

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“EFECTO DE LA PROFILAXIS ANTIMICROBIANA  
INTRAPARTO SOBRE LAS POBLACIONES DE  
BIFIDOBACTERIAS EN NIÑOS NACIDOS A TÉRMINO”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**POR**

**SILVIA SATURIO LÓPEZ**

**JULIO, 2018**





**PROFESOR TUTOR:**

Dr. D. **Miguel Gueimonde Fernández**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC).

**PROFESOR COTUTOR:**

Dra. Dña. **Silvia Arboleya Montes**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC).

**CERTIFICA:**

Que D. **Silvia Saturio López** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 12ª promoción curso 2017-2018.

Villaviciosa, 3 de Julio de 2018

Miguel Gueimonde Fernández

Silvia Arboleya Montes

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega  
Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer todo el esfuerzo y la confianza que mis tutores, Miguel Gueimonde y Silvia Arboleya, han puesto en mí, gracias por dejarme formar parte de este maravilloso proyecto.

A todos y cada uno de los integrantes del grupo de probióticos y prebióticos, especialmente a la doctoranda Alicja, por su infinita paciencia y dedicación.

También a mis compañeros de máster que han estado conmigo en el IPLA, por la compañía, los ánimos y todos los viajes dirección Oviedo, sin tiempo ni para comer, pero siempre con una sonrisa.

A mi compañera de laboratorio, gracias Cris por esa última cerveza al sol y, sobre todo, por las risas.

A todos los que me han ayudado a lo largo de este camino, familia, amigos, gracias.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	10
CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	13
a) Composición de la microbiota intestinal.....	13
b) Funciones de la microbiota intestinal e importancia para la salud.....	15
c) Colonización, desarrollo y evolución de la microbiota intestinal.....	17
d) Factores perinatales que afectan al establecimiento de la microbiota intestinal .	18
Profilaxis antimicrobiana intraparto.....	24
e) Resistoma humano.....	26
f) Género <i>Bifidobacterium</i> .....	27
Características generales y probióticas.....	27
Las bifidobacterias y sus beneficios para la salud.....	28
CONSIDERACIONES EXPERIMENTALES.....	32
a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
PCR cuantitativa (q-PCR).....	33
b) Cultivo de microorganismos anaerobios.....	34
c) Identificación de bacterias por el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
a) Voluntarios y descripción de las muestras.....	36
b) Preparación de los estándares para la q-PCR.....	37
c) Determinación de especies de bifidobacterias por q-PCR.....	38
d) Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
a) Evolución de la población de bifidobacterias a lo largo del tiempo.....	41

b) Efecto de la profilaxis antimicrobiana intraparto en la población de bifidobacterias.....	43
CONCLUSIONES.....	52
ABREVIATURAS .....	53
BIBLIOGRAFÍA .....	54
APÉNDICES .....	66
Apéndice I.....	66

## RESUMEN

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que habita en el intestino y su establecimiento comienza en las etapas más tempranas de la vida. La alteración de este proceso por diferentes factores conlleva importantes implicaciones para la salud temprana del niño y consecuencias a largo plazo para el individuo. En el momento del parto se produce la principal transferencia (de madre a hijo) de los primeros colonizadores del tracto gastrointestinal, entre los que se encuentran las bifidobacterias. El género *Bifidobacterium* es uno de los grupos bacterianos más abundantes en la microbiota intestinal infantil, y a estos microorganismos se les han atribuido importantes funciones y beneficios para la salud.

La comunidad científica considera que el establecimiento de la microbiota intestinal inicial es “idóneo” cuando se produce bajo determinadas circunstancias (parto vaginal, nacimiento a término, alimentación exclusiva con leche materna y no exposición antibiótica) lo que se relaciona con un bajo riesgo de desarrollar diferentes enfermedades y por lo tanto con un estado óptimo de salud. Sin embargo, con frecuencia diversos agentes externos pueden amenazar este proceso. Entre estos factores la exposición a antibióticos es común y, en concreto, los antibióticos intraparto están presentes en más del 30% de los nacimientos; a pesar de que su efecto sobre el establecimiento de la microbiota intestinal aún no está totalmente entendido.

En este contexto, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la evolución de las poblaciones de bifidobacterias durante los tres primeros meses de vida en niños nacidos a término y estudiar el impacto que la profilaxis antimicrobiana intraparto (PAI) ejerce. Para ello, se cuantificaron diferentes especies de bifidobacterias, por PCR cuantitativa.

Este trabajo demostró una reducción en los niveles de la mayoría de las especies de bifidobacterias estudiadas, en los niños a cuyas madres se les había administrado PAI con respecto a los que sus madres no habían sido expuestas a antibióticos. Siendo significativas las diferencias en *B. longum* y *B. bifidum* a los 10 días de vida.

En este proyecto se pone de manifiesto, la necesidad de seguir investigando el efecto de diferentes factores perinatales por los que se ven afectados los recién nacidos, para establecer estrategias de modulación de la microbiota intestinal que mejoren la futura salud del neonato.

## ABSTRACT

The gut microbiota is the microbial community inhabiting our intestine and its establishment begins at early life stage. Disturbances on this process by different factors involves important implications for the health of the infant and long-term consequences. The main microbial transfer from mother to baby start during delivery, with the exposure to the first colonizers of the gastrointestinal tract, such as bifidobacteria. Bifidobacterium is one of the most abundant genus in the infant intestinal microbiota and it is known that this microbial group carries out key functions for maintaining a healthy status.

The scientific community has considered an “ideal” gut microbiota establishment when it occurs under certain circumstances (vaginal delivery, full-term delivery, exclusive breastfeeding and no antibiotic exposure), which is related to low risk to develop different diseases and an optimal health state. However, several external factors can affect the correct gut microbiota establishment. Among these factors, antibiotic exposure is common, and the intrapartum antibiotics are currently present in over 30% of deliveries; even though its effect over the gut microbiota establishment is not still well-understood.

In this context, the aim of this project was to assess the evolution of the *Bifidobacterium* population during the first months of life in a cohort of healthy full-term babies, and to study the effect of the intrapartum antimicrobial prophylaxis (IAP). For this purpose, different bifidobacterial species have been evaluated by quantitative PCR.

This study showed a reduction in the levels of the most of bifidobacteria species analysed in the group of babies which mothers had received IAP, with respect to the babies group which mother did not have contact with antibiotics. Statistical significant differences have been found in *B. longum* and *B. bifidum* at 10 days of life.

This project underlines the need to study the effect of different perinatal factors affecting neonates, with the objective to develop strategies for modulating the gut microbiota and improve the future health status.

## LISTA FIGURAS

Figura 1. Representación de las familias de bacterias predominantes en el intestino delgado y colon. Donaldson y cols., (2016). .....	14
<b>Figura 2.</b> Factores que afectan al establecimiento inicial de la microbiota en los recién nacidos. ....	19
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica en porcentajes de los filos mayoritarios presentes en niños nacidos a término por parto vaginal y alimentados exclusivamente con leche materna (FTVDBF) vs. niños prematuros. Tomado de Arboleya y cols., 2016.....	20
<b>Figura 4.</b> Efectos inmunológicos y consecuencias clínicas a largo plazo en los recién nacidos cuando se han administrado antibióticos a la madre (color rojo). Por el contrario, en color azul se muestran los efectos de un desarrollo normal. Tomado de Zeissig & Blumberg, 2014. ....	23
<b>Figura 5.</b> Abundancia relativa de los principales filos presentes en función de si han estado expuestos a los antibióticos, la madre, el niño, ambos o ninguno, a los 30 días tras el parto. Tomado de Arboleya y cols., 2016a. ....	25
<b>Figura 6.</b> Proporciones relativas (%) de los principales filos, en los diferentes tiempos de muestro, presentes en los recién nacidos cuyas madres recibieron PAI (columnas negras) y aquellos cuyas madres no lo recibieron (columnas blancas). Los asteriscos indican diferencias significativas. Tomado de Nogacka y cols., 2017a. ....	26
<b>Figura 7.</b> Cepa de <i>Bifidobacterium</i> vista al microscopio electrónico de barrido. Tomado de bio.pisceswebdesign.com .....	27
<b>Figura 8.</b> Imagen de una cabina de anaerobiosis, como la utilizada en este trabajo. Tomado de abtechnologies.tradeindia.com .....	34
<b>Figura 9.</b> Termociclador 7500 Real-Time PCR Systems de Applied Biosystems®. Thermofisher.com.....	38
<b>Figura 10.</b> Efectos de la PAI en la concentración de <i>B. bifidum</i> a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}$ ufc/ml) y en el eje de abscisas se muestran los días de vida. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. El asterisco muestra una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en ese punto entre los dos grupos de niños del estudio.....	45
<b>Figura 11.</b> Efectos de la PAI en la concentración de <i>B. longum</i> a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}$ ufc/ml)	



y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. Los asteriscos muestran una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) a los 10 días entre los dos grupos de niños del estudio..... 45

**Figura 12.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. catenulatum* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}\text{ufc/ml}$ ) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. .... 46

**Figura 13.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. adolescentis* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}\text{ufc/ml}$ ) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. .... 46

**Figura 14.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. breve* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}\text{ufc/ml}$ ) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. .... 47

**Figura 15.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. animalis* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}\text{ufc/ml}$ ) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. .... 48

**Figura 16.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. dentium* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}\text{ufc/ml}$ ) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. .... 48

**Figura 17.** Evolución del número de especies de bifidobacterias a lo largo del tiempo en función de la administración de PAI a las madres de los recién nacidos. Las barras de error representan las desviaciones típicas en cada punto. .... 50

## LISTA TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efectos beneficiosos de cepas de <i>Bifidobacterium</i> sobre diversas patologías que afectan al tracto gastro intestinal, en conjunción o no, con otras especies. Tojo y cols., 2014.....	31
<b>Tabla 2.</b> Características de los individuos incluidos en el estudio. ....	37
<b>Tabla 3.</b> Para cada grupo microbiano estudiado se muestra la secuencia de los primers utilizados en cada caso, junto con la temperatura de anillamiento específica.....	40
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones medias ( $\log_{10}$ ufc/ml) junto con las desviaciones típicas en cada especie de bifidobacterias estudiada y en el género <i>Bifidobacterium</i> . ....	41
<b>Tabla 5.</b> Se muestra la prevalencia (%) de las distintas especies de bifidobacterias en función del tiempo (días). En rojo se representan los porcentajes más bajos y en tonos verdes los porcentajes más altos.....	43
<b>Tabla 6.</b> Se muestra la prevalencia de las especies de bifidobacterias estudiadas en función del tiempo (días) y de si la madre fue tratada con PAI o no. ....	49

## INTRODUCCIÓN

Gracias al desarrollo de técnicas moleculares independientes de cultivo, que se complementan con las técnicas dependientes de cultivo usadas tradicionalmente, se ha podido conocer más a fondo la composición y función de la microbiota intestinal; además de conocer la importancia de los diferentes grupos microbianos que la forman y conviven en simbiosis con el hospedador.

Entre las funciones desempeñadas por estos microorganismos en nuestro organismo, encontramos:

- Producción de vitaminas y otros compuestos (Biedermann & Rogler., 2015).
- Mantenimiento de la función barrera del epitelio (Rautava y cols., 2012).
- Degradación de compuestos no digeribles (Kinross y cols., 2011).
- Transformación y absorción de sales biliares y lípidos (Martin y cols., 2012).
- Protección frente a patógenos (Biedermann & Rogler, 2015).
- Modulación del sistema inmune (Gensollen y cols., 2016; Olszak y cols., 2012)

Además, en los últimos años se ha prestado especial interés al estudio de la relación de la microbiota intestinal y la maduración cerebral, desarrollo cognitivo y de comportamiento (Al-asmakh y cols., 2012).

Debido a la importancia que la microbiota intestinal ejerce en la fisiología humana, es importante que se mantenga en un estado de eubiosis (equilibrio del ecosistema microbiano intestinal), evitando la exposición a factores que puedan romper dicho equilibrio, alterando las funciones de la microbiota y pudiendo dar lugar a diversas patologías. Entre estos factores encontramos, entre otros, el estrés, los tratamientos con antibióticos o los cambios en la dieta (Reinhardt y cols., 2009).

Desde el punto de vista de su composición la microbiota intestinal presenta una gran variabilidad entre individuos y también a lo largo de las diferentes partes del intestino, siendo los filos dominantes en de los humanos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia (Yatsunenکو y cols., 2012). Esta microbiota comienza a establecerse desde el nacimiento con el parto representando un momento crítico, ya que es cuando se produce la principal transferencia vertical de madre a hijo (a través del canal del parto) de los microorganismos que colonizarán su tracto gastrointestinal (TGI). Cada individuo en ese instante, como durante la vida

prenatal, se ve condicionado por una serie de circunstancias o factores que determinarán la composición de su microbiota inicial. Si éstos no son los idóneos, podría aumentar la susceptibilidad del individuo a padecer ciertas patologías en etapas posteriores de la vida.

La edad gestacional, el tipo de parto (vaginal o cesárea), el tipo de alimentación (leche materna, de fórmula o mixta), el ambiente, el uso de antibióticos o la genética son algunos de los factores que influyen en el correcto establecimiento de la microbiota intestinal. De modo general se ha asumido que la microbiota que se establece en los niños sanos nacidos a término, por parto vaginal y alimentados exclusivamente con leche materna es el “estándar de microbiota neonatal saludable”, ya que estos niños presentan menor riesgo de sufrir enfermedades, y por ello, también es el objetivo de formulación de muchas leches infantiles (Arboleya y cols., 2012). De entre estos factores, la edad gestacional, la forma de alimentación del recién nacido y el tipo de parto han sido ampliamente estudiados en el contexto del establecimiento de la microbiota intestinal. Sin embargo, otros factores como la profilaxis antimicrobiana intraparto (PAI), a pesar de estar presente en más del 30% de los partos, ha recibido mucha menos atención y solo recientemente se ha comenzado a estudiar su efecto. Estudios preliminares del grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo fin de máster (TFM) han demostrado un importante efecto de la PAI en el establecimiento de los grupos microbianos mayoritarios de la microbiota intestinal neonatal (Nogacka y cols., 2017a).

Por otro lado, las bifidobacterias son uno de los grupos microbianos predominantes en la microbiota intestinal infantil, siendo además uno de los primeros anaerobios en establecerse al inicio de la vida. Su composición a nivel de especie sufre una transición a lo largo del tiempo. Varios estudios han considerado la presencia y abundancia de bifidobacterias como un potencial biomarcador microbiano de salud. También una aberrante composición es frecuentemente observada en alteraciones intestinales (Arboleya y cols., 2016b).

En este contexto, el **objetivo principal** del presente trabajo fue evaluar la evolución y el impacto que la PAI ejerce sobre el establecimiento de las poblaciones bifidobacterianas en una cohorte de 39 niños sanos nacidos a término, durante los primeros meses de vida. Para ello, se cuantificaron diferentes especies de

bifidobacterias, por PCR cuantitativa, en muestras fecales recogidas en cuatro tiempos diferentes (2, 10, 30 y 90 días de vida).

Se establecieron conclusiones comparando los resultados obtenidos en los niños cuyas madres habían recibido PAI y niños cuyas madres no había sufrido la exposición a antibióticos.

El *objetivo final* del estudio es caracterizar el establecimiento de la microbiota intestinal durante los primeros meses de vida, establecer dianas de actuación para su modulación hacia los estándares de salud y desarrollar probióticos (del género *Bifidobacterium*) destinados a minimizar los efectos de la PAI.

## CONSIDERACIONES TEÓRICAS

### a) Composición de la microbiota intestinal

El TGI alberga una gran variedad de microorganismos pertenecientes a los tres dominios de la vida, que conviven en simbiosis con el hospedador; conociéndose a este conjunto como microbiota intestinal.

