaerobios facultativos, Clostridios y Bacteroides observado en las heces de niños alimentados a pecho en relación a los alimentados con fórmula (Mountzouris y col., 2002).

No obstante, cuando las madres no pueden o no desean amamantar a sus hijos disponen de una gran variedad de fórmulas infantiles diseñadas para suplir a la leche materna asegurando el crecimiento y el desarrollo normal de los niños (Aggett y col., 2001).

Las fórmulas infantiles denominadas estándar tienen como base la leche de vaca desnatada, a la que se le añade proteína de suero, aceite vegetal, vitaminas y minerales para conseguir una composición lo más parecida posible a la de la leche materna. Sin embargo, no contienen la mayoría de las sustancias bioactivas presentes en la leche humana, como son hormonas, factores de crecimiento, factores inmunológicos, enzimas y células.

A medida que se ha ido profundizando en el conocimiento de las necesidades nutricionales del lactante y caracterizando los componentes de la leche materna así como sus funciones fisiológicas, la composición de las fórmulas infantiles ha ido mejorando y se ha intentado, mediante el diseño de alimentos o con suplementos funcionales, que sus efectos beneficiosos sobre la microbiota intestinal y la salud del niño sean lo más parecidos posible a los de la leche materna. Para ello, la industria alimentaria ha desarrollado productos con nuevos ingredientes como probióticos, prebióticos (fundamentalmente oligosacáridos), ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, nucleótidos y proteínas de alto valor biológico como la alfa-lactoalbúmina.

Entre otros efectos beneficiosos, se intenta conseguir una flora semejante a la de los niños alimentados con lactancia materna, debido a que estos niños durante el primer año de vida parecen tener una menor incidencia de infecciones, o éstas son menos graves que las padecidas por los niños alimentados con fórmulas (Pisacane y col., 1992. Alles y col., 2004). Este hecho parece estar relacionado con una mayor concentración de Bifidobacterias en el tracto gastrointestinal de los niños alimentados a pecho (Chierici y col., 1997).

Se ha demostrado que la influencia de las Bifidobacterias sobre las funciones del tracto intestinal, y en definitiva sobre la salud humana, es muy beneficiosa (Tungland y Meyer, 2002). Entre sus funciones podrían destacarse:

- Acción sobre la **flora y el entorno intestinal**. Las Bifidobacterias inhiben el crecimiento de bacterias implicadas en la putrefacción intestinal, además metabolizan un amplio número de oligosacáridos no digeribles de ácido acético a ácido láctico contribuyendo favorablemente a la actividad metabólica intestinal. Preparados de Bifidobacterias administrados por vía oral han sido usados en el tratamiento de varios desórdenes intestinales como reguladores del tránsito intestinal. Hotta y col., (1987) observaron en pacientes con diarrea, donde la flora intestinal se había alterado por la administración de antibióticos, que en todos ellos la frecuencia y la apariencia de las heces mejoró entre los 3 y 7 días posteriores a la administración del preparado de Bifidobacterias, restableciéndose incluso la flora normal intestinal con predominio de especies de Bifidobacterias. A nivel hepático se ha puesto de manifiesto el efecto beneficioso de las Bifidobacterias en procesos cirróticos mejorando los síntomas y disminuyendo niveles de amonio y fenoles en sangre.

- **Modulación de la respuesta inmune**. En lactantes que ingieren alimentación con diferentes oligosacáridos favoreciendo así el crecimiento de Bifidobacterias, se han observado incrementos significativos de las inmunoglobulinas secretoras endógenas tipo A (IgA) en la mucosa intestinal (Fukushima y col., 1998; Scholtens y col., 2008).

- **Capacidad para modular el riesgo de enfermedades alérgicas**. Existen evidencias que indican que en los lactantes la calidad de su microbiota intestinal está relacionada con el riesgo de desarrollar enfermedades atópicas. Los lactantes que no han sido colonizados por Bifidobacterias parecen estar sometidos a un riesgo más alto. Isolauri y col., (2000) demostraron que lactantes con eczema alimentados después del destete con una fórmula suplementada con *Lactobacillus rhamnosus* o *Bifidobacterium lactis* experimentaban mejorías de las lesiones cutáneas a los 6 meses, así como de sus marcadores de inflamación. En este sentido, también se ha observado que alteraciones en la microbiota intestinal durante las primeras etapas de la vida pueden preceder al desarrollo

de alergias. Penders y col., (2007) analizaron la microbiota de niños alérgicos y no alérgicos hallando que los primeros eran colonizados con más frecuencia por Clostridios incluyendo *Clostridium difficile* en relación a los niños no alérgicos.

### **3.1. Componentes de la leche materna y de fórmulas infantiles enriquecidas. Efectos funcionales.**

Los numerosos efectos beneficiosos de la leche materna han hecho que su composición haya sido estudiada en profundidad y que mediante la adición de determinados compuestos biológicamente activos a las fórmulas artificiales se esté intentando emular los efectos beneficiosos obtenidos con la lactancia. Entre los componentes de la leche materna se encuentran:

#### **3.1.1. Alfa-lactoalbúmina.**

La alfa-lactoalbúmina juega un importante papel bioquímico y nutricional para la madre y su hijo. Es la proteína del suero más importante cuantitativamente en la leche materna, sin embargo, es minoritaria en el suero de la leche de vaca (Rudolff y Kunz, 1997).

Recientes avances tecnológicos aplicados a la separación de las fracciones proteicas de la leche de vaca han permitido el desarrollo de un proceso que permite separar fracciones proteicas con una concentración sustancialmente más alta de alfa-lactoalbúmina (69%) que la contenida en el suero bovino estándar (Davis y col., 2008). Las fórmulas enriquecidas con alfa-lactoalbúmina elaboradas con esta fracción de suero permiten que las concentraciones de proteínas sean menores que en las fórmulas convencionales pero de mayor calidad y con un perfil de aminoácidos más similar al de la leche materna.

### 3.1.1.1. Efectos funcionales de la alfa-lactoalbúmina.

Entre los principales efectos funcionales de la alfa-lactoalbúmina de la alimentación encontramos:

- **Actividad antimicrobiana y bifidogénica.**

No existen muchos estudios que determinen la actividad antimicrobiana de la alfa-lactoalbúmina aunque recientemente se han encontrado tres fragmentos polipeptídicos resultantes de su digestión que tienen actividad frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* y *Candida albicans* (Pellegrini y col., 1999). En estudios con ratones se ha demostrado su protección frente a infección por *Klebsiella pneumoniae* (Berthou y col., 1987). En otro ensayo clínico realizado con una fórmula infantil enriquecida en alfa-lactoalbúmina, ésta mostró actividad frente a *E. coli* enteropatógeno O127 y reducción en la incidencia de diarrea de manera comparable a los niños lactados al pecho (Brück y col., 2003).

Rochat y col., (2007) realizaron un estudio de intervención con una fórmula cuya composición proteica fue modificada para asemejarla a la de la leche materna. Esta fórmula contenía 70% de suero y 30% de caseína, concentración reducida de proteínas (1.8 g/100 kcal) y baja concentración de fosfato (31 mg/100 kcal). Además contenía lactosa como única fuente de carbohidratos. Se realizó un estudio prospectivo, abierto en paralelo en dos grupos de recién nacidos sanos alimentados con leche materna y la fórmula del estudio respectivamente. Este estudio demostró que la nueva formulación imitaba algunos de los efectos de la leche humana estimulando selectivamente el crecimiento de Bifidobacterias de manera similar a la leche materna. No hubo diferencias entre los recuentos de Enterobacterias, Enterococos y Lactobacilos de los niños lactados a pecho y los alimentados con la fórmula en estudio.

