



Probióticos: del laboratorio al consumidor

J. M. Rodríguez

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid. España.

Resumen

Introducción: En los últimos años, el campo de los probióticos ha experimentado un gran auge. Sin embargo, de los miles de cepas aisladas cada año por su potencial probiótico en los laboratorios de todo el mundo, muy pocas pasan a una fase de desarrollo industrial y menos aún son las que consiguen una vida comercial.

Objetivo: En este artículo, se revisan los principales aspectos que se deben tener en cuenta en el, habitualmente, largo y tortuoso camino que debe seguir una cepa desde su aislamiento inicial hasta su comercialización.

Resultados y conclusiones: Cualquier microorganismo probiótico debe estar correctamente identificado a nivel de especie y cepa. La secuencia del genoma es la mejor identificación posible, además de proporcionar información muy valiosa sobre su seguridad, funcionalidad y propiedades de interés tecnológico. Los casos en los que se ha podido establecer una relación entre un probiótico y un efecto adverso son muy escasos y han afectado a personas con patologías subyacentes. Globalmente, aunque las distintas pruebas *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales proporcionan información útil durante el proceso de selección de cepas, los únicos datos que permiten evaluar la seguridad y eficacia de un probiótico de una forma directa son los que se obtienen en el curso de ensayos clínicos correctamente diseñados y dirigidos específicamente a la población diana. Por otra parte, las empresas que comercializan probióticos tienen la necesidad de obtener una biomasa muy elevada de forma económicamente rentable y de que la concentración de bacterias viables necesaria para ejercer el efecto beneficioso se mantenga hasta el final de la vida útil del producto. Finalmente, los aspectos comerciales son determinantes en la decisión de afrontar el desarrollo industrial y la puesta en el mercado de un probiótico.

(Nutr Hosp 2015;31(Supl. 1):33-47)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8705

Palabras clave: *Probióticos. Identificación. Seguridad. Funcionalidad. Desarrollo industrial.*

PROBIOTICS: FROM THE LAB TO THE CONSUMER

Abstract

Introduction: In the last years, the field of probiotics has grown notably. However, out of the thousands of strains isolated each year in the labs around the world, very few enter in a phase of industrial development and even a lower number go to the market.

Objective: In this article, the main aspects that have to be taken into account in the, usually, long and winding road that a strain must follow from isolation to the market are reviewed

Results and conclusions: A probiotic microorganism has to be correctly identified at the species and strain levels. The genome sequence is the gold identification standard and provides valuable information on the safety, functionality and technological properties of a strain. The cases in which a link between a probiotic and an adverse effect has been established are scarce and have involved people with underlying pathologies. There is a wide variety of *in vitro*, *ex vivo* and animal model assays for the screening of probiotics, which provide useful information throughout the selection process; however, correctly designed clinical trials are the only way to obtain direct results on the safety and efficacy of a probiotic to the target population. Probiotic companies have the need to obtain a very high bacterial biomass in an economically viable manner while preserving the concentration of live bacteria required for exerting the expected beneficial effect until the end of the probiotic's shelf life. Finally, commercial aspects play a key role in the decision of starting an industrial development and, eventually, to place a probiotic in the market.

(Nutr Hosp 2015;31(Supl. 1):33-47)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8705

Key words: *Probiotics. Identification. Safety. Functionality. Industrial development.*

Introducción

En los últimos años, el campo de los probióticos ha experimentado un gran auge, lográndose avances científicos y clínicos que han permitido el desarrollo y comercialización de diversos productos debidamente contrastados. Paralelamente, también ha aumentado la demanda de probióticos por parte de unos consumidores cada vez más conscientes de la estrecha relación entre nuestra microbiota y la salud. Desafortu-

Correspondencia: Juan M. Rodríguez.
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Avda. Puerta de Hierro, s/n.
Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.
E-Mail: jmrodrig@vet.ucm.es

nadamente, algunas compañías han aprovechado esta coyuntura para aplicar el término “probiótico” a productos que no encajan en este concepto y/o cuyos presuntos beneficios carecen de cualquier base científica. Este mal uso, intencionado o no, se ha visto favorecido por la ausencia, hasta principios del siglo XXI, de un consenso internacional sobre la metodología para evaluar la eficacia y seguridad de estos productos.