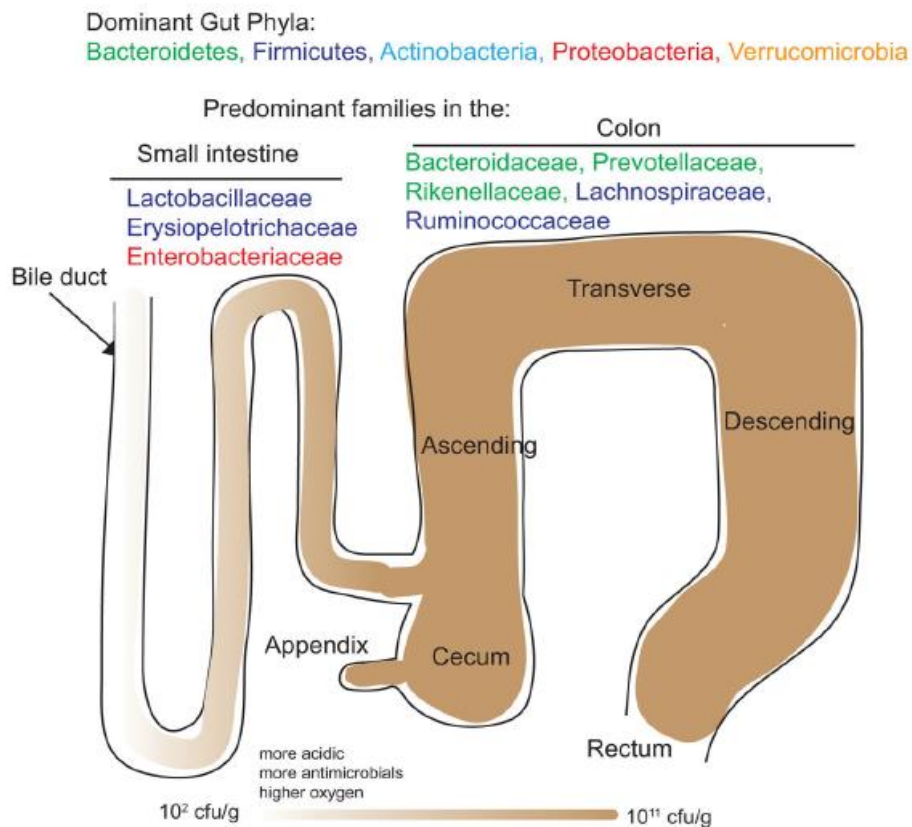
Los inicios del estudio de esta microbiota, durante el siglo pasado, estaban basados en el aislamiento y cultivo de microorganismos provenientes de las heces, lo que permitió que Theodor Escherich aislara la primera bacteria gastrointestinal *Bacterium coli commune*, actualmente nombrada como *Escherichia coli* (Escherich, 1989). Sin embargo, no fue hasta el desarrollo de técnicas de cultivo bajo condiciones anaerobias y de técnicas independientes de cultivo, cuando comenzaron los primeros estudios sobre la microbiota intestinal considerada como comunidad microbiana compleja (Hungate, 1969; Holdeman y cols., 1976; Wilson & Blitchington, 1996).

En la actualidad, existen diferentes consorcios científicos, a nivel mundial, destinados al estudio de la microbiota intestinal, como pueden ser el “Human Microbiome Consortium” (USA) o el proyecto “Metahit” (UE). Los datos recopilados en estos estudios han identificado 2172 especies, 386 de las cuales son anaerobias estrictas, pertenecientes a 12 filos microbianos diferentes en la microbiota humana (Thursby & Juge, 2017). Pese a la existente variabilidad interindividual; en la microbiota intestinal adulta, predominan los filos Firmicutes y Bacteroidetes, siendo también importante la presencia (aunque en menor porcentaje) de Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia (Yatsunenko y cols., 2012). Por el contrario, en los bebés los filos microbianos mayoritarios son Actinobacteria y Proteobacteria (Arbolea y cols., 2016b). Es también importante señalar que a nivel de especie encontramos una gran variabilidad y diversidad, haciéndose difícil establecer un núcleo común en todos los humanos que permita definir la microbiota “normal” a este nivel taxonómico (Walter & Ley, 2011).

Esta diversidad se reduce en la vejez, debido a diferentes aspectos fisiológicos y dietéticos que afectan directamente a la microbiota intestinal en las últimas etapas de la vida. Los estudios que han analizado a este grupo poblacional también han detectado una disminución de las especies beneficiosas, así como un aumento de las anaerobias facultativas y bacterias aerotolerantes. En general, en ancianos se han detectado

menores niveles de Firmicutes y Bacteroidetes, en comparación con adultos jóvenes (O'Toole & Claesson, 2010) con diversos estudios indicando también la disminución del género *Bifidobacterium* (Salazar y cols., 2017).

La microbiota intestinal también varía a lo largo del TGI, tanto como en diversidad como en concentración. Esto es debido a las diferentes características presentes en cada tramo (tamaño, pH, concentración de oxígeno y sales biliares, movimientos peristálticos, etc.) siendo el colon la zona con mayor concentración bacteriana. Éste se caracteriza por la presencia de las familias *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, tal y como se muestra en la Figura 1. Por otra parte, el intestino delgado presenta una menor diversidad, siendo mayoritaria la presencia de las familias *Lactobacillaceae* y *Enterobacteriaceae*. También se encuentran diferencias dentro de cada tramo, entre la zona epitelial, la intersticial y el mucus (Donaldson y cols., 2016).



**Figura 1.** Representación de las familias de bacterias predominantes en el intestino delgado y colon. Donaldson y cols., (2016).

## **b) Funciones de la microbiota intestinal e importancia para la salud**

A nivel funcional la microbiota intestinal se encuentra más conservada que a nivel de composición microbiana, atribuyéndosele tres funciones principales: metabólica, morfológica y protectora (Guarner y cols., 2003):

### - Función metabólica:

Una de las funciones metabólicas más conocida y estudiada, llevada a cabo por los microorganismos intestinales, es la degradación de compuestos no digeribles de la dieta, como la celulosa, el almidón o la pectina. Por ejemplo, *Bacteroides thetaiotaomicron* cuenta con más de 250 enzimas codificadas en su genoma, capaces de metabolizar dichos compuestos (Kinross y cols., 2011). Esta degradación conlleva la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCCs) que intervienen en otras funciones importantes para el hospedador como la gluconeogénesis y lipogénesis (Morrison & Preston, 2016).

Otras bacterias están especializadas en la transformación y absorción de sales biliares y lípidos (Martin y cols., 2012) o en la producción de vitaminas, como la vitamina B12, necesaria para la producción de energía y que solo es sintetizada por estos microorganismos (Thursby & Juge, 2017).

Dada su elevada actividad metabólica, algunos autores consideran a la microbiota como el “órgano” más activo de todo el organismo con unas capacidades metabólicas superiores a las del hígado (Baquero & Nombela, 2012).

### - Función morfológica:

Estudios realizados con ratones sin microbiota (GF), remarcan la importancia de ésta, al demostrar que estos ratones presentaban defectos en el desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), en la producción de anticuerpos; además de contar con un menor número de placas de Peyer y una lámina propia celular reducida (Purchiaroni y cols., 2013). Estas bacterias, a través de su interacción con receptores de las células intestinales, como los receptores tipo Toll (TLR), también contribuyen al mantenimiento de la estructura del epitelio y por, tanto, de su función barrera (Rautava y cols., 2012).

Los AGCCs, producidos por bacterias de la microbiota intestinal, tienen un papel fundamental en el desarrollo del intestino ya que estimulan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales (Guarner y cols., 2003).



- Función protectora:

La función de protección que desempeñan los microorganismos de la microbiota intestinal está basada en la exclusión competitiva de las especies potencialmente patógenas (Biedermann & Rogler., 2015).

Además, la microbiota intestinal estimula la síntesis de compuestos antimicrobianos e inmunoglobulina A secretora (SIgA) que impiden la unión de los patógenos a la mucosa intestinal (Thursby & Juge, 2017). Algunos de sus integrantes, también tienen la capacidad de producir compuestos antimicrobianos, como las bacteriocinas o los ácidos orgánicos, contribuyendo a la inhibición de microorganismos potencialmente patógenos.

En los últimos años, la investigación en este campo ha llevado al estudio de la interacción o del efecto de la microbiota intestinal más allá del ambiente intestinal, definiéndose algunos ejes de estudio como el “eje intestino-hígado” o “eje cerebro-intestino”. Es sabido que el TGI y el cerebro interactúan bidireccionalmente a través de mecanismos activos y pasivos (Gensollen y cols., 2016). El cerebro interviene, entre otras funciones, en la motilidad intestinal y en la regulación del flujo sanguíneo. Actualmente, hay evidencias científicas suficientes para afirmar que la microbiota intestinal influye en la función cerebral y el comportamiento (Luczynski y cols., 2016).

Estudios llevados a cabo en este campo, y recogidos algunos de ellos en la revisión de Al-asmakh y cols., (2012), sugieren que la microbiota intestinal interviene en la maduración del cerebro, modulando el desarrollo cognitivo y el comportamiento. Complementándose los datos epidemiológicos con estudios en ratones, se ha llegado a relacionar trastornos como el autismo con infecciones intestinales en la etapa prenatal.

El estudio detallado de la microbiota intestinal a nivel composicional y funcional en los últimos años, ha permitido establecer relaciones directas entre determinadas alteraciones de la microbiota intestinal (disbiosis) y algunas enfermedades (Milani y cols., 2017).

Sin embargo, si esas alteraciones son causa o consecuencia de las enfermedades es aún, en muchos casos, tema de estudio e investigación. Lo que sí es ampliamente aceptado por la comunidad científica es que la microbiota intestinal ejerce una función esencial para la salud del hospedador desde las etapas más tempranas de la vida. La colonización inicial es un momento clave en la vida de cada individuo; esa primera

comunicación microbiota-hospedador determinará la predisposición a padecer ciertas patologías en etapas posteriores de la vida.

Los primeros microorganismos que colonizan el epitelio intestinal provocan un fuerte estímulo antigénico que educa al sistema inmune durante ese periodo en el que éste es más permisivo y aún inmaduro. Diferentes estudios, recogidos en la revisión hecha por Gensollen y cols., (2016), demostraron la importancia de la microbiota al comparar ratones GF con ratones normales. Se vio que los GF, presentaban problemas intestinales a nivel morfológico y funcional, además de defectos en el desarrollo de los órganos linfoides, debido a una menor concentración de linfocitos T y B.

En otros estudios, llevados a cabo con ratones recién nacidos, se vio que la colonización microbiana inicial producía una reducción en la presencia de células T NK, causantes de inflamación intestinal. Este efecto no se producía si la colonización se producía en la edad adulta (Olszak y cols., 2012). Este descubrimiento viene respaldado por el hecho de que especies presentes en la microbiota intestinal, como *Bacteroides fragilis*, inhiben la proliferación de células T NK, al activar la producción de linfocitos T reguladores a través de la acción del lipopolisacárido A (LPS-A) presente en la pared celular de esta especie gram-negativa. El LPS-A junto con los AGCCs producidos por otras especies comensales, estimulan la producción de interleucina 10 (IL-10) que presenta propiedades antiinflamatorias (An y cols., 2014).

Una vez expuestas, las diferentes funciones que la microbiota intestinal desempeña en el organismo humano, queda clara la importancia de una correcta colonización para la futura salud del individuo. Se ha propuesto un “periodo ventana de oportunidad” en la etapa perinatal (de duración aún no definida), donde es posible la modulación de la microbiota con el objetivo de minimizar o evitar los perjuicios que conllevan una microbiota aberrante (Nogacka y cols., 2017b).

### **c) Colonización, desarrollo y evolución de la microbiota intestinal**

Al contrario de lo que tradicionalmente se pensaba, algunos autores hipotetizan que el feto podría no encontrarse en un ambiente estrictamente estéril. Esto es debido a que recientes estudios han demostrado la presencia de diversas bacterias pertenecientes en su mayoría a la familia *Enterobacteriaceae*, en placenta, líquido amniótico, cordón umbilical y meconio (Aagaard y cols., 2014; Collado y cols., 2016; Jiménez y cols., 2005), que serían consideradas como inóculo inicial para el desarrollo de la microbiota

intestinal. Sin embargo, es en el momento del parto cuando se produce la principal transferencia de madre a hijo de los colonizadores principales que conformarán la microbiota intestinal.

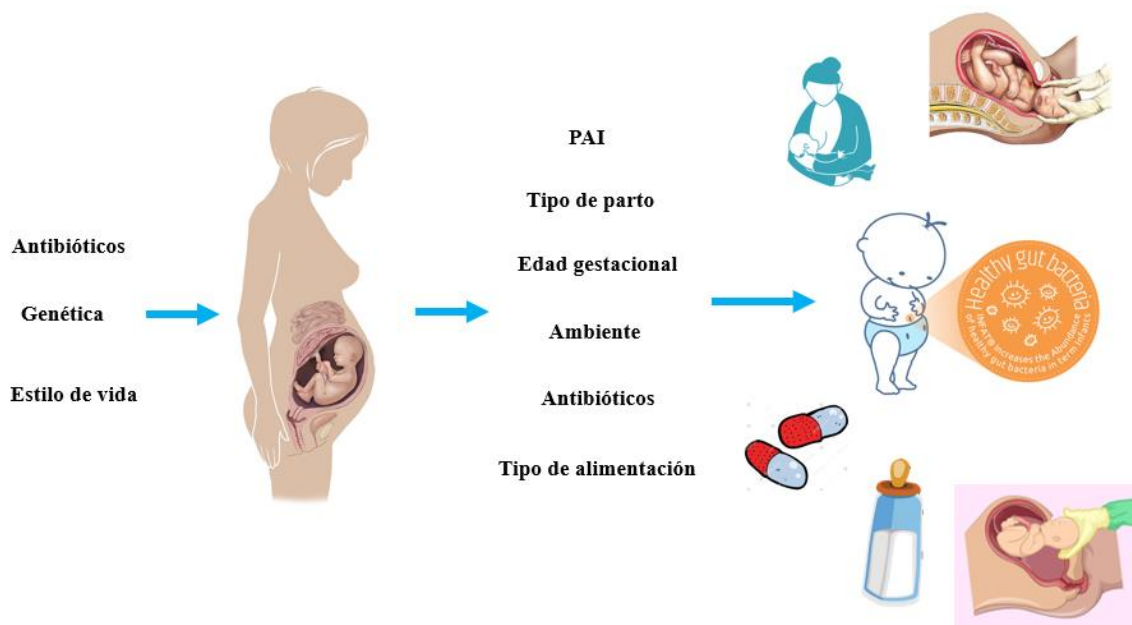
Considerando como el “estándar de microbiota neonatal saludable” la composición de la microbiota intestinal de aquellos niños sanos nacidos a término, por parto vaginal y alimentados con leche materna, comentaremos a continuación cómo evoluciona la microbiota del intestino a lo largo del tiempo.

Inicialmente, el ambiente intestinal es relativamente aerobio, por lo que los colonizadores iniciales son bacterias anaerobias facultativas pertenecientes a géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia*. Posteriormente, y como consecuencia de una dieta compuesta exclusivamente por leche y la utilización de ésta por las bacterias, la concentración de oxígeno en el intestino disminuye y aumenta el ácido láctico, lo que favorece la presencia de géneros anaerobios estrictos como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Collinsella* (Backhed y cols., 2015). Se produce un aumento significativo en determinadas especies del filo Bacteroidetes, entre los 9 y 18 meses como consecuencia de la introducción de ciertos alimentos complementarios a la leche materna. Durante el primer año de vida, *Bifidobacterium* es uno de los géneros dominantes, dentro del cual cabe destacar especies como *B. longum*, *B. breve* y *B. bifidum*, que han sido aisladas con mayor frecuencia (Bergstrom y cols., 2014; Turróni y cols., 2012; Yatsunenکو y cols., 2012).

A medida que varía la dieta de los infantes y su organismo se va desarrollando se aprecian cambios significativos en las especies dominantes en el intestino, siendo el punto de inflexión de la maduración de la microbiota el cese de ingesta de leche materna (Backhed y cols., 2015). A los tres años, aproximadamente, se considera que la composición de la microbiota intestinal se asemeja a la adulta dominada por los grupos Firmicutes y Bacteroidetes (Milani y cols., 2017).