- **Actividad sobre el sistema inmunológico.**

Se han descrito efectos beneficiosos de la alfa-lactoalbúmina relacionados con la modulación de la inmunidad tanto innata como adquirida. En ensayos con cultivos celulares se ha demostrado que estimula la producción de linfocitos (Kayser y Meisel, 1996). Además, se sostiene que el péptido Gly-Leu-Phe, (glicina, leucina y fenilalanina) liberado después de la digestión del suero lácteo puede jugar un importante papel fisiológico al estimular el desarrollo de los polimorfonucleares inmaduros en el intestino de niños y de adultos (Krissansen, 2007).

**3.1.2. Nucleótidos.**

Los nucleótidos son compuestos intracelulares de bajo peso molecular, derivados de los anillos de la purina o de la pirimidina, llamados nucleobases. Tienen una gran relevancia biológica porque son imprescindibles en multitud de procesos celulares claves como ser precursores de los ácidos nucleicos, ser intermediarios en la biosíntesis de macromoléculas biológicas como el glucógeno y los fosfolípidos, intervenir en producción de energía, sobre todo a partir de ATP, actuar en la respiración celular, formando parte de coenzimas, etc (Cosgrove, 1998)

Los nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos constituyen una parte importante del nitrógeno no proteico en la leche de todas las especies. Tanto la leche humana como la leche de vaca cruda contienen al menos 10 nucleósidos diferentes. En cambio, el contenido de nucleótidos es prácticamente nulo en algunas leches, como por ejemplo la de vaca (Gil y Uauy, 1995) determinando que la alimentación de los niños con fórmulas infantiles implique una menor ingesta de nucleótidos en relación a los alimentados a pecho.

Aunque la deficiencia de nucleótidos no se ha relacionado con ninguna enfermedad en particular, se ha documentado que su inclusión proporciona efectos beneficios en los niños. Los nucleótidos influyen en el metabolismo lipídico, en la inmunidad y en el crecimiento, desarrollo y reparación de los tejidos (Carver y Walker, 1995; Sánchez-Pozo y col., 1999; Gil, 2001).

Estudios en animales mostraron que la adición de nucleótidos a dietas experimentales mejoraba la función intestinal y reducía el riesgo de infecciones por *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* a través de la modulación de la respuesta inmune (Ortega y col., 1995; Uauy y col., 1990). Estos primeros estudios sirvieron para justificar la adición de nucleótidos a las fórmulas infantiles. El cálculo de las cantidades que se añadieron se basó en la concentración de nucleótidos presentes en la leche materna (entre 12 y 33 mg/l). Estudios realizados con fórmulas infantiles suplementadas con dichas cantidades mostraron efectos significativos en ganancia de peso, reducción del riesgo de diarrea y mejora en ciertos parámetros inmunológicos (Martínez Agustín y col., 1997; Navarro y col., 1996).

### **3.1.2.1. Función biológica de los nucleótidos.**

Los efectos biológicos de los nucleótidos pueden afectar a cuatro áreas principales: el sistema inmunológico, el metabolismo lipídico, la morfología y función intestinal y la microbiota intestinal.

En cuanto a su influencia sobre la microbiota intestinal un ensayo clínico reciente (Singhal y col., 2008) demostró que la suplementación con nucleótidos en fórmulas infantiles mejoraba el desarrollo de la microbiota intestinal de los niños aumentando la proporción de Bifidobacterias en relación al grupo de Bacteroides de forma similar a lo que ocurre en el intestino de los niños alimentados a pecho.

### **3.1.3. Oligosacáridos.**

#### **3.1.3.1. Oligosacáridos en la leche materna.**

La leche materna contiene un 7% de hidratos de carbono de los cuales el 90% lo constituyen la lactosa y diferentes oligosacáridos. Los oligosacáridos de la leche materna consisten principalmente en una molécula central de lactosa sustituida con N-acetil glucosamina, D-galactosa, D- glucosa, L-fucosa y ácido siálico resultando una mezcla compleja de casi 200 oligosacáridos diferentes debido a las combinaciones posibles de los distintos azúcares (Brand-Miller y McVeagh 1999; Bode, 2009). En contraste, las fórmulas infantiles contienen solamente cantidades traza de oligosacáridos que son, además, estructuralmente menos complejos (Bode, 2009). Como los oligosacáridos son indigeribles en el tracto gastrointestinal, el intestino del lactante se expone a concentraciones muy elevadas de estas sustancias que, finalmente en el colon, estimulan el desarrollo de una microbiota con predominio de Bifidobacterias (Engfer y col., 2000).

Además, estos hidratos de carbono pueden tener un efecto más específico en la colonización del intestino ya que actúan como homólogos o análogos de los receptores celulares para microorganismos patógenos, produciéndose interacciones específicas entre ambos y actuando de esta forma como protectores de las células de la mucosa intestinal frente al ataque de patógenos (Sharon y Otek, 2002). Un ejemplo de esta actividad se produce con *Campylobacter jejuni*, uno de los agentes bacterianos que causa mayores índices de diarrea en el mundo (Newburg y col., 2005). Esta bacteria se adhiere a la 2'-fucosillactosamina intestinal presente en los oligosacáridos de la leche materna.

La incidencia de diarrea por *Campylobacter* está inversamente relacionada con la cantidad de 2'-fucosilactosa en la leche humana (Morrow y col., 2004).

Como parte de los esfuerzos en investigación realizados por la industria alimentaria para el desarrollo de fórmulas infantiles que estimulen la colonización intestinal de manera similar a como ocurre en los niños lactados a pecho, una de las alternativas utilizadas es la suplementación de las fórmulas infantiles básicas mediante la incorporación de prebióticos como galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS), mezclas de ambos o inulina (Moro y col., 2002; Costalos y col., 2008).

### **3.1.3.2. Fórmulas infantiles suplementadas con oligosacáridos.**

Se considera prebiótico todo ingrediente alimentario de origen vegetal no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador mediante estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un número limitado de microorganismos residentes en el colon, mejorando así la salud del hospedador. El concepto de prebióticos fue introducido en 1995 por Gibson y Roberfroid, definiéndolos como oligosacáridos parcialmente digeridos en el intestino delgado, y que cuando alcanzan el colon estimulan selectivamente el desarrollo de la flora bifidogénica.

Para que un ingrediente alimenticio sea clasificado como prebiótico debe cumplir, según Gibson y Collins, (1999), los siguientes requisitos:

- 1- No ser hidrolizado ni absorbido en la parte anterior del tracto GI.
- 2- Ser un sustrato selectivo para una o un número limitado de bacterias comensales beneficiosas del colon, estimulando su crecimiento y/o metabolismo.
- 3- Modificar la composición de la flora del colon, facilitando el desarrollo de especies beneficiosas.

4- Inducir efectos en lumen o sistémicos que son beneficiosos para la salud del hospedador.

Los hidratos de carbono no digeribles (oligosacáridos (OS) y polisacáridos (PS)), algunos péptidos y proteínas, y ciertos lípidos (ésteres y éteres) son considerados como prebióticos. Debido a su estructura química, estos compuestos no son absorbidos en la parte anterior del tracto GI o no son hidrolizados por enzimas digestivas humanas. Estos compuestos se podrían llamar "alimentos del colon", puesto que entran en el colon y sirven como substratos para las bacterias endógenas del mismo. Así indirectamente proporcionan al hospedador energía, substratos metabólicos y micronutrientes esenciales (Gibson y Roberfroid, 1995). El objetivo de la administración de prebióticos es el fortalecimiento de la propia flora autóctona (Gibson y McCartney, 1998).