En 2001, una comisión de expertos convocados de forma conjunta por la FAO y la OMS reconoció la necesidad de establecer directrices para la evaluación de la eficacia y seguridad de los probióticos¹. La comisión propuso una definición de probiótico que, desde entonces, ha sido la más ampliamente aceptada en todo el mundo: “*microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador*”. En 2002, y recogiendo el guante de la comisión, un grupo de trabajo mixto de la FAO y la OMS elaboró unas directrices con los requerimientos mínimos necesarios para que a un producto se le pudiera otorgar el apelativo de probiótico (Fig. 1)². Los documentos derivados del trabajo de ambas comisiones, junto con las actualizaciones recogidas en los consensos de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP)³ y de la *Internacional Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP)⁴ son referencias clave para saber qué se entiende por probiótico en la actualidad y constituyen la base de este artículo.

El proceso que va desde la selección inicial de cepas hasta la comercialización de un probiótico eficaz para una diana específica no resulta sencillo (Fig. 2). Tiene que contemplar diversos aspectos (científicos, clínicos, tecnológicos, normativos, económicos, comunicativos...) que, aunque en ocasiones no son fáciles de conjugar, pueden y deben ser compatibles entre sí. Recientemente, se ha empleado el término “*marco probiótico*” para hacer referencia a todos los sectores implicados en que el conocimiento existente sobre los probióticos se traduzca en productos que supongan un beneficio para la Sociedad (Fig. 3)⁴.

De los miles de cepas aisladas cada año por su presunto potencial probiótico en los laboratorios de todo el mundo, muy pocas pasan a una fase de desarrollo industrial y muchas menos aún son las que consiguen un hueco en los estantes de una farmacia, parafarmacia o establecimiento alimentario. En este artículo, se revisarán los principales aspectos que se deben tener en cuenta en el camino que debe seguir una cepa desde su aislamiento inicial hasta su comercialización.

Identificación de los microorganismos probióticos

La identificación de un aislado a nivel de especie y cepa es un requisito esencial para cualquier aislado que se pretenda comercializar. La asignación de un aislado a una especie u otra no es banal ya que la evaluación