#### **d) Factores perinatales que afectan al establecimiento de la microbiota intestinal**

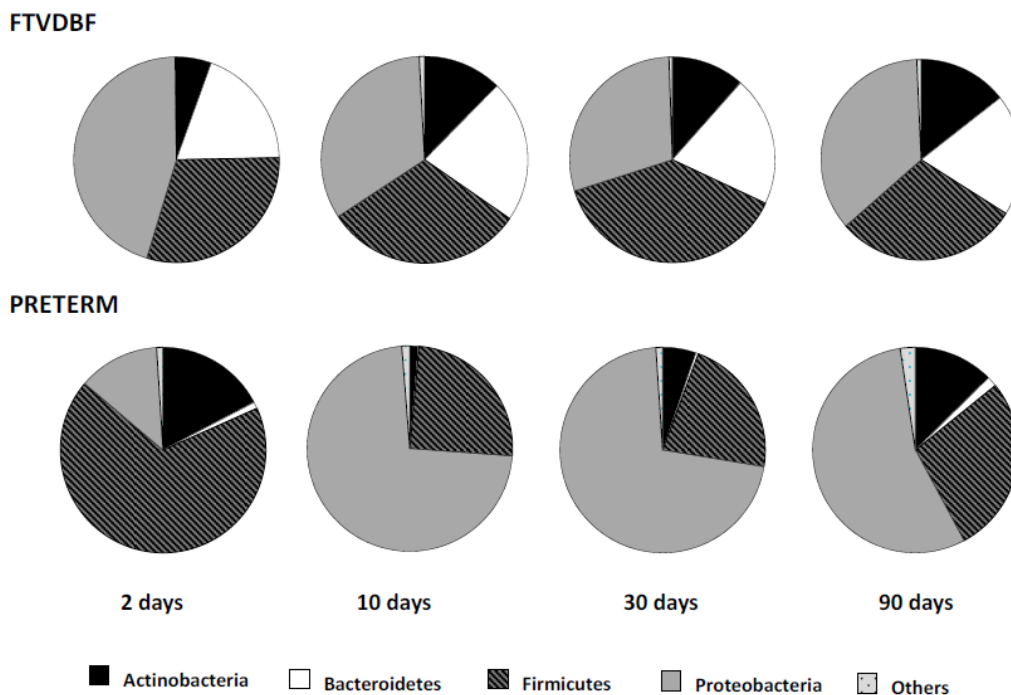
En la colonización del TGI pueden intervenir un amplio rango de factores (ejemplificados algunos de ellos en la Figura 2), tanto internos como externos, entre los que destacaremos:



**Figura 2.** Factores que afectan al establecimiento inicial de la microbiota en los recién nacidos.

- Edad gestacional:

La edad gestacional fue analizada como factor determinante en el establecimiento de la microbiota inicial, encontrándose diferencias significativas, tanto cualitativas como cuantitativas (Figura 3), entre la microbiota inicial de los niños cuyas condiciones se consideran como “ideales” (nacidos a término, parto vaginal y alimentados exclusivamente con leche materna) y de niños prematuros. En este último grupo se evidenciaron, a los dos días de vida mayores niveles de Firmicutes y menores de Bacteroidetes; a los treinta días de vida, mayores de Proteobacteria y menores de Actinobacteria (Arbolea y cols., 2016a). Estos resultados concuerdan con estudios previos (Arbolea y cols., 2011), en los que se observaron en las muestras pertenecientes a recién nacidos prematuros, mayores niveles de diversos géneros pertenecientes a familias de anaerobios facultativos como *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Enterococcaceae*; y menores de niveles de anaerobios como *Bifidobacterium* y *Bacteroides*. Es de destacar que, también únicamente en las muestras de prematuros se detectaron especies potencialmente patógenas como *Clostridium difficile*. Estas diferencias, en la mayoría de los casos, fueron atenuándose con el paso del tiempo.



**Figura 3.** Representación gráfica en porcentajes de los filos mayoritarios presentes en niños nacidos a término por parto vaginal y alimentados exclusivamente con leche materna (FTVDBF) vs. niños prematuros. Tomado de Arbolea y cols., 2016.

- Tipo de parto:

Resultados obtenidos por Domínguez-Bello y cols., (2010) y confirmados posteriormente por diversos estudios han demostrado que los niños nacidos por parto vaginal adquieren comunidades bacterianas semejantes a las de la microbiota vaginal de su madre, siendo dominantes *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Sneathia spp.* Por el contrario, en los niños nacidos por cesárea, se encontraron comunidades semejantes a las presentes en la piel, entre las que destacan *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium spp* y *Corynebacterium*.

La importancia de este descubrimiento radica en el importante papel que desempeñan las bacterias transmitidas a través del canal del parto en el recién nacido. De hecho, otros autores (Bager y cols., 2008; Negele y cols., 2004) relacionan el parto por cesárea con una mayor susceptibilidad a padecer problemas intestinales, así como asma o alergias. También se ha asociado con una mayor prevalencia de genes de resistencia a antibióticos en el microbioma (Backhed y cols., 2015), dado que, al tratarse de una intervención quirúrgica hay profilaxis con antibióticos.

- Ambiente:

Entre los factores ambientales que afectan a la composición de la microbiota de los recién nacidos encontramos el lugar geográfico de nacimiento, el tipo de estilo de vida y estructura familiar, además de los condicionantes culturales.

El estudio realizado por Mueller y cols., (2006) en el que se comparaba la microbiota de individuos de diferentes localidades geográficas (Suecia, Francia, Alemania e Italia), demostró una diferencia significativa respecto a *Bifidobacterium*, siendo las proporciones de este género de 2 a 3 veces mayores en los nacidos en Italia. También se encontraron diferencias en función de la cultura de la localidad y el estilo de vida de la familia (Grzeskowiak y cols., 2012).

En cuanto a las diferencias observadas en función de la estructura familiar, Laursen y cols., (2015), estableció una correlación positiva entre la convivencia de los recién nacidos con sus hermanos mayores y una mayor diversidad de los filos Firmicutes y Bacteroidetes.

- Tipo de alimentación:

La leche materna humana es el alimento producido en las glándulas mamarias de las mujeres con el fin de alimentar a sus hijos recién nacidos, es rica en nutrientes, moléculas bioactivas y microorganismos. Los beneficios que reporta la lactancia materna en el recién nacido han sido ampliamente estudiados, recomendando la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Academia Estadounidense de Pediatría la alimentación exclusiva con leche materna durante los primeros seis meses de vida (Martin y cols., 2016).

La leche materna actúa modulando la microbiota del infante, ya que además de contener bifidobacterias, también presenta una elevada concentración de oligosacáridos que favorecen su desarrollo. Entre las especies presentes más abundantes encontramos, *B. longum*, *B. animalis* y *B. bifidum* (Gueimonde y cols., 2007a). Por lo que, es de esperar que se hayan encontrado diferencias en las especies dominantes en la microbiota intestinal de infantes en función de su tipo de alimentación. A los 4 meses de vida se observó que aquellos alimentados exclusivamente con leche materna presentaban niveles elevados de *B. longum* y diferentes especies de *Lactobacillus*, como *L. casei* y *L. johnsonii*. Por el contrario, en los alimentados con leche de fórmula predominaban

especies como *Clostridium difficile*, *Enterobacter cloacae*, *Granulicatella adiacens* y *Bilophila wadsworthia* (Backhed y cols., 2015).

Los oligosacáridos, al favorecer el crecimiento de especies comensales, principalmente bifidobacterias, y tener un efecto antiadhesivo evitan la unión de patógenos al intestino (Newburg y cols., 2005). Esta acción se ve reforzada por el efecto bacteriostático que ejercen sobre ciertas especies como *Streptococcus agalactiae* (Lin y cols., 2017).

Además, recientes estudios llevados a cabo con ratones no obesos han asociado su ingesta con un efecto protector frente a la aparición de diabetes tipo I e insulinitis pancreática (Xiao y cols., 2018).

- Uso de antibióticos:

Otro de los factores que más puede afectar al establecimiento y composición de la microbiota intestinal, es el uso de antibióticos. Es indudable el efecto beneficioso de los antibióticos para la salud, siendo el descubrimiento de la penicilina en el año 1928 por Fleming uno de los logros más importantes en la medicina moderna. Hecho que ha salvado millones de vidas y que desempeñó un papel fundamental durante la Segunda Guerra Mundial momento en el que su efectividad quedó totalmente demostrada. Esto llevó a Fleming a ganar en 1945, junto con Chain y Florey, el Premio Nobel de Medicina (Ligon, 2004).

Pese a ello, se sabe que los antibióticos provocan una reducción de la diversidad microbiana y que, tras un tratamiento con antibióticos, la recuperación total de la composición de la microbiota es muy difícil, con consecuencias a largo plazo y una mayor prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (Thiemann y cols., 2016). Por ello, es un factor crítico de exposición en las etapas tempranas de la vida y se ha asociado con el desarrollo de alergias y otras patologías como el asma (Fouhy y cols., 2012).

La colonización inicial de la microbiota intestinal se ve afectada por la administración de antibióticos tanto a la madre como al recién nacido.

Los nacidos prematuramente presentan mayores tasas de exposición antibiótica que aquellos nacidos a término. Estudios realizados en este ámbito han mostrado, que el tratamiento antibiótico tanto en los recién nacidos prematuros como en los nacidos a

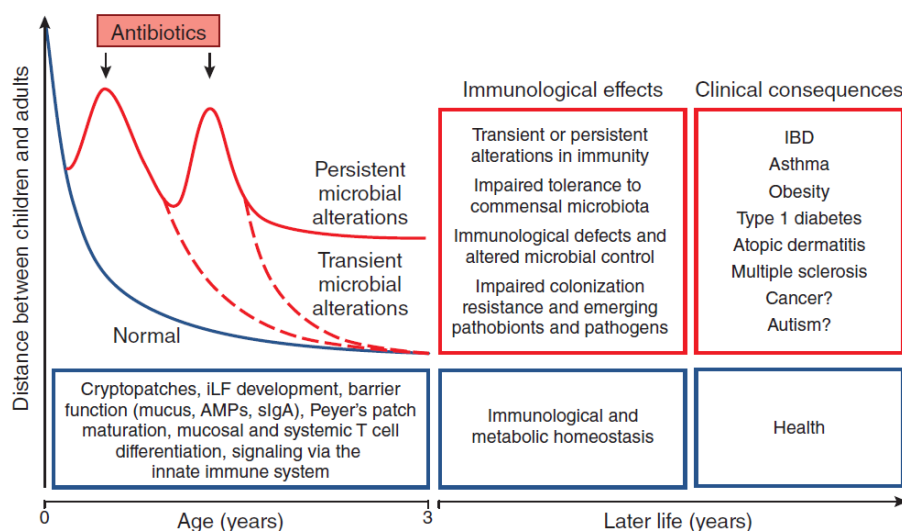
término, produce una reducción en los niveles de *Bifidobacterium* y un aumento de enterobacterias (Nogacka y cols., 2017b)

La exposición a antibióticos que puede experimentar la madre se da durante el embarazo o en el momento del parto, siendo esta última conocida como PAI que, dada su relevancia en este trabajo, comentaremos en el apartado posterior.

En cuanto a su administración durante el embarazo, se han asociado aquellos utilizados para el tratamiento de infecciones del tracto urinario con una mayor presencia de especies del género *Staphylococcus*; y aquellos utilizados para tratamiento de infecciones de las vías respiratorias con una mayor presencia de *E. coli* en el tracto vaginal (Stokholm y cols., 2014). Esta especie ha sido relacionada en diferentes estudios con infecciones neonatales y nacimiento prematuro (Stoll y cols., 2011; Carey y cols., 2005).

Este hecho es importante ya que, puede provocar una disbiosis en la microbiota vaginal de la madre, y en el momento del parto las especies transferidas al recién nacido no serán las consideradas como favorables, lo que influirá en el correcto desarrollo del TGI; además de afectar al sistema inmune, metabólico y cerebral (Cox y cols., 2014; Hansen y cols., 2012); aumentando así el riesgo de padecer en un futuro diversas patologías como asma (Russell y cols., 2012), enfermedad inflamatoria intestinal (Ng y cols., 2013), dermatitis atópica (Flohr y cols., 2005) o esclerosis múltiple (Nørgaard y cols., 2011).

En la Figura 4 podemos ver una comparación de los efectos de un desarrollo normal (color azul) con los anteriormente mencionados (color rojo).



**Figura 4.** Efectos inmunológicos y consecuencias clínicas a largo plazo en los recién nacidos cuando se han administrado antibióticos a la madre (color rojo). Por el contrario, en color azul se muestran los efectos de un desarrollo normal. Tomado de Zeissig & Blumberg., 2014.



Para finalizar con este apartado, es necesario mencionar que también el consumo de antibióticos por parte de la madre durante el periodo de lactancia constituye un riesgo para los lactantes, ya que los antibióticos pueden pasar al lactante a través de la leche y/o alterar la microbiota presente en ésta (Soto y cols., 2014).

### **Profilaxis antimicrobiana intraparto**

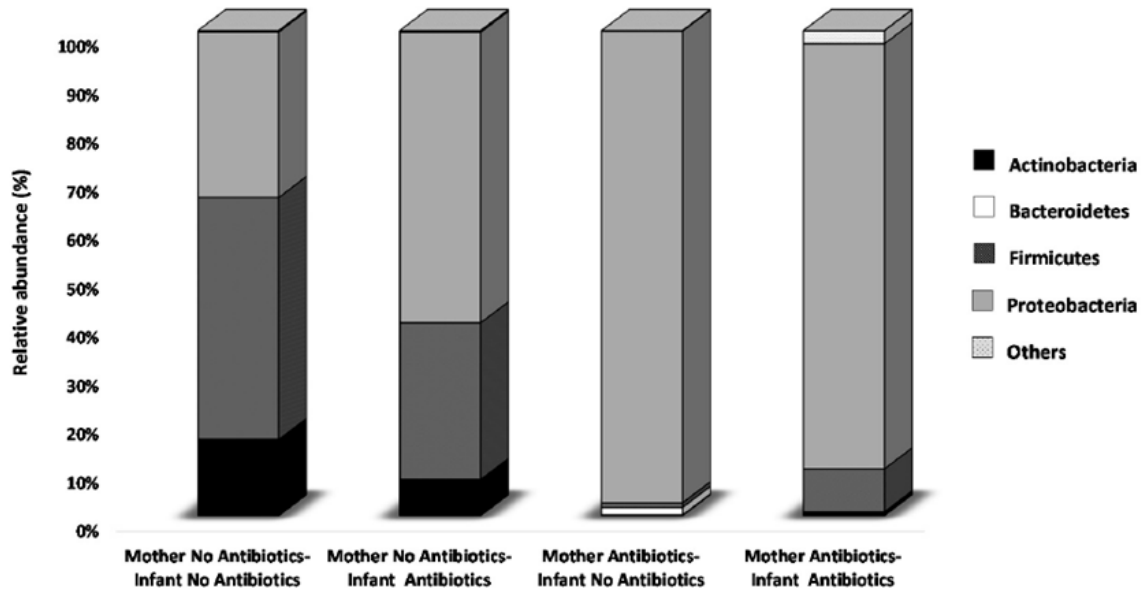
Se conoce como PAI, a la administración intravenosa de antibióticos (principalmente penicilina, ampicilina, clindamicina, cefazolina o vancomicina) en el momento previo al parto, a las mujeres portadoras en su vagina o recto del microorganismo *Streptococcus agalactiae*. Se trata de un estreptococo del grupo B cuyo reservorio en humanos es el TGI, desde donde se transloca a la vagina, estando presente entre el 12 y 20% de las embarazadas españolas (Ramos y cols., 2009; Verani y cols., 2010). Esta bacteria puede ser adquirida por los recién nacidos a su paso por el canal del parto, causando en ellos diferentes enfermedades que se clasifican en función de su momento de inicio en:

- Enfermedades de inicio temprano, se desarrollan dentro de la primera semana tras el nacimiento y entre ellas se encuentran neumonía y sepsis (Russell y cols., 2017).
- Enfermedades de inicio tardío, se desarrollan desde la primera semana y hasta los 3 meses, entre ellas encontramos insuficiencia respiratoria, bacteriemia, shock séptico y meningitis. Aquellos que sobreviven a la meningitis presentan secuelas neurológicas crónicas. (Maisey y cols., 2008; Libster y cols., 2012).

El objetivo de la PAI es evitar dicho contagio, y desde que en la década de los 80 se demostró su efectividad, la tasa de mortalidad asociada a la infección por *Streptococcus* grupo B se vio reducida un 45% (Verani y cols., 2010).

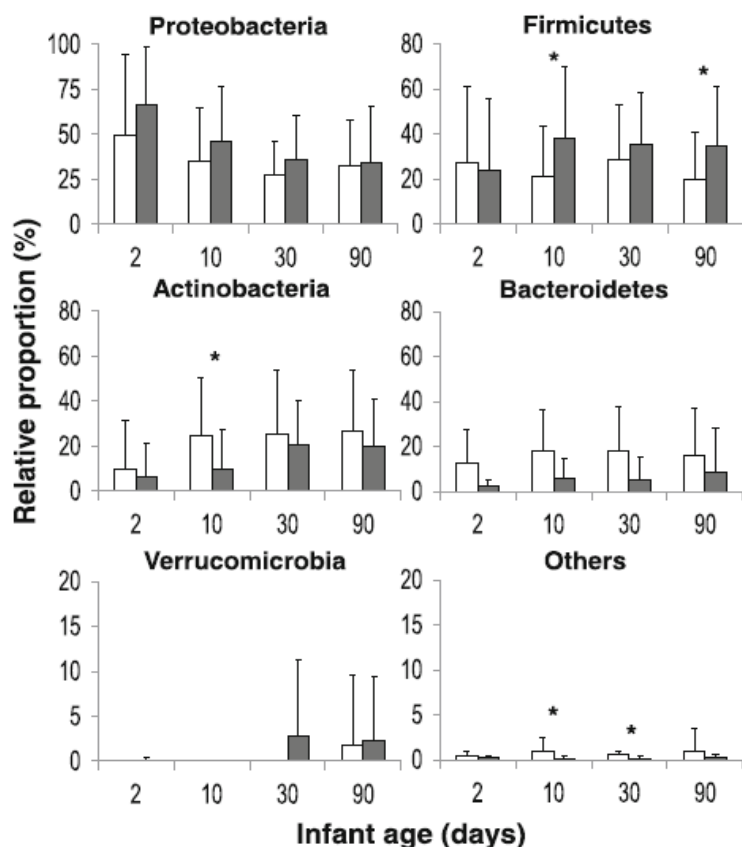
Sin embargo, esta administración parece no ser a coste cero, en términos de establecimiento de la microbiota intestinal. Se sabe que algunos antibióticos de amplio espectro pueden atravesar la placenta y llegar al feto (Nahum y cols., 2006). En trabajos previos del grupo de investigación donde se ha desarrollado este TFM, se ha demostrado que la administración de PAI desencadena las mismas consecuencias, o incluso peores en términos de establecimiento de microbiota intestinal, que la administración de antibióticos directa en el recién nacido, tanto en aquellos nacidos a término como en los prematuros (Arbolea y cols., 2015, Nogacka y cols., 2017). Como

podemos ver en la Figura 5, la diversidad microbiana se reduce en los casos en que la madre ha sido tratada con antibióticos con respecto a cuándo el tratado directamente es el recién nacido.