Dentro de los prebióticos, los oligosacáridos que han sido adicionados a las fórmulas infantiles son:

- **Galactooligosacáridos (GOS).** El establecimiento de una microflora de Bifidobacterias en el intestino de los niños alimentados a pecho se ha atribuido a la presencia de oligosacáridos no digeribles que contienen galactosa en la leche humana. Por tanto, la inclusión de GOS como ingredientes alimenticios prebióticos ha suscitado un interés comercial considerable. Son producidos comercialmente a partir de la lactosa usando la actividad galactosiltransferasa de la  $\beta$ -galactosidasa, que es la principal enzima en la hidrólisis de lactosa en elevadas concentraciones de ésta (Smart, 1993).
- **Fructooligosacáridos (FOS).** Es uno de los principales oligosacáridos no digeribles bifidogénicos en cuanto a volumen de producción. Se elaboran mediante dos procesos, que resultan en

productos finales ligeramente diferentes. Es un oligosacárido lineal formado por 10-20 monómeros de fructosa unidos por enlaces  $\beta$ - (1-2), y que contienen una molécula inicial de glucosa.

- **Sojaoligosacáridos (SOS).** Son oligosacáridos extraídos directamente del alimento crudo y no requieren procesos enzimáticos de elaboración. El suero de la soja, un producto de la producción de concentrados y aislados de proteínas de soja, contiene oligosacáridos rafinosa y estaquiosa. Ambos son indigeribles y por tanto alcanzan el colon intactos, donde actúan como prebióticos, estimulando el crecimiento de las Bifidobacterias en el hombre (Benno y col., 1987).

Los más empleados son oligosacáridos de cadena corta como los frustooligosacáridos (FOS), y galactooligosacáridos (GOS). Además se ha visto que los GOS tienen una gran similitud con la estructura molecular de los oligosacáridos de la leche humana (Boehm y Stahl, 2003).

### **3.1.3.3. Influencia de los prebióticos sobre la flora intestinal.**

Numerosos estudios realizados sobre la composición de la microflora intestinal en el niño han demostrado que existen diferencias entre los patrones de colonización de niños alimentados con leche materna y los alimentados con fórmulas suplementadas con prebióticos con respecto a los alimentados con fórmulas infantiles sin la adición de prebióticos.

En este sentido varios autores (Rinne y col., 2005; Balmer y Wharton, 1989) demostraron que la concentración total de Bifidobacterias fue significativamente más baja en los niños que recibían fórmula control con respecto a los que recibían leche materna o fórmula suplementada con prebióticos. Adicionalmente, mediante técnicas de PCR se comprobó que las

especies dentro del género *Bifidobacterium* encontradas en la flora de los niños alimentados con leche materna también estaban presentes en la flora de los niños alimentados con fórmulas suplementadas con prebióticos, observándose además que en niños alimentados con fórmula suplementada con GOS/FOS, el pH de las heces, así como el patrón de ácidos grasos de cadena corta era similar a los encontrados en niños alimentados con leche materna, lo cual indicaba que la flora entérica y no sólo las Bifidobacterias habían sido positivamente influenciadas por los prebióticos. Paralelamente observaron una menor presencia de microorganismos con capacidad patógena tales como las Enterobacterias (Boehm y col., 2003). Sin embargo, recientemente, Nakamura y col., 2009, comprobaron que los niveles de Enterobacterias fueron comparables en todos los grupos de alimentación estudiados, sugiriendo que ni carbohidratos prebióticos ni oligosacáridos procedentes de leche materna influían en el crecimiento de esas bacterias.

#### **3.1.4. Ácido siálico.**

El ácido siálico es un término genérico que se utiliza para definir una familia de monosacáridos carboxilados derivados del ácido neuramínico (molécula de 9 átomos de carbono) (Wang y Brand-Miller, 2003). Está distribuido ampliamente en los tejidos, constituyendo el sistema nervioso central (SNC) la fuente más abundante.

En la leche materna se encuentra principalmente formando parte de sialiloligosacáridos y, en menor proporción unido a las glicoproteínas y a la caseína, existiendo sólo un 1% como ácido siálico libre (Martín y col., 2004) y aproximadamente 1% en los gangliósidos (Wang, 2009). Sin embargo, en la leche de vaca, el ácido siálico se encuentra mayoritariamente unido a las glicoproteínas, en menor proporción a la caseína y en una proporción muy baja a los oligosacáridos (Martín y col., 2001).

Mediante estudios realizados en animales se ha demostrado que el ácido siálico de la dieta se incorpora como sialilglicoconjugados, fundamentalmente como glicoproteínas y gangliósidos, en diferentes regiones del tejido cerebral tanto si se administran como sialil lactosa o unidos a proteínas (Nohle y col., 1984; Wang y col., 2007). La leche humana es la fuente más importante de ácido siálico lo que contribuye a que niños lactados a pecho presenten mayores niveles en el tejido cerebral en comparación con los alimentados con fórmulas infantiles (Wang, 2009).

Todos estos hallazgos sugieren que el aporte de sialilglicoconjugados a través de la dieta juega un papel crucial en la consolidación del aprendizaje y el desarrollo cognitivo en las primeras etapas de la vida.

### **3.1.5. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA).**

Los LCPUFA constituyen menos del 3% del total de ácidos grasos de la leche materna, sin embargo su importancia funcional para el recién nacido es enorme. La leche materna suministra ácido linoléico (LA), ácido alfa-linolénico (ALA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido araquidónico (ARA) y otros LCPUFA.

Las concentraciones de ARA y DHA en la leche materna varían durante el periodo de lactancia. El ARA se encuentra en concentraciones del 1% en el calostro y del 0.5% en la leche madura y el DHA aparece en concentraciones del 0.55% y 0.25% en el calostro y en la leche madura respectivamente (Marangoni y col., 2000).

En 2008, Koletzko y col., realizaron una revisión de los conocimientos actuales sobre el papel de los LCPUFA (DHA y ARA) en la nutrición materna y en la de los niños nacidos a término en relación con el desarrollo de los lactantes. Esta revisión, considerada como una guía, fue realizada por un grupo internacional de expertos coordinados por la "European Society for Pediatric

Gastroenterology Hepatology and Nutrition” (ESPGHAN) quienes propusieron una serie de recomendaciones sobre la composición de las fórmulas infantiles e hicieron las propuestas al *Codex Alimentarius* para un estándar único en fórmulas infantiles. Como resultado, se generó la Directiva de la Comisión Europea para fórmulas de inicio y fórmulas de continuación.

Los autores de dicha revisión concluyeron que:

1. Hay suficientes evidencias disponibles para justificar la adición de ARA y DHA a las fórmulas infantiles.
2. La cantidad de DHA debe ser al menos del 0.2% del total de los ácidos grasos y no debe sobrepasar el 0.55 %.
3. La cantidad adicionada de ARA debe ser al menos igual a la de DHA.
4. La cantidad de ácido eicosapentaenoico (EPA) añadido no debe exceder la cantidad de DHA añadido.
5. Aunque parece recomendable continuar con la adición de LCPUFA a partir de los 6 meses, la cantidad recomendada aún no ha sido especificada.

#### **3.1.5.1. Efectos funcionales de los LCPUFA.**

Los LCPUFA predominantes en el cerebro son el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA) lo cual hace que se considere su papel fundamental en el desarrollo cognitivo durante la lactancia. El DHA se presenta en gran concentración en algunas células de la retina. Se han realizado numerosos estudios para evaluar su efecto en el desarrollo del sistema visual comprobándose que la concentración de DHA en la leche materna tiene una influencia positiva con el desarrollo visual del lactante (Innis y col., 2001; Jorgensen y col., 2001). En varios estudios en los que se evaluaban madres lactantes, cuyas leches habían sido suplementadas y no suplementadas con LCPUFA, se identificó una correlación significativamente positiva entre agudeza

visual de los niños y el contenido de DHA en leche materna así como en los niños (Gibson y col., 1997; Lauritzen y col., 2004). Otros estudios centrados en los beneficios potenciales a largo plazo de las fórmulas suplementadas con LCPUFA, no encontraron mejora en el desarrollo de la agudeza visual a los 4-6 años (Singhal y col., 2007).