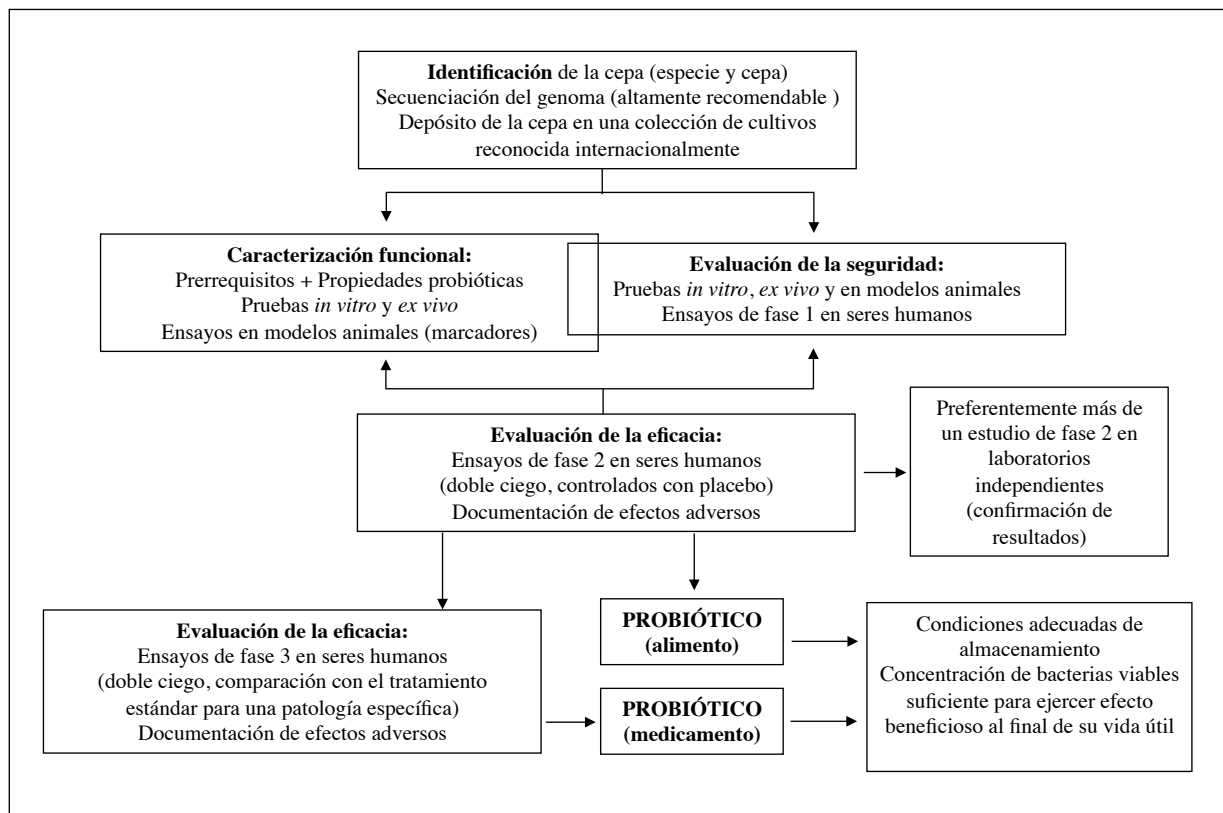


Fig. 1.—Directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos².

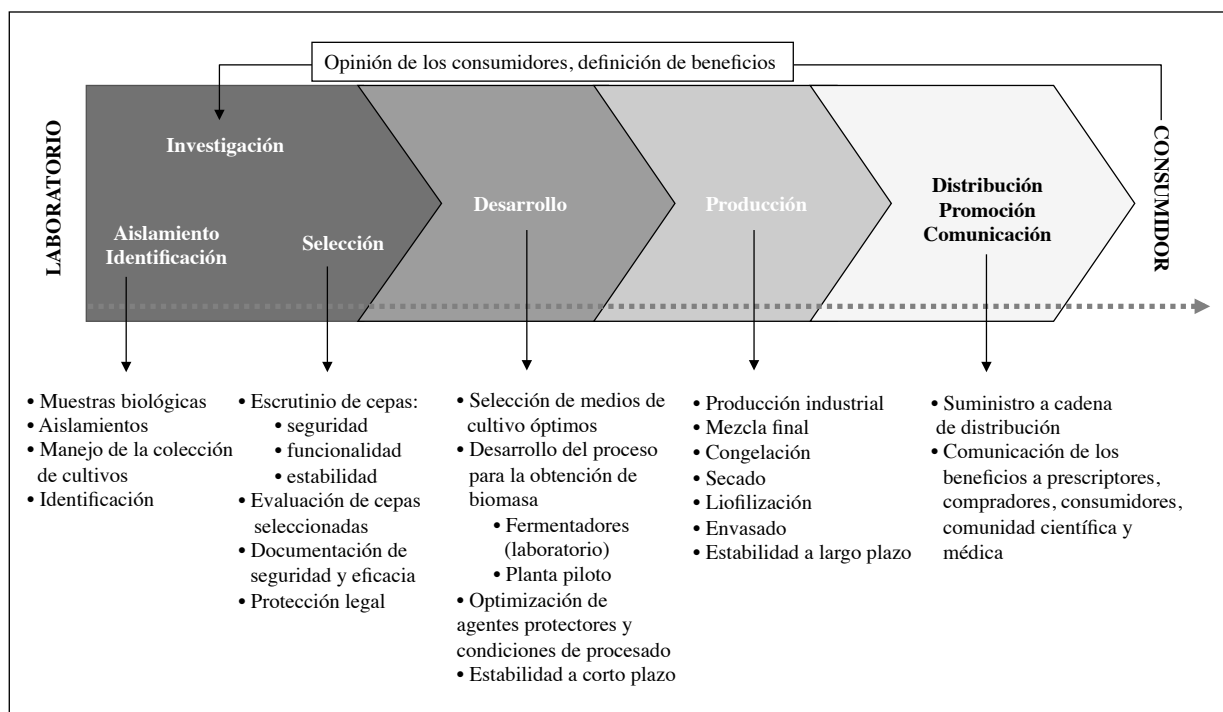


Fig. 2.—Etapas básicas desde el aislamiento inicial hasta la comercialización de un probiótico.