**Figura 5.** Abundancia relativa de los principales filos presentes en función de si han estado expuestos a los antibióticos, la madre, el niño, ambos o ninguno, a los 30 días tras el parto. Tomado de Arbolea y cols., 2016a.

En otro estudio del grupo, centrado solo en niños nacidos a término, se han observado diferencias significativas al comparar la microbiota de niños cuyas madres había sido expuestas a antibióticos (PAI) y niños cuyas madres no habían sido expuestas (Figura 6). Los niños cuyas madres fueron tratadas con PAI mostraron menores niveles de Bacteroidetes y Actinobacteria y mayores de Proteobacteria y Firmicutes en su microbiota fecal (Nogacka y cols., 2017a). Por lo que, en éstos el porcentaje de microorganismos potencialmente patógenos, como *Campylobacteriaceae* o *Helicobacteriaceae* (ambas pertenecientes al filo Proteobacteria), es mayor y el de microorganismos comensales como diferentes miembros de la familia *Bifidobacteriaceae*, es menor (Aloisio y cols., 2016; Nogacka y cols., 2017a).



**Figura 6.** Proporciones relativas (%) de los principales filos, en los diferentes tiempos de muestro, presentes en los recién nacidos cuyas madres recibieron PAI (columnas negras) y aquellos cuyas madres no lo recibieron (columnas blancas). Los asteriscos indican diferencias significativas. Tomado de Nogacka y cols., 2017a.

### e) Resistoma humano

Desde el descubrimiento de los antibióticos su uso, en ocasiones innecesario, ha dado lugar a la aparición de genes que codifican resistencias, siendo el TGI un importante reservorio de genes de resistencia, que en su conjunto con frecuencia se denomina resistoma intestinal humano (Gillings., 2013).

Recientemente, se ha sugerido que estos genes pueden pasar de madres a hijos por transferencia vertical, ya que se han detectado genes de resistencia a tetraciclina y a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tanto en el meconio de los recién nacidos como en heces a los 10 días de vida (Gosalbes y cols., 2015). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nogacka y cols., (2017a), que observaron que aquellos niños cuyas madres habían sido tratadas con antibióticos  $\beta$ -lactámicos presentaban una mayor ocurrencia de genes, como *BLA-tem*, que confieren resistencia a dichos antibióticos. Los genes de resistencia a antibióticos más comunes en la microbiota neonatal son los que codifican resistencia a tetraciclina, eritromicina, aminoglucósidos y  $\beta$ -lactámicos. La prevalencia de muchos de

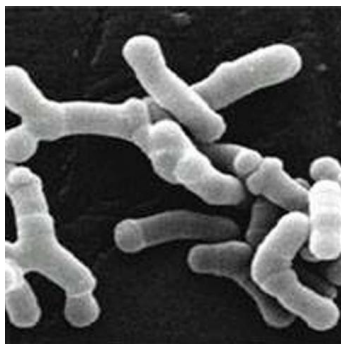
estos genes varía a lo largo del tiempo, debido a los cambios que se producen en las poblaciones que constituyen la microbiota intestinal (Nogacka y cols., 2017b).

La mayoría de los antibióticos, especialmente los de amplio espectro, afectan a la microbiota intestinal, propiciando la aparición por presión selectiva de microorganismos con genes de resistencia; potencialmente susceptibles de ser transmitidos a la descendencia en el caso de las mujeres embarazadas y/o de ser seleccionados positivamente en la microbiota del niño. Además, estos genes se encuentran en abundancia en el medio ambiente y son capaces de transmitirse por transferencia horizontal a otras especies, llegando los microorganismos resistentes al TGI. De hecho, es muy frecuente encontrar genes de resistencia en muestras biológicas de individuos sanos sin exposición antibiótica previa directa o indirecta (Gueimonde y cols., 2006).

#### f) Género *Bifidobacterium*

##### Características generales y probióticas

*Bifidobacterium* es un género de bacterias gram-positivas, perteneciente al filo Actinobacteria y que, en el momento de escritura de este TFM incluye 64 especies y 10 subespecies (<http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html>). Se trata de microorganismos anaerobios, en forma de bacilos irregulares (Figura 7) y sin motilidad, no formadores de esporas y que presentan diferentes temperaturas y pH óptimos de crecimiento en función de la especie (Gomes & Malcata, 1999).



**Figura 7.** Cepa de *Bifidobacterium* vista al microscopio electrónico de barrido. Tomado de [bio.pisceswebdesign.com](http://bio.pisceswebdesign.com)

Las bifidobacterias abarcan diferentes nichos ecológicos, siendo el grupo microbiano dominante en la microbiota intestinal de niños alimentados con leche materna, donde son capaces de degradar los componentes de los oligosacáridos presentes en la misma (Milani y cols., 2017). Durante la vida adulta permanecen en

menores niveles, pero estables, tendiendo a disminuir durante la vejez (Arboleya y cols., 2016b). Las especies mayoritarias en la microbiota intestinal son *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum* y *B. pseudolongum* (Turroni y cols., 2009).

La probióticos son definidos, según la FAO, como “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, proporcionan un beneficio para la salud” (FAO/WHO, 2006).

*Bifidobacterium*, junto con *Lactobacillus*, es uno de los géneros más utilizados como probiótico y se consideran microorganismos seguros para su consumo, con las especies más frecuentemente utilizadas incluidas en la lista “Qualified Presumption of Safety” elaborada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2007). Por sus características pueden ser comercializados en alimentos, dándoles la categoría de alimentos funcionales o como suplementos alimenticios (Gomes & Malcata., 1999).

La efectividad del uso de especies del género *Bifidobacterium*, principalmente *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis* y *B. animalis*, como probióticos ha sido probada en diversos estudios clínicos y en experimentación animal. En éstos se ha visto que ayudan a reducir las molestias gastrointestinales en adultos celíacos y en ciertos trastornos asociados a la diabetes tipo II y esclerosis múltiple (Zhu y cols., 2018). Su eficacia ha sido demostrada *in vitro* también para el control de ciertas especies potencialmente patógenas como *C. difficile* (Valdés-Varela y cols., 2016).

En la Tabla 1, extraída de Tojo y cols., (2014) se muestran los efectos de diferentes cepas de *Bifidobacterium* frente a patologías gastrointestinales en estudios en humanos.

### **Las bifidobacterias y sus beneficios para la salud**

Las bifidobacterias se establecen en el intestino de los recién nacidos durante las primeras semanas de vida, cuando el ambiente es anaerobio y, por tanto, adecuado para su crecimiento. Aquellos nacidos a término y por parto vaginal, muestran concentraciones de bifidobacterias mayores que los nacidos por cesárea (Domínguez-Bello y cols., 2010); al igual que aquellos alimentados con leche materna. Es decir, que los niños nacidos bajo las condiciones que los expertos consideran como idóneas, presentan una microbiota intestinal con amplia presencia de especies de *Bifidobacterium* (Arboleya y cols., 2016b).

Estas hipótesis que relacionaban la presencia de bifidobacterias con un buen estado de salud, se remontan a los inicios del siglo XX, cuando Ellie Metchnikoff y Henry Tissier, trabajadores del Instituto Pasteur, descubrieron que las bifidobacterias estaban ausentes en niños que padecían diarreas y, sin embargo, eran abundantes en niños sanos (Tojo y cols., 2014).

Además, varios estudios (recogidos en la revisión de Milani y cols., 2017), han relacionado niveles bajos de estas bacterias con mayor tendencia a desarrollar en etapas posteriores de la vida obesidad, enfermedades autoinmunes, alergias, problemas intestinales y celiaquía, entre otras. Por el contrario, niveles altos se asocian con un correcto establecimiento de la homeostasis intestinal, interviniendo en la modulación del sistema inmune.

Todo lo expuesto anteriormente ha llevado a que las bifidobacterias sean uno de los grupos microbianos más ampliamente estudiados en su relación con la salud hasta el momento, y que tenga un extendido uso como probióticos.

Especie	Cepa	Otras especies	Efectos
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	Bb12	+ <i>S. thermophilus</i>	Mejora diarrea infantil asociada a antibióticos.
		No	Prevención de infecciones en centros de cuidado infantil.
	+ <i>L. rhamnosus</i> (GG y Lc705), <i>P. freudenreichii ssp. shermani</i> JS	Paliación síntomas del síndrome del intestino irritable (SII).	
DN-173010	+ <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbureckii ssp. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> (= leche fermentada)	Mejora los síntomas del SII. Mejora el bienestar gastrointestinal en mujeres con síntomas digestivos menores.	
<i>B. bifidum</i>	HN019	No	Mejora la sintomatología GI funcional.
	NCDO1453	+ <i>L. acidophilus</i> NCDO 1748	Previene la enterocolitis necrotizante (ECN) en recién nacidos prematuros de bajo peso.
<i>B. breve</i>	Bb99	+ <i>L. rhamnosus</i> (GG and Lc705), <i>P. freudenreichii ssp. shermani</i> JS	Paliación síntomas SII.
	Yakult	+ prebiótico GOS + <i>L. casei</i> Shirota	Mejora la sintomatología de individuos intolerantes a la lactosa y disminuye la producción de H <sub>2</sub> . Mejora las condiciones clínicas de los pacientes con colitis ulcerosa.
<i>B. infantis</i>	35624	No	Alivio síntomas asociados a SII.

			Reducción de los biomarcadores proinflamatorios sistémicos.
<b>Infloran® (<i>B. infantis</i>)</b>	Desconocida	+ <i>L. acidophilus</i>	Previene la ECN en recién nacidos prematuros de bajo peso.
<b>ABC Dophilus (<i>B. infantis</i>, <i>B. bifidum</i>)</b>	Desconocida	+ <i>S. thermophilus</i>	Previene la ECN en recién nacidos de bajo peso.
<b>VSL#3® (<i>B. breve</i>, <i>B. infantis</i>, <i>B. longum</i>)</b>	Desconocida	+ <i>S. thermophilus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Remisión de colitis ulcerosa en niños. Mejora la sintomatología en niños con SII. Reduce la sintomatología en pacientes con colitis ulcerosa de media a moderada. Mantenimiento de la remisión en la reservoritis recurrente o refractaria. Reduce el índice de actividad de la reservoritis en pacientes con anastomosis entre la bolsa ileal y el ano. Reducción de la incidencia de diarrea asociada a antibióticos en pacientes hospitalizados de riesgo.

**Tabla 1.** Efectos beneficiosos de cepas de *Bifidobacterium* sobre diversas patologías que afectan al tracto gastro intestinal, en conjunción o no, con otras especies. Tojo y cols., 2014.



## **CONSIDERACIONES EXPERIMENTALES**

### **Métodos para el estudio de la microbiota intestinal**

Tradicionalmente, el análisis de la microbiota intestinal se llevaba a cabo mediante el cultivo de muestras fecales seguido de la identificación y caracterización de las bacterias, por pruebas genotípicas y fenotípicas clásicas. Esto conllevaba ciertas limitaciones, debido al desconocimiento de las necesidades ambientales y nutricionales de ciertos microorganismos lo que imposibilitaba su cultivo y crecimiento en el laboratorio. El descubrimiento de nuevas técnicas moleculares independientes de cultivo (TMID) ha permitido profundizar en el campo de estudio de la microbiota intestinal. Muchas de ellas se basan en el estudio del gen que codifica el ARN ribosomal 16S, conservado en todas las bacterias.

En los últimos años hemos sido testigos de la explosión de diferentes técnicas de análisis masivo, denominadas “ómicas”, tanto a nivel composicional (metagenómica filogenética) como a nivel funcional (metagenómica total, metabolómica, metatranscriptómica). Esto ha permitido el avance en el conocimiento de la composición de la microbiota intestinal y sus funciones. Sin embargo, el uso de TMID anteriores a las ómicas, como la PCR cuantitativa, continúan siendo muy importantes para dar una aproximación numérica absoluta a los miembros de la microbiota intestinal. Sin embargo, es importante destacar que, el cultivo de microorganismos sigue siendo esencial para poder caracterizar dichas bacterias, elaboración de estándares y genomas de referencia, etc. así como para entender las capacidades bioquímicas y metabólicas de los microorganismos.

Expondremos a continuación, brevemente, los fundamentos teóricos de los métodos más utilizados en este trabajo.

#### **a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es una técnica, desarrollada en 1983 por Kary Mullis, basada en la amplificación de fragmentos de ADN mediante la repetición de diferentes ciclos de temperatura que permiten la desnaturalización del ADN y su posterior elongación, previo anillamiento de los cebadores. Los productos de cada ciclo sirven como molde para el siguiente, así cada ciclo duplica la cantidad de ADN original (Erlich y cols., 1991).

Todo el proceso se realiza en un termociclador y para la visualización de los resultados es necesario realizar una electroforesis en gel de agarosa.

### **PCR cuantitativa (q-PCR)**

La PCR cuantitativa en tiempo real es una técnica de alta sensibilidad, basada en el fundamento de la PCR convencional, que combina la amplificación con la cuantificación de moléculas de ADN o de ADN complementario. Para ello son necesarios oligonucleótidos o cebadores específicos, un fluoróforo o sonda marcada, desoxirribonucleótidos (dNTPs), una solución tampón y una ADN-polimerasa termoestable. Generalmente, estos cuatro últimos compuestos se comercializan juntos en forma de *master mix* (ej: SYBR Green PCR Master Mix). El fluoróforo se intercala en el ADN de doble hélice, emitiendo fluorescencia al ser excitado por una fuente de energía específica para su longitud de onda. Esta fluorescencia se mide en tiempo real y es emitida de manera proporcional a la cantidad de copias generadas.

La reacción se realiza mediante diferentes ciclos de temperatura; durante los ciclos iniciales la señal es débil, pero a medida que la cantidad de producto se acumula, la señal aumenta exponencialmente. La cantidad de ADN se cuantifica comparando el número de ciclos de amplificación necesarios para que se alcance un nivel de señal de fluorescencia umbral (*threshold*, en inglés). El valor que representa los ciclos requeridos para alcanzar ese umbral se denomina CT (*cycle threshold*). El CT de una muestra es inversamente proporcional a la cantidad inicial de la molécula diana en ella; cuanto mayor sea el número de secuencias diana en la muestra, menos ciclos de PCR serán necesarios para alcanzar el CT (Kubista y cols., 2006).

Todo el proceso se lleva a cabo en un termociclador acoplado a un sistema óptico y a un ordenador que cuenta con un programa que permite la visualización de los resultados durante el proceso de amplificación.

Para obtener resultados cuantitativos y específicos del grupo microbiano analizado, es preciso realizar en paralelo una recta de calibración o curva patrón (previa preparación de los estándares de ADN). Esta recta permite también obtener la eficiencia de la reacción, mediante la siguiente ecuación, (1):

$$E = 10^{-1/k} - 1 \quad (1)$$

La eficiencia será del 100% cuando la pendiente de la recta (k) sea, aproximadamente, -3.32 (Aguilera y cols., 2014).

### **b) Cultivo de microorganismos anaerobios**

Los microorganismos anaerobios no respiran oxígeno molecular ( $O_2$ ); los anaerobios tolerantes pueden tolerar, e incluso crecer en su presencia, sin embargo, los anaerobios estrictos se inhiben en ambientes óxicos (Madigan y cols., 2009).

Los microorganismos anaerobios necesitan unas condiciones específicas para su crecimiento. En primer lugar, es necesario que el ambiente sea anaerobio, en las cámaras de anaerobiosis (Figura 8) esto se consigue mediante una mezcla de gases (nitrógeno, hidrógeno y dióxido de carbono). También es preciso que el medio sea adecuado, en este estudio todas las cepas han sido crecidas en *Man Rogosa and Sharpe* (MRS) suplementado con cisteína que es un agente reductor (Klare y cols., 2005).



**Figura 8.** Imagen de una cabina de anaerobiosis, como la utilizada en este trabajo. Tomado de [abtechnologies.tradeindia.com](http://abtechnologies.tradeindia.com)

Para este trabajo el cultivo de las bifidobacterias ha sido necesario para la preparación de los estándares de ADN para la realización de las curvas de calibrado de la q-PCR.