En un estudio que comparaba el desarrollo de la agudeza visual y del coeficiente intelectual (CI) de niños alimentados con una fórmula estándar no suplementada, una fórmula suplementada con ácido araquidónico y docosahexaenoico, una fórmula suplementada sólo con ácido docosahexaenoico y la leche materna, se observó que la agudeza visual fue similar en los cuatro grupos. Sin embargo, el grupo que se alimentaba con ARA y DHA presentó un desarrollo verbal similar al de la leche materna a los 4 años de edad y los grupos de niños alimentados con fórmula estándar y fórmula adicionada sólo con DHA mostraron un desarrollo verbal inferior. En general, según dicho estudio los niños que recibieron fórmula suplementada desarrollaron mayor CI comparados con los que tomaron fórmula estándar (Birch y col., 2010).

No obstante, es importante señalar que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en enero de 2009 emitió dictamen favorable a la solicitud de la alegación “EL DHA contribuye al desarrollo visual de los niños desde su nacimiento hasta los 12 meses de edad”. Además la EFSA indica que esta alegación es válida cuando el contenido de DHA en las fórmulas infantiles sea al menos el 0.3% del total de los ácidos grasos.

#### **4. COLONIZACIÓN INTESTINAL POR ENTEROBACTERIAS EN EL NEONATO.**

En el periodo neonatal, las Enterobacterias figuran entre los primeros microorganismos que colonizan el intestino, pudiendo llegar a concentraciones de hasta  $10^9$  ufc/g de heces (Rotimi y Duerden, 1981; Sakata y col., 1985).

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un conjunto de bacilos gramnegativos, móviles por flagelos peritricos o inmóviles, heterogéneos en cuanto a su hábitat y capacidad patogénica, pero incluidos en ella por la semejanza en sus caracteres estructurales y fisiológicos y su homología genética. El contenido en G+C de su ADN es de 38 a 60 moles por cien. Las cepas de una misma especie presentan una homología de su ADN superior al 80% y la homología entre géneros es del 20 al 50%. El género tipo es *Escherichia* y la especie tipo *E. coli*.

La mayoría de las especies son capaces de ocupar indistintamente hábitats muy variados en el medio ambiente, las plantas y el tubo digestivo de los animales. Algunas se hallan adaptadas estrictamente al hombre, siendo algunas especies primariamente patógenas y otras comensales, estables o transitorias del tubo digestivo, que en determinadas circunstancias pueden producir infecciones oportunistas.

La colonización intestinal por Enterobacterias en el recién nacido es diferente entre neonatos sanos, que tras el parto reciben el alta y aquellos que por diversas circunstancias son hospitalizados tras el nacimiento, y permanecen ingresados en unidades neonatales. En estos dos grupos el perfil de Enterobacterias puede variar en tipo y en proporción. En la flora fecal de neonatos sanos, *Escherichia coli* suele ser la especie predominante, aunque se pueden aislar otras especies como *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.* etc, (Adlerberth y col., 1991).

El origen de la colonización por Enterobacterias y principalmente por *E. coli* es generalmente la flora materna. Los microorganismos del canal vaginal y del área perineal entran en contacto con el niño durante el parto, pero a su vez el ambiente hospitalario también juega un importante papel en la colonización (Tullus y col., 1988), especialmente durante periodos de largas estancias estancias hospitalarias (Fryklund y col., 1992). Bettelheim y Lennox-King, (1976)

demonstraron que dos de cada tres neonatos al nacer tienen al menos una cepa de *E. coli* de origen materno. Otros estudios, sin embargo indican una baja tasa de transmisión, de manera que sólo un tercio de los niños son colonizados con cepas maternas (Gothefors y col., 1976).

### **4.1. Implicaciones de la colonización intestinal por Enterobacterias en el neonato.**

Las infecciones por bacterias gramnegativas, principalmente Enterobacterias, suponen una causa importante de morbilidad y mortalidad en neonatos hospitalizados, por ello la colonización por estas especies potencialmente patógenas puede ser el origen de graves problemas clínicos (Eriksson y col., 1982; Zetterström y col., 1994). Algunos estudios demuestran que la colonización por microorganismos potencialmente patógenos y, en ocasiones multirresistentes, como es el caso de los microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y de otras Enterobacterias, es un prerrequisito para la infección (Smith y col., 2004) y, en determinadas circunstancias, los microorganismos que se han aislado como causantes de diferentes infecciones en neonatos son los mismos que colonizan el tracto gastrointestinal de dichos niños (Almuneef y col., 2001). De ahí, la importancia que puede tener la detección de estos microorganismos colonizantes mediante una conducta de vigilancia activa. Sin embargo, otros autores opinan que esa vigilancia periódica únicamente debe ser realizada en la aparición de brotes nosocomiales de infecciones por Enterobacterias (White y col., 1981).

De las Enterobacterias, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* suelen ser los microorganismos más frecuentemente aislados en unidades neonatales (Miró y col., 2005). Las tasas de infección nosocomial por estos microorganismos, sobre todo en unidades de cuidados intensivos neonatales, han sido estimadas en un 10%-20%, constituyendo por tanto un gran problema tanto epidemiológico como clínico (Stoll y col., 1996; Siegel, 1998). Por ello, y

según algunos autores (Goldman, 1988; Almuneef y col., 2001), para la posible prevención de las infecciones invasivas neonatales por bacterias gramnegativas, sería importante conocer los patrones de colonización por Enterobacterias en diferentes salas de hospitales, de maternidad, de unidades neonatales, etc.

En niños hospitalizados se ha comprobado que la colonización intestinal por especies del género *Klebsiella* suele ser más frecuente que por *E. coli*, a diferencia de la colonización en niños no hospitalizados, donde los aislamientos de *E. coli* suelen dominar la flora fecal (Tullus, 1987; Tullus y col., 1988).

Otro problema adicional a la infección por estas Enterobacterias, radica en sus patrones de resistencia. La resistencia a los antibióticos betalactámicos, uno de los grupos de antimicrobianos más utilizados en el periodo neonatal, por producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) o la presencia de cepas multirresistentes, especies resistentes a tres o más antibióticos pueden dificultar la elección terapéutica (Johnson y col., 2004),

En los últimos años se han realizado múltiples estudios de los factores de riesgo asociados a la colonización y/o infección por Enterobacterias productoras de BLEEs, especialmente en unidades de cuidados intensivos neonatales en las que suponen un auténtico problema tanto clínico (incremento en la morbilidad y mortalidad) como epidemiológico (diseminación clonal de estos microorganismos dentro de estas unidades que producen auténticos brotes epidémicos). Duman y col. (2005) estudiaron la colonización fecal por Enterobacterias productoras de BLEEs no sólo en niños de UCI<sub>5</sub> neonatales sino también en niños hospitalizados en plantas de neonatos y en recién nacidos sanos. La media del porcentaje de colonización por Enterobacterias productoras de BLEEs fue del 34.4% y, de forma sorprendente, se encontró que no existían diferencias significativas en los porcentajes de colonización entre los tres grupos estudiados.

Entre los factores de riesgo relacionados con el ámbito hospitalario favorecedores para la colonización por microorganismos productores de BLEEs destacan, niños nacidos con bajo peso, uso de antibióticos, parto vaginal y rotura prematura de membranas (Duman y col., 2005).

El factor de riesgo más importante para la colonización por estos microorganismos una vez que los niños son dados de alta y desaparecen los factores propios de la hospitalización, fue el tipo de alimentación, siendo la lactancia materna un factor protector frente a la colonización por estos microorganismos multirresistentes. En general, la influencia de la alimentación en la colonización por Enterobacterias se traduce en una colonización más homogénea (es decir menos diversidad de especies de Enterobacterias), y en unos recuentos más bajos en el caso de la lactancia materna frente a la fórmula infantil. La fuerte relación entre la leche materna (que contiene N-acetilglucosamina como “factor bifidus”) y la colonización intestinal por Bifidobacterias parece ser el hecho que hace que se incremente la resistencia natural frente a la colonización por otros microorganismos patógenos (Duman y col., 2005).