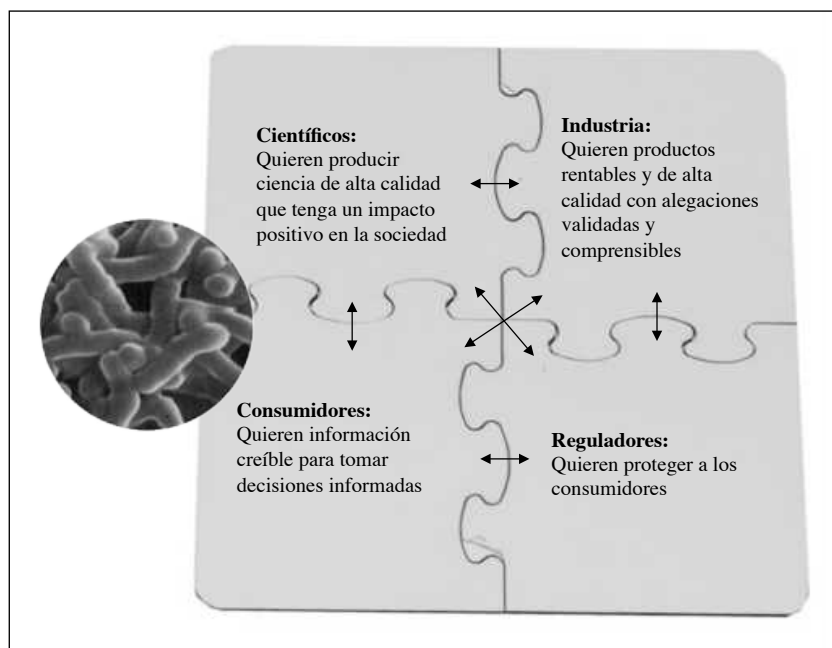


Fig. 3.—Relaciones entre los sectores implicados en el campo de los probióticos⁴.

del riesgo ante la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es mucho más sencilla para aquellas que, sobre la base de una historia de uso seguro, gozan de presunción cualificada de seguridad (QPS; del inglés, *Qualified Presumption of Safety*)⁵. La lista QPS se revisa anualmente, incorporando nuevas unidades taxonómicas si los datos disponibles así lo avalan. En consecuencia, es probable que en el futuro se incluyan géneros y especies (*Roseburia* spp., *Faecalibacterium*

prausnitzii...) que no se han empleado hasta la fecha como probióticos pero a las que los estudios sobre el microbioma humano están vinculando con claros efectos beneficiosos para la salud.

Como cualquier otra disciplina, la taxonomía de bacterias y levaduras está en constante evolución y la determinación de especie debe realizarse (y, eventualmente, reevaluarse) con la metodología más válida en cada momento. Aunque las pruebas fenotípicas

(fermentación de carbohidratos, actividades enzimáticas...) fueron muy útiles cuando no existían otros métodos alternativos, actualmente no son válidas para la identificación de especies ya que su capacidad de resolución es claramente insuficiente; de hecho, la herencia del uso de métodos de identificación inadecuados es la principal causa de mal etiquetado de productos probióticos⁶.

Las pruebas fenotípicas se fueron reemplazando, a partir de la última década del siglo pasado, por diversas técnicas moleculares, basadas en la detección de huellas genéticas (*fingerprinting*) o en la secuenciación de diversos genes. Entre ellas, la secuenciación parcial o completa del gen 16S rRNA se ha convertido, prácticamente, en el método estándar de identificación. Sin embargo, este abordaje posee algunos inconvenientes, como la existencia de secuencias no contrastadas en las bases de datos (EMBL/GenBank/DDBJ) o su incapacidad para discriminar entre subespecies estrechamente relacionadas, dentro de grupos muy exitosos evolutivamente como *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus paracasei*. En este sentido, el uso de genes esenciales para el metabolismo celular (*housekeeping*), como *pheS*, *rpoA*, *atpD*, *tuf*, *groEL* o *recA*, o su combinación con el gen 16S rRNA ofrece una mayor capacidad discriminatoria. En cualquier caso, es inaceptable prolongar el uso de nomenclatura obsoleta o confusa en las etiquetas de los productos, a pesar de que existen ejemplos en este sentido en el mercado probiótico actual (*Lactobacillus bifidus* en vez de *Bifidobacterium bifidum*; *Lactobacillus sporogenes* en lugar de *Bacillus coagulans*). Curiosamente, algunas de las empresas que comercializan productos mal etiquetados están certificadas frente a la norma de calidad ISO9000 para la que cualquier producto mal identificado debe ser considerado como no conforme.