### **c) Identificación de bacterias por el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S**

La identificación de los ADN utilizados como estándar es necesaria para asegurarnos de que estamos trabajando con la especie correcta. Tras una PCR convencional para amplificar parte del gen del ARNr 16s, los amplicones obtenidos fueron enviados a secuenciar.

Este gen codifica el ARN ribosomal de la subunidad pequeña de los ribosomas bacterianos y se encuentra altamente conservado entre los procariotas. Su extendido uso en estudios filogenéticos y taxonómicos han permitido la creación de una base de datos en continuo crecimiento (Rodicio & Mendoza, 2004). El método de secuenciación utilizado para estos amplicones fue el de Sanger o método por terminación de cadena, se basa en la producción de múltiples copias de ADN, cuya síntesis termina cuando la ADN polimerasa introduce un nucleótido de parada (ddNTP) que está marcado y se visualiza mediante una electroforesis capilar en gel que separa por tamaños los diferentes fragmentos; reconstruyendo así la secuencia del fragmento inicial (Sanger y cols., 1977).

Una vez que se obtienen el cromatograma, la secuencia de nucleótidos se analiza con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que por medio de un algoritmo, permite su comparación con las ya depositadas en la base de datos, mostrando al final los resultados que indican la similitud de la secuencia analizada con otras depositadas en la base de datos, lo que permite identificar el microorganismos de proveniencia de la secuencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### a) Voluntarios y descripción de las muestras

El estudio, aprobado por el Comité Ético Regional del Servicio de Salud Pública de Asturias (SESPA) y con el consentimiento escrito de los padres, incluye muestras fecales de 39 niños recogidas a los 2, 10, 30 y 90 días de vida.

Todos los niños incluidos en este estudio nacieron a término, tras un embarazo sin complicaciones, en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

Las características relevantes (género, tipo de parto y alimentación y PAI) de cada neonato se muestran en la Tabla 2. Cabe destacar que ninguno de los niños objeto de estudio recibió administración antibiótica directa.

La cohorte de niños estudiada en este TFM forma parte de un estudio previo llevado a cabo por el grupo de investigación (Nogacka y cols., 2017).

Individuos	Género	Tipo de parto	PAI	Tipo alimentación
1	Femenino	Vaginal	Sí	Leche materna
2	Femenino	Vaginal	No	Leche materna
3	Femenino	Vaginal	No	Leche materna
4	Femenino	Vaginal	No	Leche fórmula
5	Femenino	Cesárea	Sí	Leche fórmula
6	Masculino	Vaginal	No	Leche fórmula
7	Femenino	Cesárea	Sí	Leche fórmula
8	Femenino	Vaginal	Sí	Leche fórmula
9	Masculino	Vaginal	No	Leche materna
10	Desconocido	Vaginal	Sí	Desconocido
11	Masculino	Vaginal	Sí	Leche materna
12	Masculino	Cesárea	Sí	Leche materna
13	Masculino	Cesárea	Sí	Leche fórmula
14	Masculino	Cesárea	Sí	Leche fórmula
15	Femenino	Vaginal	No	Leche fórmula
16	Desconocido	Vaginal	Sí	Desconocido
17	Femenino	Vaginal	Sí	Leche materna
19	Femenino	Vaginal	No	Leche fórmula

20	Masculino	Vaginal	No	Leche fórmula
21	Femenino	Vaginal	Sí	Leche fórmula
22	Masculino	Vaginal	Sí	Leche fórmula
23	Masculino	Vaginal	Sí	Leche materna
24	Femenino	Vaginal	Sí	Leche materna
25	Masculino	Vaginal	No	Leche materna
26	Masculino	Vaginal	Sí	Leche materna
27	Femenino	Vaginal	Sí	Leche fórmula
28	Masculino	Vaginal	Sí	Leche fórmula
29	Masculino	Vaginal	Sí	Leche materna
30	Masculino	Vaginal	No	Leche materna
31	Masculino	Vaginal	No	Leche materna
32	Femenino	Vaginal	No	Leche fórmula
33	Femenino	Vaginal	Sí	Leche materna
34	Masculino	Vaginal	Sí	Leche materna
35	Masculino	Cesárea	Sí	Leche fórmula
36	Masculino	Vaginal	Sí	Leche materna
37	Masculino	Cesárea	Sí	Leche materna
39	Masculino	Cesárea	Sí	Leche materna
40	Masculino	Cesárea	Sí	Leche materna
41	Femenino	Vaginal	No	Leche materna

**Tabla 2.** Características de los individuos incluidos en el estudio.

### **b) Preparación de los estándares para la q-PCR**

Tal y como comentábamos en el apartado de consideraciones experimentales, respecto a la q-PCR, es necesario realizar una curva de calibración con un ADN estándar proveniente del grupo microbiano o especie que se pretende amplificar para obtener una cuantificación absoluta, que permita relacionar la señal de fluorescencia con la concentración del estándar.

Para la preparación del ADN estándar, en primer lugar, se hace una siembra por estría de una cepa de referencia (microorganismos estándar utilizados se muestran en la Tabla 3), en medio MRS con cisteína al 0.05% y agar al 2%, dejándolo crecer durante 72 horas en condiciones anaerobias. Pasado este tiempo se llevan a cabo varios subcultivos en medio líquido hasta llegar a una densidad óptica (DO) adecuada. En ese

momento, de un mililitro de cultivo se obtiene un pellet celular por centrifugación para la extracción de ADN. Mediante recuento en placa, se obtiene la concentración en unidades formadoras de colonias (ufc). Este proceso se repetirá tres veces para asegurarnos de la reproducibilidad de los resultados.

Los pellets resultantes del centrifugado se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior extracción de ADN con el *QIAamp DNA stool kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

Antes de comenzar con el análisis de las muestras, se confirma la identidad de los ADN de los microorganismos estándar, como se ha mencionado en la sección de “Identificación de bacterias por el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S” de las consideraciones experimentales. Además, tanto la especificidad de los oligonucleótidos como la eficacia de los ADNs estándares, fue testada.

### c) **Determinación de especies de bifidobacterias por q-PCR**

En este trabajo se ha analizado la prevalencia y concentración (ufc/ml) de 8 especies de *Bifidobacterium*, para las que se han utilizado primers y temperaturas de anillamiento específicas del fragmento de ADN diana a amplificar; todo esto se muestra resumido en el Tabla 3.

Todos los análisis llevados a cabo se han realizado por duplicado en corridos independientes, para mayor veracidad de los datos. El termociclador utilizado es el *7500 Real-Time PCR Systems* de Applied Biosystems® (Figura 9).



**Figura 9.** Termociclador 7500 Real-Time PCR Systems de Applied Biosystems®. Thermofisher.com

### d) **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se ha realizado con el programa SPSS (SPSS Inc. Chicago, USA). En primer lugar, se ha contrastado la normalidad de los datos con el test Shapiro-Wilk.

A continuación, se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis para estudiar la evolución de las especies de bifidobacterias a lo largo del tiempo, seguido de una comparación por pares mediante el test de Dunn.

El test no paramétrico U de Mann-Whitney se aplicó para el análisis del efecto de la PAI en la concentración de las diferentes especies en cada tiempo de manera independiente.

Los resultados fueron representados utilizando las medias en forma logarítmica ( $\log_{10}$ ) y las desviaciones típicas correspondientes.

También se estudió la prevalencia de cada especie en los diferentes tiempos, para ellos se calcularon los porcentajes correspondientes teniendo en cuenta aquellas muestras cuantificadas con valores superiores a los límites de detección establecidos. Los resultados fueron analizados utilizando un test chi-cuadrado.



Grupo	Microorganismo Estándar	Primer	Secuencia	T <sup>a</sup> anillamiento (°C)	Referencia
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> IF10/10	<i>B. bifidum</i> F	TGACCGACCTGCCCCATGCT	61	Gueimonde y cols., 2007b
		<i>B. bifidum</i> R	CCCATCCCACGCCGATAGAAT		
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>B. breve</i> NCIMB 8807	<i>B. breve</i> F	AATGCCGGATGCTCCATCACAC	61	Gueimonde y cols., 2007b
		<i>B. breve</i> R	GCCTTGCTCCCTAACAAAAGAGG		
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> group	<i>B. catenulatum</i> IF12/11	<i>B. catenulatum</i> F	GCCGGATGCTCCGACTCCT	64	Gueimonde y cols., 2007b
		<i>B. catenulatum</i> R	ACCCGAAGGCTTGCTCCCGAT		
<i>Bifidobacterium longum</i> group	<i>B. longum</i> NCIMB 8809	<i>B. longum</i> F	TTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCT	65	Gueimonde y cols., 2007b
		<i>B. longum</i> R	GGCTACCCGTCGAAGCCACG		
<i>Bifidobacterium dentium</i>	<i>B. dentium</i> LMG 110445	<i>B. dentium</i> F	ATCCCGGGGGTTTCGCCT	61	Matsuki y cols., 2004
		<i>B. dentium</i> R	GAAGGGCTTGCTCCCGA		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> group	<i>B. adolescentis</i> CECT 5781	<i>B. adolescentis</i> F	CTCCAGTTGGATGCATGTC	61	Matsuki y cols., 2004
		<i>B. adolescentis</i> R	CGAAGGCTTGCTCCCAGT		
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	<i>B. angulatum</i> LMG 11039	<i>B. angulatum</i> F	CAGTCCATCGCATGGTGGT	61	Matsuki y cols., 2004
		<i>B. angulatum</i> R	GAAGGCTTGCTCCCCAAC		
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>B. animalis</i> DSM10140	<i>B. animalis</i> 5	ACCAACCTGCCCTGTGCACCG	67	Lahtinen y cols., 2005
		<i>B. animalis</i> 3	CCATCACCCCGCCAACAAGCT		

**Tabla 3.** Para cada grupo microbiano estudiado se muestra la secuencia de los primers utilizados en cada caso, junto con la temperatura de anillamiento específica.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el análisis, cualitativo y cuantitativo, de diferentes especies de bifidobacterias en la microbiota fecal de niños sanos nacidos a término durante los tres primeros meses de vida, se observaron los siguientes resultados:

### a) Evolución de la población de bifidobacterias a lo largo del tiempo.

Como comentamos en apartados anteriores, las poblaciones de bifidobacterias presentan variaciones en la microbiota intestinal de los recién nacidos, a lo largo del tiempo en función de determinados factores.

En primer lugar, se hizo un análisis **general de la evolución de las diferentes especies de bifidobacterias** estudiadas, sin tener en cuenta ningún factor o característica específica de estudio. Se incluyeron, también, los datos del género *Bifidobacterium* cuantificado previamente en las mismas muestras fecales (Nogacka y cols., 2017) para realizar análisis comparativos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4 y su representación gráfica en el Apéndice I.

Los cambios más notables en la evolución de los niveles de bifidobacterias se dieron entre los primeros tiempos de muestreo, manteniéndose las concentraciones, más o menos constante entre los 30 y los 90 días.

*B. longum* es la especie presente en mayor concentración en la microbiota fecal de los niños analizados, seguida por *B. catenulatum*. Por otro lado, *B. adolescentis* fue la especie que mostró una concentración menor en todos los tiempos de muestreo, y *B. angulatum* no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas.

Días	2	10	30	90
<i>Bifidobacterium</i>	6,81±1,11	7,72±1,52	8,54±1,04	9,03±0,74
<i>B. longum</i>	6,65±1,15	7,12±1,53	7,71±1,28	8,40±1,11
<i>B. catenulatum</i>	6,22±1,25	6,63±1,66	6,69±1,66	6,91±1,65
<i>B. breve</i>	5,56±0,59	5,55±0,71	6,24±1,4	6,85±1,89
<i>B. bifidum</i>	5,19±0,93	5,41±1,41	6,06±1,59	6,35±1,64
<i>B. animalis</i>	5,34±0,5	5,69±0,87	5,49±0,9	5,69±1,05
<i>B. dentium</i>	5,09±0,18	5,47±0,9	5,57±1,03	5,51±0,99
<i>B. adolescentis</i>	4,9±0,83	5±1,1	4,92±1,04	5,04±1,27

**Tabla 4.** Concentraciones medias ( $\log_{10}$ ufc/ml) junto con las desviaciones típicas en cada especie de bifidobacterias estudiada y en el género *Bifidobacterium*.

Respecto a este primer apartado sobre la evolución general de la concentración de las diferentes especies a lo largo del tiempo, encontramos semejanzas con los resultados obtenidos por Nagpal y cols., (2017). En ambos casos la especie dominante fue *B. longum* y, como nuestro estudio únicamente abarcaba los tres primeros meses de vida. *B. angulatum* no fue detectada en ninguna muestra, en cambio ellos fueron capaces de cuantificarla a los tres años. A diferencia de nuestros resultados, la población de niños japoneses mostró niveles más elevados de la especie *B. breve* (Nagpal y cols., 2017).

Para saber si entre los tiempos de muestreo las diferencias de concentración ( $\log_{10}\text{ufc/ml}$ ) de las especies estudiadas eran, o no, significativas realizamos un test no paramétrico (Kruskal-Wallis) de los datos (no seguían una distribución normal), tras el cual se realizó una comparación por pares utilizando el test Dunn. Éste permitió determinar diferencias significativas en la concentración de *B. bifidum* ( $p < 0.001$ ), *B. breve* ( $p < 0.001$ ), *B. dentium* ( $p < 0.01$ ) y *B. longum* ( $p < 0.001$ ), a lo largo del tiempo.

Estas diferencias se encontraron en *B. bifidum* entre los 10 y 30 días ( $p < 0.05$ ), 10 y 90 días ( $p < 0.01$ ), 2 y 30 días ( $p < 0.05$ ) y 2 y 90 días ( $p < 0.01$ ). En *B. breve* incrementos significativos se produjeron entre los siguientes tiempos: 10 y 30 días ( $p < 0.001$ ), 10 y 90 días ( $p < 0.001$ ), 2 y 30 días ( $p < 0.05$ ) y 2 y 90 días ( $p < 0.05$ ). *B. dentium* aumentó significativamente ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$  respectivamente) desde el primer tiempo de muestreo al último. Finalmente, en *B. longum* esas diferencias se mostraron entre casi todos los tiempos, entre los 2 y 30 días ( $p < 0.01$ ), 2 y 90 días ( $p < 0.000$ ), 10 y 90 días ( $p < 0.000$ ) y 30 y 90 días ( $p < 0.05$ ).

En un segundo análisis, se determinó la **prevalencia de las diferentes especies** (Tabla 5) en las muestras fecales estudiadas. Se observa que *B. longum* está presente entre el 94 y el 100% de los niños dependiendo del tiempo analizado, seguido de *B. animalis*, *B. catenulatum* y *B. bifidum*. Por el contrario, *B. angulatum* no está presente en ninguno de los tiempos estudiados.

	<b>2 d</b>	<b>10 d</b>	<b>30 d</b>	<b>90 d</b>
<i>B. bifidum</i>	76,92	72,97	<b>91,18</b>	88,57
<i>B. breve</i>	46,15	29,73	70,59	74,29
<i>B. catenulatum</i>	64,10	86,49	82,35	80,00
<i>B. dentium</i>	17,95	37,84	38,24	45,71
<i>B. longum</i>	<b>97,44</b>	<b>94,59</b>	<b>96,97</b>	<b>100,00</b>
<i>B. animalis</i>	89,74	<b>94,59</b>	78,79	85,71

<i>B. adolescentis</i>	61,54	59,46	56,25	54,29
<i>B. angulatum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00

**Tabla 5.** Se muestra la prevalencia (%) de las distintas especies de bifidobacterias en función del tiempo (días). En rojo se representan los porcentajes más bajos y en tonos verdes los porcentajes más altos

El análisis chi-cuadrado no determinó diferencias significativas en ninguna de las especies.

Los resultados aquí descritos muestran diferencias con los obtenidos por Nagpal y cols., (2017), en cuyo estudio la prevalencia durante el primer mes de vida no superó el 80% en ninguna de las especies. Esto puede ser debido al factor ambiental, que como comentamos en el apartado de consideraciones teóricas, el lugar de nacimiento de los individuos condiciona la presencia de determinadas especies colonizadoras al inicio de la vida.

Comparando los datos obtenidos a partir de la cuantificación del género *Bifidobacterium*, con los de las especies cuantificadas en este trabajo, se vio que los niveles obtenidos por la suma de las especies de bifidobacterias analizadas, pese a ser las descritas como más frecuentes en humanos, no llegaba al 100% del valor obtenido con la cuantificación del género *Bifidobacterium* en algunos de los niños. Esto significa que otras especies, tal vez incluso por descubrir, están presentes. A los 2 días el porcentaje de niños que presentaban una suma de las especies estudiadas menor al 90% del valor obtenido para el género era del 14,7%. Este porcentaje aumentó paulatinamente, llegando al 20% a los 10 días y, en torno al 21-22% a los 30 y 90 días, indicando la proliferación a lo largo de los primeros meses de vida de especies de bifidobacterias no analizadas en este trabajo.