### **5. *ESCHERICHIA COLI*: ENTEROBACTERIA PREDOMINANTE EN LA MICROBIOTA INTESTINAL.**

*E. coli* es la especie tipo del género *Escherichia* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. El nombre del género hace honor a Theodore Escherich, quien en estudios pioneros sobre la flora fecal de los recién nacidos describió el microorganismo en 1855. *E. coli* es tanto la principal especie anaerobia facultativa integrante en el tracto gastrointestinal humano y de otros animales (Bettelheim, 1997), como el patógeno de la familia de Enterobacterias implicado con más frecuencia en infecciones.

En general *E. coli* se distingue de otros miembros de la familia por la capacidad de la mayoría de las cepas de fermentar la lactosa y otros azúcares y por producir indol a partir del triptófano, además casi todas las cepas son móviles. Es probablemente la especie bacteriana mejor conocida, y uno de los aislamientos más comunes en laboratorios de microbiología clínica (Russo y Johnson, 2000).

### **5.1. Clasificación de las cepas de *E. coli*.**

Las cepas de *E. coli* con significado biológico en humanos pueden ser clasificadas, según criterios genéticos y clínicos, en tres grupos:

- Cepas comensales
- Cepas patógenas extraintestinales (ExPEC)
- Cepas patógenas intestinales

Las cepas patógenas, extraintestinales e intestinales, se diferencian de los microorganismos comensales en que producen factores de virulencia específicos que pueden estar codificados por bacteriófagos, en plásmidos o en fragmentos de cromosoma conocidos como islas de patogenicidad (PAIs) (Johnson y col., 2001). Las PAIs son largos bloques de ADN cromosómico que están ausentes en cepas de *E. coli* comensales tales como *E. coli* K-12 (Johnson y Russo., 2002).

Las comparaciones entre los genomas completamente secuenciados de la cepa no patógena K-12 y diversas cepas patógenas han mostrado que hasta un 25% de los genomas de las cepas patogénicas se componen de genes que están ausentes en las cepas no patógenas, mientras que son muy pocos los genes presentes en la cepa K-12 que faltan en las cepas patógenas (Mandell y col., 2006). Aunque en realidad la barrera entre comensalismo y virulencia es el resultado de un complejo balance entre el estado del huésped y la presencia y expresión de factores de virulencia en la bacteria (Soto, 2006).

### 5.1.1. *E. coli* comensales.

Las cepas comensales de *E. coli*, constituyen parte predominante de la microbiota intestinal en la mayoría de los humanos y de otros animales. Estas cepas forman parte del hábitat natural de la flora intestinal del hospedador y no parecen causar enfermedad dentro del tracto intestinal.

La capacidad de persistir en la microbiota normal varía entre unas cepas y otras. Existen cepas, denominadas residentes, que colonizan el intestino de un individuo durante meses o años, aunque ya son consideradas como tal si persisten durante al menos tres semanas. Otras cepas, denominadas transitorias, persisten en la microbiota sólo durante cortos periodos y no se consideran, en sentido estricto, como colonizantes intestinales (Sears y Brownlee, 1951; Nowrouzian y col., 2003).

En el caso de cepas residentes, parece ser que la expresión de determinados factores de virulencia, como por ejemplo las fimbrias P o adhesinas, factores implicados en la adherencia de las bacterias a las células epiteliales del colon, juegan un papel importante en su capacidad de persistencia en la microflora intestinal. Se ha comprobado que cepas residentes de *E. coli* expresan genes que codifican para fimbria P y para fimbrias tipo 1 con más frecuencia que las cepas transitorias (Wold y col., 1992; Herías y col., 1995, Adlerberth y col., 1995; Mahmood y col., 2000; Nowrouzian y col., 2001)

Además estas fimbrias también contribuyen de un modo importante a la patogenicidad extraintestinal de cepas de *E. coli* (Johnson y col., 2001). Ya que fimbrias P localizadas en PAIs de algunas de estas cepas son altamente análogas a las que están presentes en PAIs de conocidos patógenos primarios tales como

*Salmonella spp.* y *E. coli* enteropatógeno (Groisman y Ochman, 1996; Guyer y col., 1998; Dobrindt y col., 2001).

#### **5.1.2. *E. coli* patógenas extraintestinales.**

Las cepas de *E. coli* con una especial capacidad de causar infecciones extraintestinales son denominadas ExPEC (“*extraintestinal pathogenic Escherichia coli*”). No causan gastroenteritis en humanos y se encuentran con mucha frecuencia en la flora normal intestinal, en ocasiones en mayor recuento que las cepas comensales propiamente dichas (Johnson, 1991; Siitonen, 1992).

Aunque inicialmente son diferentes a las consideradas como cepas comensales, varios estudios han demostrado que derivan de éstas tras la adquisición de operones de virulencia (Finlay y Falkow, 1997; Ochman y col., 2000). Actualmente se consideran como una subpoblación de cepas de *E. coli* funcionalmente relevantes y con un potencial de virulencia aumentado (Russo y Johnson, 2000), que originan enfermedad cuando salen del intestino o entran en algún lugar anatómico normalmente estéril.

*E. coli* produce diversas infecciones extraintestinales. Las más comunes son infecciones del tracto urinario, bacteriemia, meningitis y sepsis neonatal que frecuentemente deja graves secuelas y puede llevar incluso a la muerte. También se ha aislado de infecciones intraabdominales, neumonía nosocomial, así como de otras infecciones extraintestinales como osteomielitis, celulitis e infecciones de heridas (Johnson y Russo, 2002). En definitiva es el agente etiológico de un grupo heterogéneo de síndromes que colectivamente causan una morbilidad considerable.

Su capacidad de producir infecciones extraintestinales se debe a la adquisición de genes que codifican diferentes factores de virulencia, los cuales hacen que causen infecciones en focos distintos al intestinal, tanto en pacientes

normales como en inmunodeprimidos. La mayor parte de estos genes de virulencia son diferentes a los que están implicados en las infecciones intestinales, aunque hay algunos que son comunes de cepas patógenas de *E. coli*, como adhesinas, fimbrias, sistemas de secreción para exportar proteínas implicadas en la patogenia y toxinas.

Entre los factores de virulencia presentes en la mayoría de las cepas ExPEC, (**Tabla 1**), se encuentran factores implicados en la adherencia de bacterias a las células o adhesinas (p.ej., fimbrias tipo 1 y fimbrias tipo P) que permiten colonizar las superficies mucosas del hospedador, factores que permiten evitar o sobrevivir a los mecanismos de defensa locales y sistémicos (como cápsulas y lipopolisacáridos), factores implicados en la adquisición de nutrientes (sideróforos), y factores implicados en la invasión celular (proteasas, invasinas y toxinas) (Russo y Johnson, 2003).

**Tabla 1:** Clasificación de los genes de virulencia y de los factores que codifican según su función de adherencia, invasión, evasión de la defensa y adquisición de nutrientes.