La identificación de un aislado a nivel de cepa es igualmente relevante porque posibilita su trazabilidad en pruebas de laboratorio, ensayos clínicos, estudios epidemiológicos (incluyendo su posible implicación en efectos adversos) y durante todo el proceso de producción y comercialización. También es deseable si existen efectos beneficiosos específicamente asociados a esa cepa. En muchos documentos, incluyendo el consenso de la SEPyP,³ se considera que los efectos saludables demostrados para una cepa microbiana específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas de la misma especie; sin embargo, se trata de un aspecto que se debería revisar ya que algunos efectos (y los mecanismos que los sustentan) están ampliamente distribuidos entre especies pertenecientes a distintos géneros (producción de ácidos orgánicos, exclusión competitiva de patógenos...), otros son frecuentes entre las distintas cepas de una misma especie y, finalmente, otros son más raros (efectos neurológicos o endocrinológicos...) y sólo se pueden asociar a unas pocas cepas dentro de una especie determinada⁴.

A pesar de la disponibilidad de diversas técnicas de genotipado, la electroforesis en gel de campo pulsado

(PFGE) sigue siendo considerada de elección para diferenciar cepas, sin olvidar que la presencia de plásmidos y otros elementos extracromosómicos puede estar asociada a propiedades que la diferencien frente a otras de la misma especie. La secuencia del genoma completo (incluyendo dichos elementos extracromosómicos) es la mejor información posible para la identificación de una especie/cepa, además de proporcionar información muy valiosa sobre su seguridad, funcionalidad y propiedades de interés tecnológico (utilización preferencial de sustratos, resistencia a condiciones ambientales, presencia de fagos...). Actualmente, la genómica funcional ya facilita la selección de cepas para aplicaciones concretas.⁷ El abaratamiento de los costes de secuenciación hace que sea económicamente accesible para las empresas y en el futuro se convertirá, con toda seguridad, en un requisito para cualquier cepa que se quiera comercializar.

Por otra parte, es habitual que la empresa interesada en una cepa la quiera proteger mediante una patente que cubra sus posibles aplicaciones. Para ello, tendrá que depositar la cepa en una colección de referencia como, por ejemplo, la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), bajo las condiciones del Tratado de Budapest. En este caso, la capacidad para diferenciar la cepa es una herramienta útil para detectar un posible uso ilegal por parte de terceros.

Seguridad de la cepa

Consideraciones generales

Los microorganismos utilizados como probióticos incluyen a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y, especialmente, a bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque algunas formulaciones pueden incluir algunas cepas de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Escherichia*. El uso preferencial de lactobacilos y bifidobacterias se debe, por una parte, a que se les considera avirulentos y, de hecho, muchas especies gozan del estatus GRAS (*Generally Recognized as Safe*) de la FDA estadounidense y QPS de la EFSA; por otra, a que son los organismos que más se han empleado en las pruebas de aptitud probiótica y, en consecuencia, sus propiedades beneficiosas están más contrastadas.

Ahora bien, los organismos probióticos se emplean en un abanico muy amplio de situaciones, que incluye individuos sanos, personas sanas pero en una situación especial (bebés, mujeres embarazadas o lactantes, ancianos...) y otras con patologías de distintos tipos y severidades. En consecuencia, la evaluación de la seguridad debe tener en cuenta, entre otros factores, el microorganismo en cuestión, la forma de administración, el nivel de exposición, el estado de salud del hospedador y las funciones fisiológicas que pueden desempeñar en el mismo⁸.

Los casos en los que se ha podido establecer una relación entre el consumo de un probiótico y un efecto adverso son extremadamente escasos y han afectado a personas con enfermedades graves subyacentes y/o con la barrera intestinal muy alterada. Esta bajísima incidencia es especialmente destacable teniendo en cuenta el amplio uso de este tipo de productos^{9,10}. Por ejemplo, el riesgo de infección por *Lactobacillus* es de aproximadamente un caso por cada 10 millones de personas¹¹⁻¹³. Las especies más implicadas son *Lactobacillus rhamnosus*^{14,15} (generalmente en niños prematuros con síndrome de intestino corto), *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*¹⁶ (en pacientes con vías centrales) y *Bacillus subtilis*^{17,18}. Incluso en los raros casos en las que se presentan, se trata de infecciones reversibles y que responden bien al tratamiento antibiótico o antifúngico.