#### **b) Efecto de la profilaxis antimicrobiana intraparto en la población de bifidobacterias.**

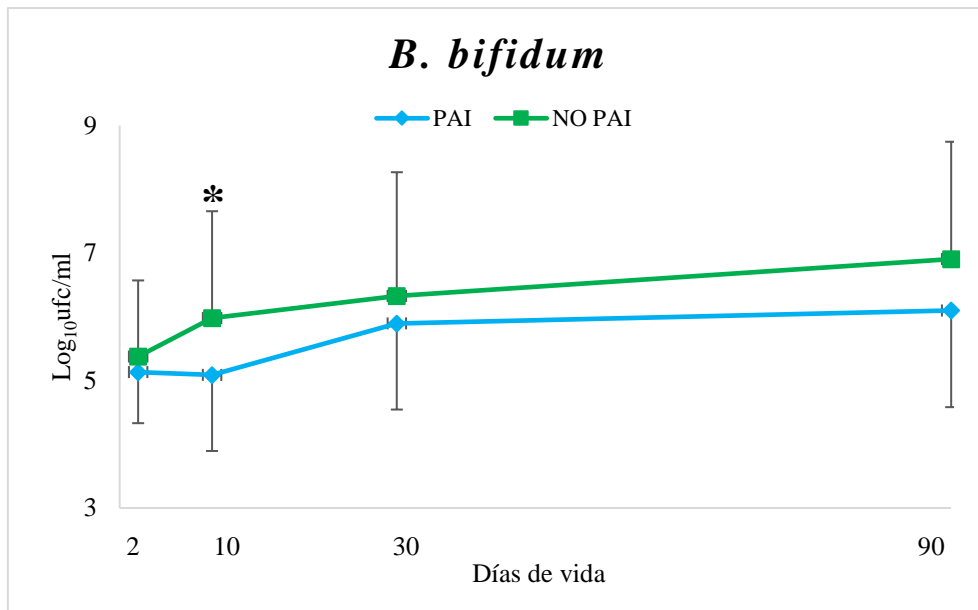
A continuación, se evaluó la **evolución de las poblaciones de bifidobacterias a lo largo del tiempo en los dos grupos** de niños de estudio (PAI vs. NO PAI) independientemente. Tras realizar un test de normalidad, se comprobó que los datos no seguían una distribución normal, por lo que se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis (KW) que mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes tiempos de muestreo en *B. bifidum*, *B. breve*, *B. dentium* y *B. longum*, según el grupo de niños de estudio. Una comparación por pares a posteriori (test Dunn) desveló las diferencias entre tiempos.

*B. bifidum* ( $p < 0.01$ , KW) mostró un incremento significativo entre los días: 2 y 30 ( $p < 0.05$ ), 2 y 90 ( $p < 0.05$ ), 10 y 30 ( $p < 0.01$ ) y 10 y 90 días ( $p < 0.01$ ) en el grupo de recién nacidos cuyas madres fueron tratadas mediante PAI. En dicho grupo, *B. longum* también aumentó entre los 2 y 30 días ( $p < 0.05$ ), 10 y 30 días ( $p < 0.05$ ), 10 y 90 días ( $p < 0.001$ ) y 2 y 90 días ( $p < 0.001$ ).

De la misma manera, en el grupo de recién nacidos cuyas madres no fueron tratadas con PAI, se puede observar un aumento significativo en la especie *B. breve* ( $p < 0.01$ , KW) entre los 10 y 30 días ( $p < 0.05$ ), 10 y 90 días ( $p < 0.01$ ). y 2 y 90 días ( $p < 0.01$ ). *B. longum* también se incrementó significativamente entre los 2 y 10 días ( $p < 0.05$ ), 2 y 30 días ( $p < 0.05$ ) y 2 y 90 días ( $p < 0.001$ ). Por su parte, *B. dentium* mostró diferencias significativas entre los 2 y 30 días ( $p < 0.05$ ) y 2 y 10 días ( $p < 0.01$ ).

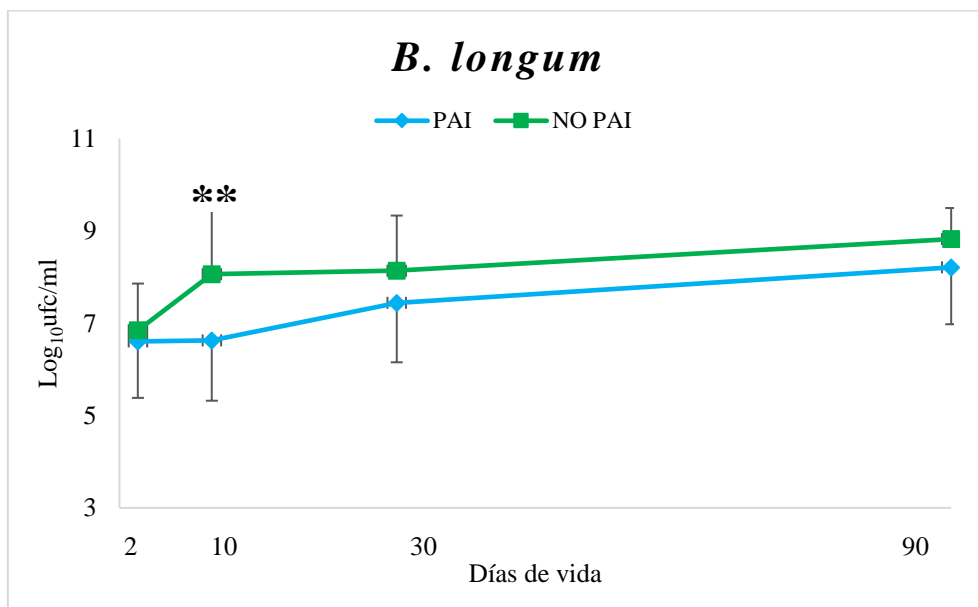
Por otro lado, se analizó el **efecto de la administración de PAI en los niveles de bifidobacterias en cada punto de muestreo**. El análisis estadístico aplicado en este caso (test U de Mann-Whitney) mostró diferencias significativas entre los niños cuyas madres habían sido tratadas con PAI y niños cuyas madres no habían sido tratadas, a los 10 días de vida en *B. bifidum* ( $p < 0,05$ ) y *B. longum* ( $p < 0,01$ ). A pesar de que solo los niveles de estas dos especies mostraron diferencias significativas a los 10 días de vida, en la representación gráfica (Figuras 10 –16) pueden apreciarse diferentes concentraciones y tendencias en la mayoría de las especies de bifidobacterias analizadas en el grupo de niños PAI respecto a los niños cuyas madres no fueron tratadas.

En la Figura 10 se muestran los resultados de *B. bifidum*. La concentración de esta especie en la microbiota de los niños cuyas madres fueron tratadas mediante PAI fue significativamente menor a los 10 días de vida ( $p < 0.05$ ), con respecto a la concentración presente en los niños cuyas madres no recibieron dicho tratamiento.



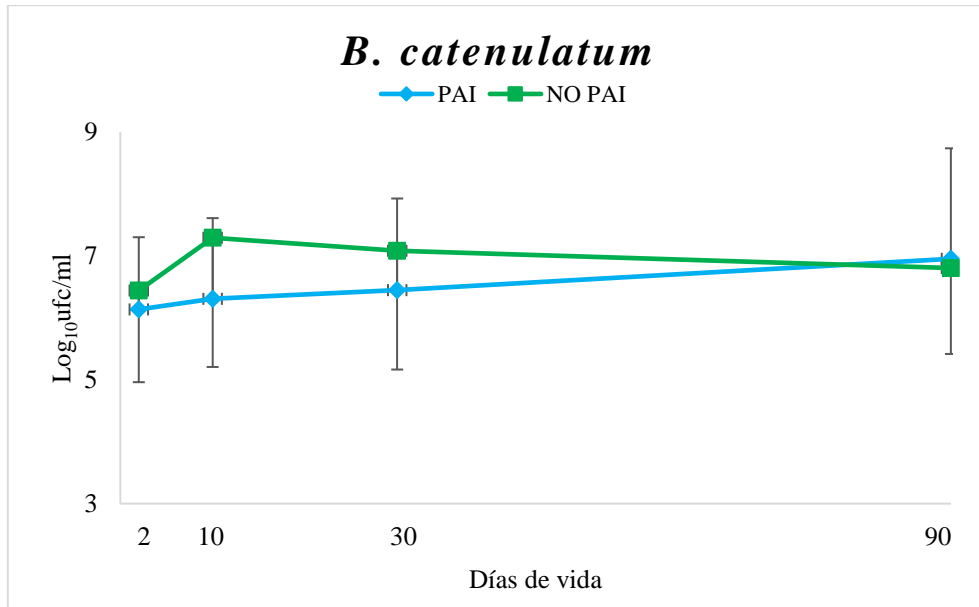
**Figura 10.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. bifidum* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}$ ufc/ml) y en el eje de abscisas se muestran los días de vida. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. El asterisco muestra una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en ese punto entre los dos grupos de niños del estudio.

*B. longum* (Figura 11) sigue una tendencia similar a la especie anterior, los bebés cuyas madres recibieron PAI presentaban menores niveles de esta especie en todos los tiempos estudiados, siendo significativamente menor ( $p < 0.01$ ) a los 10 días de vida.

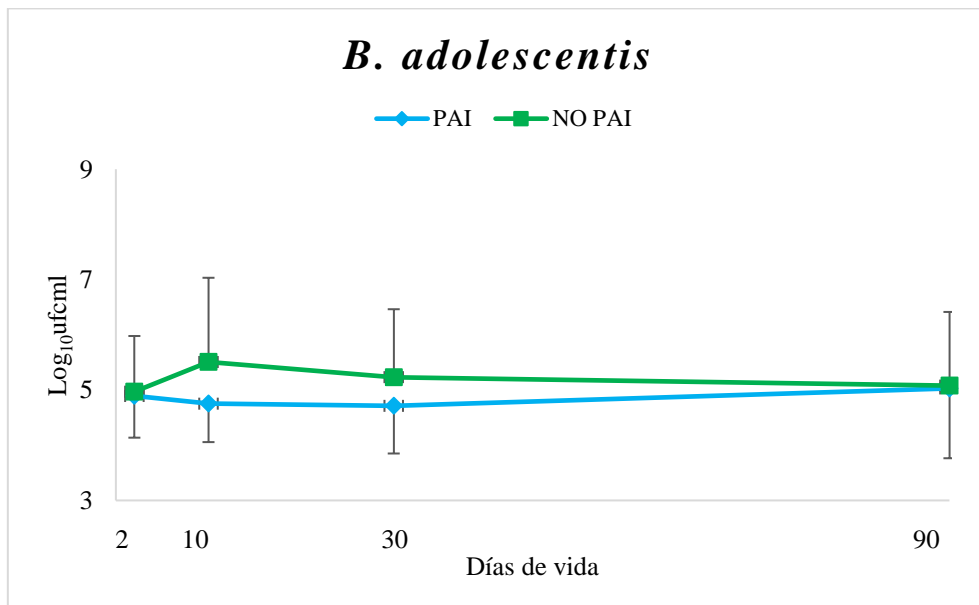


**Figura 11.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. longum* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}$ ufc/ml) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí. Los asteriscos muestran una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) a los 10 días entre los dos grupos de niños del estudio.

En cuanto a *B. catenulatum* y *B. adolescentis*, podemos observar en sus gráficas correspondientes (Figura 12 y Figura 13), como a los 10 y 30 días de vida las concentraciones de estas especies son también menores en los niños cuyas madres recibieron PAI; hecho que con el tiempo se ve atenuado.

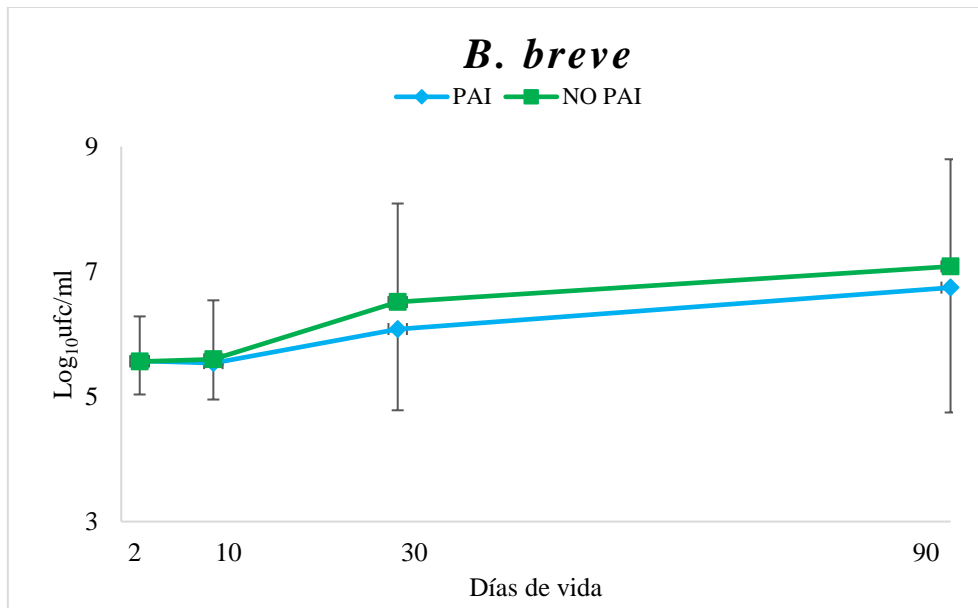


**Figura 12.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. catenulatum* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración (log<sub>10</sub>ufc/ml) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí.



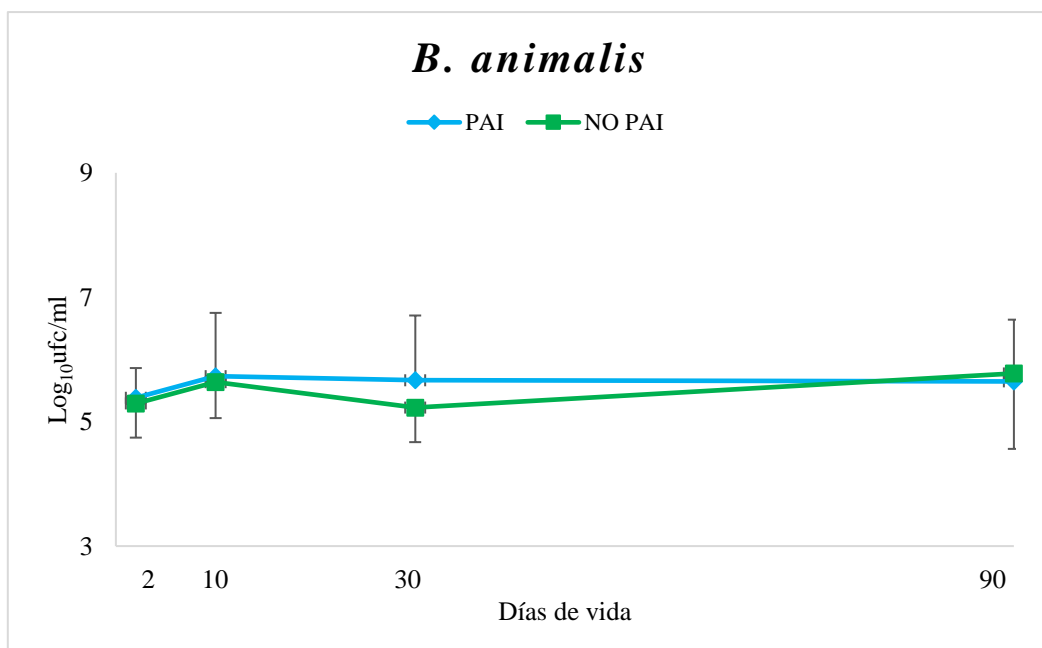
**Figura 13.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. adolescentis* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración (log<sub>10</sub>ufc/ml) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí.

*B. breve*, aunque en menor medida, también muestra niveles medios menores en los niños cuyas madres recibieron PAI, en este caso a partir de los 30 días de vida (Figura 14).