Función	Genes	Factores de virulencia
<b>Adherencia</b>		
	<i>afa/dra</i>	Adhesinas de unión Dr. (Le Bouguenec y col., 1992)
	<i>Bma</i>	Fimbria tipo M.
	<i>fimA/H</i>	Fimbria tipo 1.
	<i>gafD</i>	Fimbria tipo G.
	<i>Papa</i>	Subunidad estructural de fimbria tipo P.
	<i>papC</i>	Fimbria tipo P.
	<i>papG</i>	Fimbria tipo P. (Johnson y Brown, 1996)
	<i>sfa/foc</i>	Fimbrias tipo S y tipo F1C respectivamente.
	<i>Nfa</i>	Adhesinas no fimbrias
<b>Invasión</b>		
	<i>cdtB</i>	Toxina citoletal distendida.
	<i>cnf1</i>	Factor citotóxico necrotizante.
	<i>cvaC</i>	Colicina V <sup>a</sup> (Gilson y col., 1987).
	<i>draA</i>	Hemaglutinina.
	<i>Clic</i>	Flagelina.
	<i>hlyA</i>	Hemolisina.
	<i>ibeA</i>	Factor que favorece la invasión del endotelio cerebral (Bingen y col.,1998; Huang y col.,1995).
	<i>Iss</i>	Factor implicado supervivencia en suero.
	<i>ompT</i>	Proteasa de membrana externa.
	<i>traT</i>	Factor implicado supervivencia en suero asociada a proteína de membrana externa.
<b>Evasión Defensa</b>		
	<i>kpsMT</i>	Cápsula.
	<i>kpsMT II</i>	Cápsula K1, K5.
	<i>kpsMT III</i>	Cápsula K54. (Russo y col., 1998; Pavelka et al., 1991 ; Smith y col., 1990)
	<i>kpsMT K1</i>	Cápsula K1.
	<i>kpsMT K5</i>	Cápsula K5.
	<i>Rfc</i>	Lipopolisacárido (LPS) O4. (Lukomski y col., 1996)
<b>Adquisición nutrientes</b>		
	<i>fyuA</i>	Yersiniabactina (Schubert y col., 1998).
	<i>Iha</i>	Adhesina-sideróforo putativo.
	<i>iutA</i>	Aerobactina.
	<i>ireA</i>	Receptor de sideróforo putativo.

**Nota <sup>a</sup>:** Gen diana como marcador de plásmidos ColV, se ha visto que estos plásmidos aumentan la virulencia al portar otros factores de virulencia específicos, incluyendo el

sistema de aerobactina y genes de supervivencia en suero, tales como *traT* e *iss* (Kanukollu y col., 1985; Chuba y col., 1989; Fernández-Beros y col., 1990; Johnson, 1991).

La simple detección de los genes de virulencia en las cepas ExPEC no siempre es suficiente para comprender completamente su virulencia, ya que además influye el mecanismo por el que se regula la expresión de estos genes, como por ejemplo ocurre con el operon *fim*, presente en casi todas las cepas de *E. coli* (así como en otras Enterobacterias), patógenas o comensales, que codifica para fimbrias tipo 1 o comúnmente llamadas pili (Johnson, 1991).

Así mismo, aislamientos clínicos de cepas de *E. coli* productoras de infecciones del tracto urinario con más frecuencia expresan un variante de *fimH* que puede ligarse tanto a receptores monomanosa como trimanosa, los cuales están adaptados para la colonización de la vejiga, mientras que cepas comensales expresan una variante de *fimH* que sólo reconoce a receptores trimanosa, los cuales están más adaptados para la colonización intestinal (Sokurenko y col., 1998).

### **5.1.3. *E. coli* patógenas intestinales.**

Estas cepas se encuentran excepcionalmente en la flora fecal del intestino humano. Pueden ser esencialmente consideradas como patógenos obligados, causando gastroenteritis o colitis cuando se ingieren en concentración suficiente por el humano. Entre las cepas de *E. coli* patógenas intestinales se distinguen cinco categorías (Mandell y col., 2006):

#### **a) *E. coli* enterotoxigénica (ECET).**

Son una causa común e importante de diarreas en niños de países en vías de desarrollo, y también pueden afectar a viajeros que visiten dichos países y que ingieran la bacteria en productos contaminados. En la diarrea por ECET las

cepas de *E. coli* producen toxinas conocidas como enterotoxina LT, enterotoxina ET en la luz del intestino delgado. La adherencia a las microvellosidades de la superficie por pili de la clase del factor de colonización (AFC) es esencial para la descarga eficiente de la toxina en los enterocitos atacados.

**b) *E. coli* enteropatógena (ECEP).**

Las cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP) se definen por el efecto de fijación y de borramiento característico que producen tras la interacción con células epiteliales. Las cepas de ECEP se adhieren inicialmente a los enterocitos valiéndose de pili del tipo AFC para formar cúmulos de microcolonias sobre la superficie de estas células. Las numerosas etapas que participan en la formación del efecto de fijación y borramiento se encuentran controladas de manera genética en un islote de patogenicidad, que contiene genes para la proteína de fijación mayor llamada intimina y un sistema de secreción por contacto.

**c) *E. coli* enterohemorrágica y otras cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (ECEH/ECTS).**

El aspecto distintivo de ECEH es la producción tanto de toxinas Shiga como del efecto de fijación y de borramiento de las cepas ECEP. Otra diferencia entre ambas es que las ECEH atacan primordialmente en el colon, en tanto que las ECEP infectan el intestino delgado. Los aspectos extraintestinales múltiples, como síndrome hemolítico y urémico, parecen ser resultado de la toxina de Shiga circulante. La interacción de ECEH con los enterocitos es muy parecida a la de las cepas ECEP, salvo que las primeras no forman microcolonias sobre la mucosa. Los genes para estas propiedades también se encuentran en los islotes de patogenicidad.

**d) *E. coli* enteroagregativo (ECEA).**

Aunque las cepas ECEA se adhieren con firmeza a la mucosa intestinal, no se encuentra el efecto de fijación y de borramiento producidas por las cepas ECEP y ECEH. En este grupo de cepas no se ha podido aclarar por completo la patogénesis de la diarrea, pero podría consistir en capacidad para formar una biopelícula de moco y bacterias sobre la superficie del intestino.

### **e) *E. coli* enteroinvasivo (ECEI).**

Estas cepas ECEI son muy similares a las cepas de *Shigella* en cuanto a las características clínicas y la patogenia. Al igual que *Shigella*, las cepas de ECEI tienen un gran plásmido de invasión que permite a las bacterias invadir las células epiteliales, escapar del fagosoma, multiplicarse en el citoplasma, usurpar la máquina de ensamblaje de los filamentos de actina del huésped y diseminarse directamente de célula a célula.

## **5.2. Clasificación filogenética de cepas de *E. coli*.**

*E. coli* es el principal componente aerobio integrante de la flora comensal del intestino humano. Las poblaciones de *E. coli* tienen una estructura clonal (Selander y Levin, 1980). Este hecho se demostró a partir de algunas observaciones científicas en las que se comprobó que cepas de *E. coli* patógenas podrían derivar de cepas comensales por la adquisición de operones de virulencia cromosómicos o extracromosómicos (Finlay y Falkow, 1997; Ochman y col., 2000), o por deleciones genómicas que favorecían la patogenicidad (Maurelli y col., 1998), o por mutaciones funcionales puntuales al azar que contribuían a un entorno más patógeno (Sokurenko y col., 1998).

Así Herzer y col., (1990) describieron cuatro grupos filogenéticos de *E. coli*, A, B1, B2 y D en función de las relaciones de similitud evaluadas mediante técnicas de electroforesis de diferentes enzimas y de secuenciación de genes. Estos cuatro grupos fueron identificados originariamente en función de la

variación alélica de genes codificantes de enzimas detectadas por “multilocus enzyme electrophoresis” (MLEE) o por ribotipado. Hoy en día, ya que las dos técnicas anteriormente citadas son complejas y lentas, la caracterización del grupo filogenético de una cepa se hace por una rápida y sencilla técnica de reacción en cadena de la polimerasa múltiple (Clermont y col., 2000).