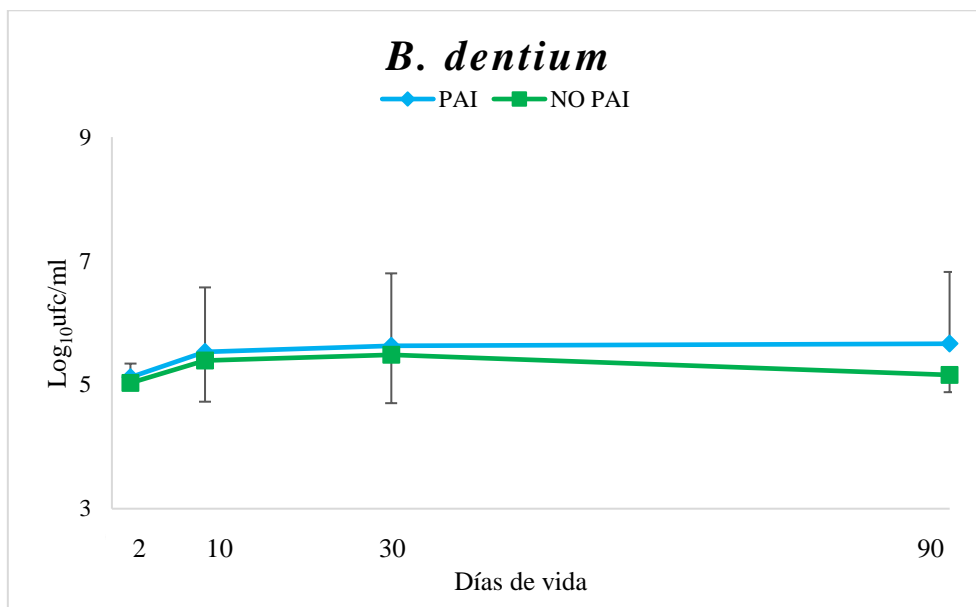
**Figura 14.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. breve* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración (log<sub>10</sub>ufc/ml) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí.

En el resto de las especies (*B. animalis*- Figura 15 y *B. dentium*- Figura 16) las diferencias entre los casos estudiados fueron mínimas, ya que muchas muestras rondaban los límites de detección establecidos. *B. dentium* muestra una tendencia de mayor concentración en los niños cuyas madres han sido expuestas al antibiótico.





**Figura 15.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. animalis* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}$ ufc/ml) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí.



**Figura 16.** Efectos de la PAI en la concentración de *B. dentium* a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. En el eje de ordenadas se representa la concentración ( $\log_{10}$ ufc/ml) y en el eje de abscisas se muestran los días. En verde se representan los resultados de los niños cuyas madres no recibieron PAI y en azul las que sí.

De manera general, las especies de bifidobacterias analizadas mostraron menores concentraciones medias en el grupo de niños cuyas madres han sido tratadas con PAI, exceptuando *B. animalis* y *B. dentium*. Como se ha comentado en este mismo apartado, *B. bifidum* y *B. longum* fueron las especies que mostraron mayores diferencias en sus concentraciones entre el grupo de niños cuyas madres no habían sido tratadas y niños cuyas madres sí habían sido tratadas mediante PAI. Esta diferencia únicamente alcanzó significación estadística a los 10 días de vida, en ambos casos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nogacka y cols., (2017), que, estudiando la misma cohorte, demostró menores niveles de la familia *Bifidobacteriaceae* a los 10 días de vida. Por su parte, el estudio llevado a cabo por Corvaglia y cols., (2016) también mostró, a nivel de género (*Bifidobacterium*), una menor concentración en las muestras procedentes de niños cuyas madres habían sido tratadas mediante PAI, a los 7 días de vida.

A continuación, se determinó la **prevalencia de las especies** de bifidobacterias analizadas, **en función de la administración de PAI** (Tabla 6). Se observa, que *B.*

*longum* es la especie que ha sido detectada en mayor número de muestras en ambos casos (PAI y no PAI). *B. bifidum*, a los 2 y 10 días es más abundante en los niños cuyas madres no recibieron PAI; aunque esta diferencia no se mantiene en el tiempo. Sin embargo, en *B. animalis*, se observó un mayor porcentaje de niños positivos para dicha especie en el grupo “PAI” hasta el mes de vida. *B. catenulatum*, una de las especies mayoritarias también se ve disminuida en el grupo de niños PAI al final del muestreo; al contrario que *B. dentium*, cuya abundancia en el grupo PAI es mayor a los tres meses de vida.

Aunque el análisis chi-cuadrado no mostró significancia en ninguna de estas diferencias.

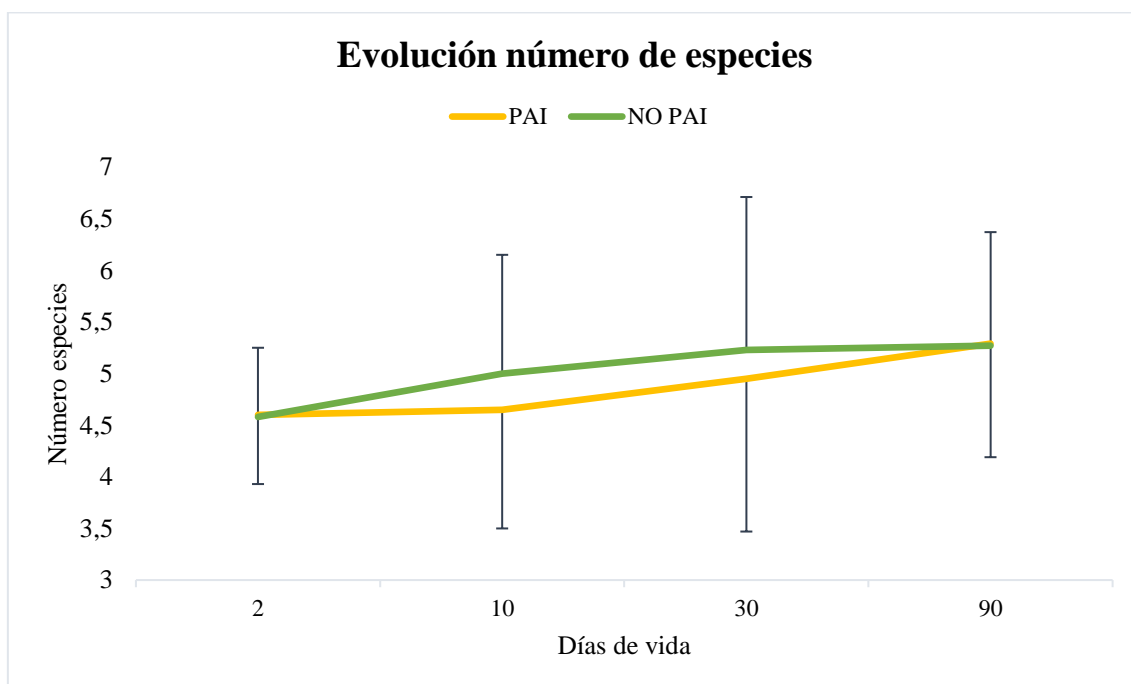
		2d	10d	30d	90d
<i>B. bifidum</i>	PAI	76,00	65,22	<b>95,24</b>	87,50
	NO-PAI	83,33	84,62	84,62	<b>90,91</b>
<i>B. breve</i>	PAI	56,00	34,78	71,43	75,00
	NO-PAI	25,00	23,08	69,23	72,73
<i>B. catenulatum</i>	PAI	64,00	86,96	85,71	75,00
	NO-PAI	66,67	84,62	76,92	<b>90,91</b>
<i>B. dentium</i>	PAI	16,00	34,78	38,10	54,17
	NO-PAI	25,00	46,15	38,46	27,27
<i>B. longum</i>	PAI	<b>96,00</b>	<b>91,30</b>	<b>95,00</b>	<b>100,00</b>
	NO-PAI	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<i>B. animalis</i>	PAI	<b>92,00</b>	<b>95,65</b>	80,00	83,33
	NO-PAI	<b>91,67</b>	<b>92,31</b>	76,92	<b>90,91</b>
<i>B. adolescentis</i>	PAI	60,00	56,52	42,11	54,17
	NO-PAI	66,67	69,23	76,92	54,55
<i>B. angulatum</i>	PAI	0,00	0,00	0,00	0,00
	NO-PAI	0,00	0,00	0,00	0,00

**Tabla 6.** Se muestra la prevalencia de las especies de bifidobacterias estudiadas en función del tiempo (días) y de si la madre fue tratada con PAI o no.

Aloisio y cols., (2014) también analizó estas especies y cómo su presencia en la microbiota de los recién nacidos se veía condicionada por la PAI. *B. breve*, *B. bifidum* y *B. dentium* mostraron una prevalencia menor en los niños italianos cuyas madres habían

sido tratadas. Además, al igual que en nuestro estudio *B. longum* pareció ser la especie menos afectada por este tratamiento antibiótico.

Para finalizar, se analizó la **evolución del número medio de especies de bifidobacterias** que colonizan el intestino de los niños a lo largo del tiempo y en función de la administración de PAI (Figura 17). A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, se puede observar una ligera disminución de especies colonizadora en los niños cuyas madres experimentaron una exposición antibiótica durante el parto.



**Figura 17.** Evolución del número de especies de bifidobacterias a lo largo del tiempo en función de la administración de PAI a las madres de los recién nacidos. Las barras de error representan las desviaciones típicas en cada punto.

El número de especies presentes en los individuos estudiados no ha presentado diferencias significativas a lo largo del tiempo, en ninguno de los dos grupos de estudio. Por el contrario, Nagpal y cols., (2017) observó un aumento del número de especies detectadas de los dos días al mes de vida. Además, también observaron que desde los tres meses a los tres años el número de bifidobacterias detectadas se mantenía, más o menos, estable. Este aumento puede ser debido a que dichos autores no detectaron especies como *B. dentium* o *B. adolescentis* hasta la primera semana de vida, a diferencia de los resultados mostrados en este TFM.

Este trabajo caracteriza el proceso de establecimiento de la microbiota bifidobacteriana (grupo de alta importancia al inicio de la vida) y pone de manifiesto el efecto que la profilaxis antimicrobiana intraparto ejerce específicamente en el establecimiento de la comunidad de bifidobacterias en el intestino de niños sanos nacidos a término.

En este estudio se han cuantificado las ocho especies de bifidobacterias más frecuentes y predominantes en el intestino humano, sin embargo, hemos observado como estas no representan el total del género. Esto abre las puertas a nuevas investigaciones para descubrir y cuantificar nuevas especies del género *Bifidobacterium* presentes desde el inicio de la vida. Este estudio también muestra ciertas limitaciones a comentar, como es la falta de inclusión en el análisis de otros co-factores concomitantes o de confusión, como pueden ser el tipo de parto o la alimentación.

Las etapas más tempranas de la vida representan un periodo de oportunidad para la modulación de la microbiota intestinal hacia un correcto establecimiento y desarrollo. Para ello, es necesario remarcar la necesidad de nuevos estudios, que analicen los diferentes factores que afectan al establecimiento de la misma al inicio de la vida. Esto definiría dianas de actuación para desarrollar estrategias que minimicen o mitiguen los posibles efectos adversos que puedan derivarse sobre la salud de los individuos que nacen bajo condiciones “no idóneas” mediante intervenciones nutricionales.

## CONCLUSIONES

1. Las poblaciones de *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. animalis* y *B. catenulatum*, aumentaron sus niveles durante los primeros meses de vida del neonato.
2. Las especies que presentaron niveles más elevados durante el periodo de estudio fueron *B. longum* y *B. catenulatum*.
3. *B. longum* fue, además, la especie de mayor prevalencia, seguida de *B. animalis*, *B. catenulatum* y *B. bifidum*. La colonización por *B. angulatum* es posterior a los tres meses de vida.
4. La profilaxis antimicrobiana intraparto afectó al establecimiento de las poblaciones de bifidobacterias, viéndose reducida sus concentraciones en la microbiota intestinal de aquellos niños cuyas madres recibieron dicho tratamiento. Se alcanzó significancia estadística a los 10 días de vida en *B. longum* y *B. bifidum*.
5. Se pone de manifiesto que existen especies de bifidobacterias, adicionales a las consideradas tradicionalmente, presentes en la microbiota intestinal de los niños y cuyos niveles aumentan con el paso del tiempo.

## **ABREVIATURAS**

AGCCs: Ácidos grasos de cadena corta

ddNTPs: Nucleótidos didesoxi

dNTPs: Nucleótidos desoxi

DO: Densidad óptica

ECN: Enterocolitis necrotizante

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GALT: Tejido linfoide asociado al intestino

GF: Libre de gérmenes (*germ-free*)

IL-10: Interleucina 10

LPS-A: Lipopolisacárido A

MRS: *Man Rogosa and Sharpe*

NK: *Natural killer*

PAI: Profilaxis antimicrobiana intraparto

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SIgA: Inmunoglobulina A secretora

SII: Síndrome del intestino irritable

TGI: Tracto gastrointestinal

TMID: Técnicas moleculares independientes de cultivo

Ufc: Unidades formadoras de colonia

## BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K., Ganu, R., Petrosino, J. and Versalovic, J. (2014).** “The placenta harbors a unique microbiome.” Science Translational Medicine, 6(237), pp.237-265.
- Aguilera, P., Ruiz-Tachiquín, M., Rocha, M., Chanez-Cardenas, M. and Pineda, B. (2014).** Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. 1st ed. pp.175-201.
- Al-Asmakh, M., Anuar, F., Zadjali, F., Rafter, J. and Pettersson, S. (2012).** “Gut microbial communities modulating brain development and function.” Gut Microbes, 3(4), pp.366-373.
- Aloisio, I., Quagliariello, A., De Fanti, S., Luiselli, D., De Filippo, C., Albanese, D., Corvaglia, L., Faldella, G. and Di Gioia, D. (2016).** “Evaluation of the effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on newborn intestinal microbiota using a sequencing approach targeted to multi hypervariable 16S rDNA regions” Applied Microbiology and Biotechnology, 100(12), pp.5537-5546.
- Aloisio, I., Mazzola, G., Corvaglia, L., Tonti, G., Faldella, G., Biavati, B. and Di Gioia, D. (2014).** “Influence of intrapartum antibiotic prophylaxis against group B Streptococcus on the early newborn gut composition and evaluation of the anti-Streptococcus activity of Bifidobacterium strains.” Applied Microbiology and Biotechnology, 98, pp. 6051–60.
- An, D., Oh, S., Olszak, T., Neves, J., Avci, F., Erturk-Hasdemir, D., Lu, X., Zeissig, S., Blumberg, R. and Kasper, D. (2014).** “Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells.” Cell, 156(1-2), pp.123-133.
- Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Margolles, A., los Reyes-Gavilán, C. and Gueimonde, M. (2011).** “Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates.” FEMS Microbiology Ecology, 79(3), pp.763-772.
- Arboleya, S., Sánchez, B., Milani, C., Duranti, S., Solís, G., Fernández, N., de los Reyes-Gavilán, C., Ventura, M., Margolles, A. and Gueimonde, M. (2015).**

“Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics.” The Journal of Pediatrics, 166(3), pp.538-544.

**Arboleya, S.,** Sánchez, B., Solís, G., Fernández, N., Suárez, M., Hernández-Barranco, A., Milani, C., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C., Ventura, M. and Gueimonde, M. (2016a). “Impact of prematurity and perinatal antibiotics on the developing intestinal microbiota: a functional inference study.” International Journal of Molecular Sciences, 17(5), p.649.

**Arboleya S,** Watkins C, Stanton C and Ross RP. (2016b). “Gut bifidobacteria populations in human health and aging.” Frontiers in Microbiology, 7, pp.1204.

**Backhed, F.,** Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen, K., Dahlgren, J. and Wang, J. (2015). “Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life.” Cell Host & Microbe, 17(5), pp.690-703.

**Bager P,** Wohlfahrt J and Westergaard T (2008). “Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: Meta-analyses.” Clinical & Experimental Allergy, 38:634–642.

**Baquero, F. and** Nombela, C. (2012). “The microbiome as a human organ.” Clinical Microbiology and Infection, 18, pp.2-4.

**Bergstrom, A.,** Skov, T., Bahl, M., Roager, H., Christensen, L., Ejlerskov, K., Molgaard, C., Michaelsen, K. and Licht, T. (2014). “Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of danish infants.” Applied and Environmental Microbiology, 80(9), pp.2889-2900.

**Biedermann, L. and** Rogler, G. (2015). “The intestinal microbiota: its role in health and disease.” European Journal of Pediatrics, 174(2), pp.151-167.

**Carey, JC. and** Klebanoff, MA. (2005). “Is a change in the vaginal flora associated with an increased risk of preterm birth?” American Journal of Obstetrics & Gynecology, 192, pp. 1341–1346.