Este método utiliza tres marcadores, dos genes, *chuA* y *yjaA* obtenidos de dos cepas de *E. coli* diferentes y un fragmento anónimo de ADN designado como TSPE4.C2. El gen *chuA*, es un gen requerido para hemotransporte en la cepa de *E. coli* O157:H7, y el *yjaA*, es un gen inicialmente identificado en la secuencia completa del genoma de la cepa no patogénica de *E. coli* K-12, cuya función es desconocida (Mills y Payne, 1995; Torres y Payne, 1997; Bonacorsi y col., 2000).

El hecho de que las cepas de *E. coli* residentes en la flora intestinal pertenezcan a uno u otro filogrupo parece estar relacionado con la influencia de determinados factores, como por ejemplo geográficos, dietéticos, genéticos del hospedador (Duriez y col., 2001), e incluso con el factor climático (Escobar-Páramo y col., 2004). Además, estudios basados en la comparación de la distribución de los grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* entre humanos de diferente sexo y edad han sugerido que los filogrupos de *E. coli* también están probablemente influenciados por diferencias fisiológicas (Gordon y col., 2005).

Numerosos estudios han demostrado que las cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales, como infecciones del tracto urinario, sepsis neonatales y meningitis, pertenecen en su mayoría al grupo B2, y con menor frecuencia al filogrupo D, mientras que las cepas comensales, pertenecen en su mayoría a los grupos filogenéticos A y B1. Las cepas de los grupos B2 y D a priori presentan más genes de virulencia asociados comparados con cepas de los grupos A y B1 (Picard y col., 1999). De este modo, se ha comprobado que la patogenicidad o poder patogénico, es diferente en los cuatro grupos filogenéticos.

A su vez, Boy y Hartl (1998) observaron que el grado de patogenicidad o virulencia entre las cepas de un mismo grupo filogenético también podía ser diferente, ya que al grupo filogenético B2 pertenecían tanto cepas de *E. coli* de referencia, a priori no patógenas, como las colecciones de cepas de *E. coli* patógenas intestinales. Este hecho se confirma posteriormente en el trabajo de Moreno y col., (2006), en el que ponen de manifiesto que las cepas pertenecientes a los grupos B2 y D presentan mayor número de factores de virulencia, pero además añaden que cepas de los grupos menos patogénicos, A y B1, pueden adquirir factores de virulencia frecuentemente asociados al grupo B2 y ser capaces de producir infecciones en pacientes no inmunodeprimidos. Se ha sugerido que mediante transferencia vertical y horizontal, las cepas pertenecientes a los grupos B2 y D pueden aportar islas de patogenicidad o plásmidos con factores de virulencia a cepas de los grupos filogenéticos A y B1, convirtiendo estos *E. coli* no virulentos en patógenos (Bingen y col., 1998; Johnson y col., 2001).

También se ha comprobado que, además del grado de virulencia, el perfil de resistencia antimicrobiana también varía según el grupo filogenético de las cepas de *E. coli* (Johnson y col., 2004; Piatti y col., 2008). Los grupos considerados más virulentos son más sensibles a las quinolonas que los considerados comensales. Parece existir una relación inversa entre capacidad de virulencia y resistencia a quinolonas (Vila y col., 2002). Horcajada y col., (2005), encontraron que dentro del grupo filogenético B2, las cepas más virulentas eran más sensibles.

Atendiendo a estos datos, coexisten dos teorías que intentan explicar esta relación inversa entre virulencia y resistencia. La primera asume que las cepas resistentes aparecen por un cambio en la flora, consistente en que los *E. coli* del grupo filogenético B2, virulentos y en general sensibles, serían sustituidos por *E. coli* de los grupos A o B1 que sometidos a presión antibiótica en otros hábitat, alcanzan al hombre tras haber adquirido la resistencia (Johnson y col.,

2004; Johnson y col., 2005; Moreno y col., 2006). Y la segunda asume que la adquisición de la resistencia lleva consigo una pérdida de islas de patogenicidad (PAIs) asociada a la no expresión de los correspondientes factores de virulencia (Vila y col., 2002; Drews y col., 2005) tal y como lo corrobora el hallazgo de que los aislados de *E. coli* del grupo filogenético B2 resistentes a quinolonas presentan menos factores de virulencia que sus respectivos B2 sensibles (Horcajada y col., 2005).

## **6. SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA EN ENTEROBACTERIAS. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.**

El gran número de especies dentro de la familia de las Enterobacterias conlleva una gran variabilidad de patrones de sensibilidad natural. Esta diversidad se ve además incrementada por la posibilidad de adquirir genes de resistencia, tanto de microorganismos de la misma especie como de otras, dando lugar a lo que se conoce como fenotipos de resistencia adquirida.

La resistencia adquirida modifica el patrón natural de resistencia de una especie determinada, siendo el patrón de resistencia resultante la suma de la resistencia natural más la adquirida.

La presencia de nuevas enzimas, no propias de la especie, puede deberse a la adquisición de genes por diferentes vías como son la conjugación, la transformación o la transducción. En todos los casos se trata de material extracromosómico que la bacteria adquiere y que puede asimilar y perpetuar a su progenie, bien en forma de plásmido, bien incorporándolo en su cromosoma. Sin embargo, algunos patrones de resistencia vienen dados no por enzimas adquiridas, sino por mutaciones en los genes cromosómicos naturales de especie, por lo general en la región del promotor o en los genes reguladores de su expresión (Fournier y col., 1995; Wiedemann y col., 1998; Nelson y Elisa, 1999).

Entre los antibióticos utilizados en la práctica clínica para infecciones por Enterobacterias existen fundamentalmente tres grupos, los betalactámicos, aminoglicósidos y quinolonas, aunque este último es de uso discutido en la infancia.

### **6.1. Betalactámicos.**

Los antibióticos betalactámicos son una amplia clase de antibióticos que incluyen penicilinas, derivados de las penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems e inhibidores de las betalactamasas. Todos ellos tienen en común la presencia de un anillo betalactámico en su estructura química. Son el grupo más ampliamente usado entre los antibióticos disponibles.

Aunque la resistencia a los betalactámicos está definida por distintos mecanismos (producción de enzimas, alteraciones de la permeabilidad, alteración de la diana y, presumiblemente, expresión de bombas de eliminación activa), el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en Enterobacterias es el enzimático, por producción de betalactamasas, aunque debe considerarse también que en algunos casos la resistencia obedece a la asociación de distintos mecanismos de resistencia (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2001).

Entre las betalactamasas más relevantes y con mayor implicación clínica nos encontramos al grupo de las betalactamasas de espectro extendido (BLEEs). Las BLEEs son un grupo heterogéneo de enzimas que se conocen con este nombre por su capacidad de hidrolizar un rango de betalactámicos mayor que las betalactamasas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV-1), de las cuales derivan la mayoría por modificaciones puntuales en áreas específicas de su secuencia (Paterson y Bonomo, 2005). Debido a estas mutaciones, las BLEES adquieren la capacidad para inactivar a las cefalosporinas de 3ª generación y monobactamas (aztreonam) pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni a carbapenems. Los inhibidores

de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam son capaces de bloquear este mecanismo de resistencia. Las cepas que producen betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), en su mayoría Enterobacterias, y en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, son resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con la excepción de los carbapenems, las cefamicinas y las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

Actualmente hay descritas más de 300 BLEEs diferentes. La mayoría pertenecen a las familias TEM (descritas alrededor de 180), SHV (descritas cerca de 90) y CTX-M (alrededor de 90). Estas enzimas están codificadas en genes localizados en elementos genéticos móviles tales como transposones, integrones o estructuras similares que facilitan su diseminación. Además, estos elementos incluyen genes de resistencia frente a otros antibióticos como cotrimoxazol, aminoglucósidos y quinolonas (Jacoby y Munoz-Price, 2005), dando lugar a la aparición de bacterias multirresistentes lo que limita mucho las opciones terapéuticas disponibles para tratar las infecciones ocasionadas por estos microorganismos.