- Collado, M., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E. and Salminen, S. (2016).** “Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid.” Scientific Reports, 6(1).
- Corvaglia, L., Tonti, G., Martini, S., Aceti, A., Mazzola, G., Aloisio, I., Di Gioia, D. and Faldella, G. (2016).** “Influence of intrapartum antibiotic prophylaxis for group B Streptococcus on gut microbiota in the first month of life.” Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 62(2), pp.304-308.
- Cox, L., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A., Leung, J., Cho, I., Kim, S., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárate Rodríguez, J., Rogers, A., Robine, N., Loke, P. and Blaser, M. (2014).** “Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences.” Cell, 158(4), pp.705-721.
- Dogra, S., Sakwinska, O., Soh, S., Ngom-Bru, C., Brück, W., Berger, B., Brüssow, H., Lee, Y., Yap, F., Chong, Y., Godfrey, K. and Holbrook, J. (2015).** “Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity.” mBio, 6(1), pp.2419-14.
- Domínguez-Bello, M., Costello, E., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. and Knight, R. (2010).** “Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns.” Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(26), pp.11971-11975.
- Donaldson, G., Lee, S. and Mazmanian, S. (2016).** “Gut biogeography of the bacterial microbiota.” Nature Reviews Microbiology, 14(1), pp.20-32.
- EFSA. (2007).** “Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA.” The EFSA Journal. 587, pp. 1-16.
- Erlich, H., Gelfand, D. and Sninsky, J. (1991).** “Recent advances in the polymerase chain reaction.” Science, 252(5013), pp.1643-1651.
- Escherich T. (1989).** “The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant” Reviews of Infectious Diseases., 11, pp. 352-6.

- FAO/WHO.** (2006). "Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation." FAO Food and Nutrition, 85. ISSN 0254-4725.
- Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., Aguilera, M., Khanna, S., Gil, A., Edwards, C. and Doré, J.** (2010). "Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 51(1), pp.77-84.
- Flohr, C., Pascoe, D. and Williams, H.** (2005). "Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true?" British Journal of Dermatology, 152(2), pp.202-216.
- Fouhy, F., Guinane, C., Hussey, S., Wall, R., Ryan, C., Dempsey, E., Murphy, B., Ross, R., Fitzgerald, G., Stanton, C. and Cotter, P.** (2012). "High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with aAmpicillin and gentamicin." Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(11), pp.5811-5820.
- Gensollen, T., Iyer, S., Kasper, D. and Blumberg, R.** (2016). "How colonization by microbiota in early life shapes the immune system." Science, 352(6285), pp.539-544.
- Gillings, M.** (2013). "Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome." Frontiers in Microbiology, 4.
- Gomes, A. and Malcata, F.** (1999). "Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics". Trends in Food Science & Technology, 10(4-5), pp.139-157.
- Gosalbes, M., Vallès, Y., Jiménez-Hernández, N., Balle, C., Riva, P., Miravet-Verde, S., de Vries, L., Llop, S., Agersø, Y., Sørensen, S., Ballester, F. and Francino, M.** (2015). "High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples." Journal of Developmental Origins of Health and Disease, 7(01), pp.35-44.

- Grzeskowiak** L, Collado MC, Mangani C, Maleta K, Laitinen K, Ashorn P, Isolauri E and Salminen S. (2012). “Distinct gut microbiota in southeastern African and northern European infants.” Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 54, pp.812-816.
- Gueimonde**, M., Laitinen, K., Salminen, S. and Isolauri, E. (2007a). “Breast milk: a source of Bifidobacteria for infant gut development and maturation?” Neonatology, 92(1), pp.64-66.
- Gueimonde**, M., Debor, L., Tölkö, S., Jokisalo, E. and Salminen, S. (2007b). “Quantitative assessment of faecal bifidobacterial populations by real-time PCR using lanthanide probes.” Journal of Applied Microbiology, 102, pp. 1116-1122.
- Gueimonde** M, Salminen S and Isolauri E. (2006) “Presence of specific antibiotic (tet) resistance genes in infant faecal microbiota.” FEMS Immunology and Medical Microbiology, 48, pp.21–5.
- Hansen**, C., Nielsen, D., Kverka, M., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H. and Hansen, A. (2012). “Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host.” PLoS ONE, 7(3), p.e34043.
- Holdeman** LV, Good IJ and Moore WEC. (1976). “Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and possible effect of emotional stress.” Applied and Environmental Microbiology, 31, pp. 359–75.
- Hungate**, R. (1969). “A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes.” Methods in Microbiology, 3, pp.117-132.
- Jiménez**, E., Fernández, L., Marín, M., Martín, R., Odriozola, J., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J and Rodríguez, J. (2005). “Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section.” Current Microbiology, 51(4), pp.270-274.
- Kinross**, J., Darzi, A. and Nicholson, J. (2011). “Gut microbiome-host interactions in health and disease.” Genome Medicine, 3(3), p.14.
- Klare**, I., Konstabel, C., Muller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H. and Witte, W. (2005). “Evaluation of new broth media for

microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 71(12), pp.8982-8986.

**Kubista**, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. and Zoric, N. (2006). “The real-time polymerase chain reaction.” Molecular Aspects of Medicine, 27(2-3), pp.95-125.

**Lahtinen**, S., Gueimonde, M., Ouwehand, A., Reinikainen, J. and Salminen, S. (2005). “Probiotic bacteria may become dormant during storage.” Applied and Environmental Microbiology, 71(3), pp.1662-1663.

**Laursen** MF, Zachariassen G, Bahl MI, Bergstrom A, Host A, Michaelsen KF and Licht TR. (2015). “Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood.” BMC Microbiology 15:154.

**Libster**, R., Edwards, K. M., Levent, F., Edwards, M. S., Rench, M. A., Castagnini, L. A., Cooper, T., Sparks, R., Baker, C. and Shah, P. (2012). “Long-term outcomes of group B streptococcal meningitis.” Pediatrics, 130, pp. e8–e15

**Ligon**, B. (2004). “Penicillin: its discovery and early development.” Seminars in Pediatric Infectious Diseases, 15(1), pp.52-57.

**Lin**, A., Autran, C., Szyszka, A., Escajadillo, T., Huang, M., Godula, K., Prudden, A., Boons, G., Lewis, A., Doran, K., Nizet, V. and Bode, L. (2017). “Human milk oligosaccharides inhibit growth of group BStreptococcus.” Journal of Biological Chemistry, 292(27), pp.11243-11249.

**Luczynski**, P., McVey Neufeld, K., Oriach, C., Clarke, G., Dinan, T. and Cryan, J. (2016). “Growing up in a bubble: using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior.” International Journal of Neuropsychopharmacology, 19(8), pp. 1-17.

**Madigan**, M., Martinko, J. and Dunlap, P. (2009). “Brock. 12th ed.” Madrid: Pearson Educación, pp.185-186.

- Maisey**, H. C., Doran, K. S., and Nizet, V. (2008). “Recent advances in understanding the molecular basis of group B streptococcus virulence.” Expert Reviews in Molecular Medicine, 10(27).
- Martin**, C., Ling, P. and Blackburn, G. (2016). “Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula.” Nutrients, 8(5), p.279.
- Martin**, F., Collino, S., Rezzi, S. and Kochhar, S. (2012). “Metabolomic Applications to Decipher Gut Microbial Metabolic Influence in Health and Disease.” Frontiers in Physiology, 3.
- Matamoros**, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G and de La Cochetiere, MF. (2013). “Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health.” Trends in Microbiology, 21, pp. 167-75.
- Matsuki**, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T. and Tanaka, R. (2004). “Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. Applied and Environmental Microbiology, 70(12), pp.7220-7228.
- Milani** C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D and Ventura M. (2017). “The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota.” Microbiology and Molecular Biology Reviews, 81:e00036-17.
- Milani**, C., Lugli, G., Duranti, S., Turrone, F., Bottacini, F., Mangifesta, M., Sanchez, B., Viappiani, A., Mancabelli, L., Taminiau, B., Delcenserie, V., Barrangou, R., Margolles, A., van Sinderen, D. and Ventura, M. (2014). “Genomic Encyclopedia of Type Strains of the Genus *Bifidobacterium*.” Applied and Environmental Microbiology, 80(20), pp.6290-6302.
- Morrison** D.J. and Preston T. (2016) “Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism.” Gut Microbes 7, 189–200.
- Mueller**, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M., Clavel, T., Koebnick, C., Zunft, H., Dore, J.

- and Blaut, M. (2006). "Differences in fecal microbiota in different european study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study." Applied and Environmental Microbiology, 72(2), pp.1027-1033.
- Nagpal**, R., Kurakawa, T., Tsuji, H., Takahashi, T., Kawashima, K., Nagata, S., Nomoto, K. and Yamashiro, Y. (2017). "Evolution of gut Bifidobacterium population in healthy Japanese infants over the first three years of life: a quantitative assessment." Scientific Reports, 7(1).
- Nahum**, G., Uhl, K. and Kennedy, D. (2006). "Antibiotic use in pregnancy and lactation." Obstetrics and Gynecology, 107(5), pp.1120-1138.
- Negele**, K., Heinrich, J., Borte, M., Berg, A., Schaaf, B., Lehmann, I., Wichmann, H. and Bolte, G. (2004). "Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life." Pediatric Allergy and Immunology, 15(1), pp.48-54.
- Newburg**, D. S., Ruiz-Palacios, G. M. and Morrow, A. L. (2005). "Human milk glycans protect infants against enteric pathogens." Annual Review of Nutrition, 25, pp. 37–58.
- Ng**, S., Bernstein, C., Vatn, M., Lakatos, P., Loftus, E., Tysk, C., O'Morain, C., Moum, B. and Colombel, J. (2013). "Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease." Gut, 62(4), pp.630-649.
- Nogacka**, A., Salazar, N., Arboleya, S., Suárez, M., Fernández, N., Solís, G., de los Reyes-Gavilán, C. and Gueimonde, M. (2017a). "Early microbiota, antibiotics and health." Cellular and Molecular Life Sciences, 75(1), pp.83-91.
- Nogacka**, A., Salazar, N., Suárez, M., Milani, C., Arboleya, S., Solís, G., Fernández, N., Alaez, L., Hernández-Barranco, A., de los Reyes-Gavilán, C., Ventura, M. and Gueimonde, M. (2017b). "Impact of intrapartum antimicrobial prophylaxis upon the intestinal microbiota and the prevalence of antibiotic resistance genes in vaginally delivered full-term neonates." Microbiome, 5(1).
- Olszak**, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M., Richter, J., Franke, A., Glickman, J., Siebert, R., Baron, R., Kasper, D. and Blumberg, R. (2012). "Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function." Science, 336(6080), pp.489-493.

- O'Toole, P.** and Claesson, M. (2010). "Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly." International Dairy Journal, 20(4), pp.281-291.
- Penders J,** Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA and Stobberingh EE (2006). "Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy." Pediatrics 118, pp. 511–521.
- Peso Echarri P,** Marínez Graciá C, Ros Berruezo G, Vives I, Ballesta M, Solís G, Vasallo Morillas I, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A and Gueimonde M (2011). "Assessment of intestinal microbiota of full-term breast-fed infants from two different geographical locations." Early Human Development, 87, pp. 511–513.
- Purchiaroni F,** Tortora A, Gabrielli M, Bertucci F, Gigante G, Ianiro G, Ojetti V, Scarpellini E and Gasbarrini A (2013). "The role of intestinal microbiota and the immune system." European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 17, pp. 323-333.
- Rautava, S.,** Luoto, R., Salminen, S., Isolauri, E. (2012). "Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease." Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 9, pp. 565–576.
- Ramos, J.,** Milla, A., López-García, P. and Gutiérrez, F. (2009). "Estudio de colonización por *Streptococcus agalactiae* en gestantes extranjeras y españolas, en Elche y Comarca." Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 27(4), pp.249-251.
- REDVET.** (2009). "PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular." Revista electrónica de veterinaria, 10(2). ISSN: 1695-7504
- Reinhardt, C.,** Reigstad, C. and Bäckhed, F. (2009). "Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 48(3), pp.249-256.
- Rodicio, M.R** and Mendoza, M.C. (2004). "Identificación bacteriana mediante secuenciación delARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones enmicrobiología clínica." Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22(4), pp. 238-45

- Russell, S., Gold, M., Hartmann, M., Willing, B., Thorson, L., Wlodarska, M., Gill, N., Blanchet, M., Mohn, W., McNagny, K. and Finlay, B. (2012).** “Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma.” EMBO reports, 13(5), pp.440-447.
- Russell, N., Seale, A., O’Sullivan, C., Le Doare, K., Heath, P., Lawn, J., Bartlett, L., Cutland, C., Gravett, M., Ip, M., Madhi, S., Rubens, C., Saha, S., Schrag, S., Sobanjo-ter Meulen, A., Vekemans, J. and Baker, C. (2017).** “Risk of early-onset neonatal group B streptococcal disease with maternal colonization worldwide: systematic review and meta-analyses.” Clinical Infectious Diseases, 65(2), pp.152-159.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. (1977).** “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.” Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(12), pp.5463-5467.
- Salazar, N., Valdés-Varela, L., González, S., Gueimonde, M and de los Reyes-Gavilán, C. (2017).** “Nutrition and the gut microbiome in the elderly.” Gut Microbes, 8(2), pp.82-97.
- Soto, A., Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J. and Fernández, L. (2014).** “Lactobacilli and Bifidobacteria in human breast milk.” Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 59(1), pp.78-88.
- Stokholm, J., Schjørring, S., Eskildsen, C., Pedersen, L., Bischoff, A., Følsgaard, N., Carson, C., Chawes, B., Bønnelykke, K., Mølgaard, A., Jacobsson, B., Krogfelt, K. and Bisgaard, H. (2014).** “Antibiotic use during pregnancy alters the commensal vaginal microbiota.” Clinical Microbiology and Infection, 20(7), pp.629-635.
- Stoll, B., Hansen, N., Sanchez, P., Faix, R., Poindexter, B., Van Meurs, K., Bizzarro, M., Goldberg, R., Frantz, I., Hale, E., Shankaran, S., Kennedy, K., Carlo, W., Watterberg, K., Bell, E., Walsh, M., Schibler, K., Laptook, A., Shane, A., Schrag, S., Das, A. and Higgins, R. (2011).** “Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues.” Pediatrics, 127(5), pp.817-826.
- Thiemann, S., Smit, N. and Strowig, T. (2016).** “Antibiotics and the intestinal microbiome: individual responses, resilience of the ecosystem, and the



- susceptibility to infections.” Current Topics in Microbiology and Immunology, pp.123-146.
- Thursby**, E. and Juge, N. (2017). “Introduction to the human gut microbiota.” Biochemical Journal, 474(11), pp.1823-1836.
- Tojo R**, Suárez A, Clemente M, de los Reyes-Gavilán C, Margolles A, Gueimonde M, and Ruas-Madiedo, P. (2014). “Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis.” World Journal of Gastroenterology, 20(41), p.15163.
- Turroni F**, Marchesi JR, Foroni E, Gueimonde M, Shanahan F, Margolles A, van Sinderen D and Ventura M. (2009). “Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut.” ISME J, 3: 745-751
- Turroni F**, Peano C, Pass D, Foroni E, Severgnini M, Claesson M, Kerr C., Hourihane J., Murray D., Fuligni F., Gueimonde M., Margolles A., De Bellis G., O’Toole P, van Sinderen D., Marchesi J. and Ventura M. (2012). “Diversity of Bifidobacteria within the infant gut microbiota.” PLoS ONE, 7(5), p.e36957.
- Valdés-Varela**, L., Hernández-Barranco, A., Ruas-Madiedo, P. and Gueimonde, M. (2016). “Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* growth and toxicity when co-cultured in different prebiotic substrates.” Frontiers in Microbiology, 7.
- Verani J.R**, McGee L and Schrag SJ. (2010). “Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC.” MMWR. Recommendations and Reports,59, pp.1–36.
- Walter**, J. and Ley, R. (2011). “The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. Annual Review of Microbiology, 65(1), pp.411-429.
- Weizman Z**, Asli G and Alsheikh A. (2005). “Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents.” Pediatrics, 115, pp. 5-9.
- Wilson KH** and Blichington RB. (1996). “Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis.” Applied and Environmental Microbiology, 62: 2273–8.

- Xiao, L., van't Land, B., Engen, P., Naqib, A., Green, S., Nato, A., Leusink-Muis, T., Garssen, J., Keshavarzian, A., Stahl, B. and Folkerts, G. (2018).** “Human milk oligosaccharides protect against the development of autoimmune diabetes in NOD-mice.” Scientific Reports, 8(1).
- Yatsunenko, T., Rey, F., Manary, M., Trehan, I., Dominguez-Bello, M., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R., Anokhin, A., Heath, A., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J., Lozupone, C., Lauber, C., Clemente, J., Knights, D., Knight, R. and Gordon, J. (2012).** “Human gut microbiome viewed across age and geography.” Nature, 7402(486), pp. 222-227.
- Zeissig, S and Blumberg, RS. (2014).** “Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease.” Nature Immunology, 15, pp. 307-10.
- Zhu, G., Ma, F., Wang, G., Wang, Y., Zhao, J., Zhang, H. and Chen, W. (2018).** “Bifidobacteria attenuate the development of metabolic disorders, with inter- and intra-species differences.” Food & Function, 9(6), pp.3509-3522.

## APÉNDICES

### Apéndice I

Evolución de la concentración media ( $\log_{10}$ ufc/ml) de las especies de bifidobacterias estudiadas y del género *Bifidobacterium*, a lo largo del tiempo.