Las primeras BLEEs descritas fueron las tipos TEM y SHV extendiéndose rápidamente a nivel mundial (Brun-Bruissson y col., 1987; Wincour y col., 2001). La mayoría de cepas productoras de estas BLEEs fueron de la especie *K.pneumoniae*. Desde el punto de vista epidemiológico eran cepas de adquisición nosocomial asociadas a brotes epidémicos y que pertenecían a muy pocos clones que se diseminaron ampliamente y afectaron a múltiples hospitales. Se aislaban principalmente en pacientes ingresados en unidades de alto riesgo (UCI, Neonatología, etc.), sometidos a diferentes procedimientos invasivos, con estancias prolongadas en el hospital, y se relacionaron con la utilización previa de cefalosporinas de amplio espectro y aminoglucósidos. Sin embargo, en los años 90, se produce un gran cambio en la epidemiología de las BLEEs, con la descripción de un nuevo tipo de betalactamasa de rápida diseminación, las denominadas CTX-M (Livermore y col., 2007). Estas enzimas ya no derivan de

mutaciones en betalactamasas previas, sino de captura de nuevos genes cromosómicos por transferencia horizontal de enzimas presentes, de forma natural, en bacterias ambientales como *Kluyvera* (Canton y col, 2007).

### **6.2. Aminoglucósidos.**

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan a nivel de ribosomas en el subunidad 30S bacteriana, y por ende, a nivel de síntesis de proteínas, creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana. El comportamiento de unaminoglicósido frente a una Enterobacteria depende, como mínimo, de cuatro factores:

- a) La difusión pasiva a través de la membrana externa.
- b) El transporte activo a través de la membrana interna.
- c) La afinidad del aminoglucósido por su diana (una proteína ribosomal).
- d) La presencia de enzimas inactivantes.

La mayoría de los géneros de Enterobacterias son naturalmente sensibles a los aminoglucósidos aunque con algunas excepciones. La resistencia enzimática a los aminoglucósidos puede deberse a la producción de una o varias enzimas. El fenotipo de resistencia por varias enzimas es más difícil de determinar, aunque en algunos casos es predecible por el efecto aditivo de dos patrones distintos. Asimismo, cabe señalar que la resistencia de alto nivel a todos los aminoglucósidos no se debe sólo a la producción de enzimas, sino que intervienen también alteraciones en la permeabilidad (Shaw y col., 1993).

### **6.3. Fluoroquinolonas.**

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos, de las cuales cabe destacar el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas, como norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, cuyo espectro de actividad se centra

en las bacterias gramnegativas, pero que ha ido ampliándose sobre grampositivos, anaerobios e incluso micobacterias con las nuevas fluorquinolonas (Blondeau, 1999). La actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas se basa en la inhibición de las topoisomerasas, la topoisomerasa II o ADN-girasa y la topoisomerasa IV.

Las cepas de Enterobacterias con concentraciones mínima inhibitorias (CMI) elevadas de ácido nalidíxico presentan ya una mutación en la ADN-girasa, por lo que sólo es necesaria una segunda mutación para que la cepa adquiriera una resistencia de alto nivel a ciprofloxacino (Vila y col., 1994).

## **7. IMPORTANCIA GLOBAL DE LAS RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS.**

La resistencia microbiana a los antibióticos es un problema creciente en nuestra población. La microbiota intestinal podría considerarse como un importante reservorio para las bacterias resistentes, pero la presencia de los genes portadores de resistencias en tales comunidades bacterianas ha sido escasamente estudiada.

En ausencia de presiones selectivas como el uso de antibióticos, que condiciona la aparición de resistencias, la dinámica de colonización intestinal de cepas resistentes y sensibles debería estar a favor de eliminar genes de resistencia, de forma que las cepas resistentes no fueran capaces de persistir en la microbiota intestinal, ya que se ha visto que la colonización por Enterobacterias resistentes puede preceder a posteriores infecciones por dichos microorganismos (De Almeida y col., 2005).

### **7.1. Resistencias en cepas colonizantes de neonatos.**

En función del tipo de sujetos que se estudien, las tasas de resistencia serán más o menos elevadas, por ejemplo, en neonatos exentos de factores de riesgo, las tasas de resistencia serán menores que en el caso de un grupo de neonatos con factores de riesgo previos, como bajo peso al nacer, hospitalización en unidades hospitalarias en las que se emplean antibióticos de amplio espectro, etc.

Hay estudios que han demostrado este hecho, de manera que las tasas de resistencia a diferentes antibióticos en bacterias comensales, así como la tasa de producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) son significativamente más altas en muestras de neonatos obtenidas durante la hospitalización comparadas con las muestras obtenidas tras el alta en ese mismo grupo de neonatos (Sirot y col., 1992, Duman y col., 2005).

También es cierto que la colonización intestinal por Enterobacterias resistentes puede cambiar de una localización a otra. En general las tasas de resistencias en neonatos sanos son más elevadas en los países en vías de desarrollo, lo cual puede explicarse entre otras causas por el excesivo e inadecuado uso de los antibióticos. Así por ejemplo con respecto a la ampicilina, encontramos tasas de resistencias en Enterobacterias en torno al 90% en poblaciones de Turquía (Duman y col., 2005), al 95% en India y sur de África (Amyes y col., 1992; Shanaman y col., 1993), al 42% en Inglaterra (Shanaman y col., 1994), 12 % en Suecia (Karami y col., 2008) y al 59% en neonatos sanos españoles (Domínguez y col., 2002).

### **7.1.1. Importancia actual de las BLEEs. Colonización intestinal por cepas portadoras de BLEEs.**

Como hemos comentado anteriormente, un aspecto importante en el estudio de la flora comensal en neonatos es la aparición de cepas resistentes a antibióticos.

En las dos últimas décadas, uno de los problemas más importantes en relación a las resistencias bacterianas ha sido la aparición de Enterobacterias productoras de BLEEs. Estas cepas han llegado a ser patógenos muy prevalentes en UCIs neonatales, llegando a colonizar hasta a un 90% de los pacientes con infecciones adquiridas en el hospital (Jacobi, 1997).

En los últimos años se han realizado múltiples estudios de los factores de riesgo asociados a la colonización y/o infección por Enterobacterias productoras de BLEEs, especialmente en unidades de cuidados intensivos neonatales en las que supone un auténtico problema tanto clínico (incremento en la morbilidad y mortalidad) como epidemiológico (diseminación clonal de estos microorganismos dentro de estas unidades que producen auténticos brotes epidémicos).

Recientemente Duman y col. (2005) estudiaron la colonización fecal por Enterobacterias productoras de BLEEs no sólo en niños de UCIs neonatales sino también en niños hospitalizados en plantas de neonatos y en recién nacidos sanos. Los porcentajes de colonización por estas enterobacterias fueron del 33.7% y, de forma sorprendente, se encontró que no existían diferencias en los porcentajes de colonización entre los tres grupos estudiados.

Por lo tanto, como se conoce que la colonización de microorganismos en el intestino del recién nacido, especialmente de algunas bacterias potencialmente patógenas como las pertenecientes a la familia

*Enterobacteriaceae*, tiene lugar durante el nacimiento y pueden alcanzar altos niveles de población en el intestino con las implicaciones que conlleva anteriormente descritas. Y a su vez, dicha colonización está influenciada por numerosos factores entre ellos el tipo de alimentación, ya que entre la escasa literatura existente, se ha comprobado que la flora intestinal de los niños alimentados a pecho es diferente de la de los niños alimentados con fórmula, en este trabajo hemos estudiado la colonización intestinal por Enterobacterias en neonatos sanos que tomaban diferentes tipos de alimentación desde prácticamente el nacimiento hasta los primeros tres meses de vida. Además nos hemos centrado en la especie de Enterobacteria normalmente predominante en el intestino: *Escherichia coli*, estudiando diferentes características.