En teoría, los probióticos podrían producir cinco tipos de efectos adversos: 1) infectividad o patogenicidad; 2) producción de metabolitos no deseables; 3) posibilidad de transmisión de genes que confieran resistencia a antibióticos; 4) excesiva inmunostimulación o inmunodepresión en individuos sensibilizados; y 5) efectos negativos asociados a los excipientes.

Patogenicidad

Hasta la fecha, no se ha hallado ningún gen inequívocamente relacionado con patogenicidad en los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, incluyendo los aislados asociados con sepsis u otros efectos adversos¹⁹. Los factores que se han propuesto para explicar su implicación en tales casos son precisamente los que, como veremos posteriormente, se consideran propiedades deseables en un organismo probiótico. Por ejemplo, su adherencia a las células del hospedador y la resistencia a los mecanismos de defensa innatos pueden facilitar su translocación patológica al medio interno y una proliferación indiscriminada en pacientes muy quebrantados, que puede acabar en una bacteriemia, un absceso hepático o una endocarditis. Pero sin embargo, la adherencia a las células del epitelio propicia la colonización de las mucosas con la consiguiente exclusión de patógenos, el fortalecimiento de la barrera intestinal y la mejora de las interacciones neuro-inmunológicas²⁰. Igualmente, la resistencia a los sistemas innatos de defensa puede promover su persistencia en las mucosas y permitir una translocación “controlada”, que es un proceso fisiológico selectivo y altamente regulado que sucede continuamente en individuos sanos, implicando una tasa baja de translocación que resulta ser importante para la homeostasis orgánica^{21,22}.

En contraste con lactobacilos y bifidobacterias, los enterococos pueden presentar numerosos factores de virulencia (hemolisina, gelatinasa, DNasa...) ^{23,24} por lo que no se han podido incluir en el listado QPS. A algunas especies del género *Bacillus* se les ha otorgado la consideración QPS (*B. coagulans*, *B. pumilus*,

B. subtilis), aunque su utilización en alimentación/probiosis viene condicionada por la demostración de que la cepa no presenta actividad toxinogénica (ausencia de genes *Hbl* y *Nhe* y de citotoxicidad)²⁵.

Producción de metabolitos indeseables

En la literatura antigua se postulaba que el isómero D(-) del ácido láctico podría provocar acidosis en la población infantil. Sin embargo, muchas de las especies autóctonas del tracto gastrointestinal humano, como *Lactobacillus reuteri*, lo generan. También es el isómero más abundante en el yogur debido a la actividad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. De hecho, los ensayos clínicos en los que se han administrado cepas probióticas productoras de D-lactato a niños a término y prematuros han revelado que no se produce ningún signo de acidosis, incluso tras su administración diaria durante los primeros 12 meses de vida²⁶⁻²⁸.

En este sentido, la acidosis sólo se presenta cuando coinciden las siguientes circunstancias: (a) síndrome de intestino corto; (b) consumo de glúcidos en grandes cantidades; (c) malabsorción de los mismos; (d) aumento de la concentración de bacterias productoras de D-lactato (pertenecientes a la propia microbiota del paciente); (e) motilidad colónica disminuida; y (f) alteración en el metabolismo del ácido D-láctico^{29,30}. Por ello, la administración una cepa productora de ácido D-láctico en pacientes de riesgo (cirugía intestinal, síndrome de intestino corto...) debe ser cuidadosamente vigilada si no está avalada por datos de seguridad en relación a este aspecto específico.

Las aminas biógenas (AB) se generan por descarboxilación de los aminoácidos y ejercen funciones fisiológicas esenciales como neurotransmisores y mediadores de la respuesta inmune. Sin embargo, determinados microorganismos (especialmente enterococos) pueden dar lugar a concentraciones muy altas de algunas AB (histamina, tiramina...) las cuales pueden inducir trastornos digestivos, circulatorios y respiratorios, especialmente en personas con niveles bajos de monoamino oxidasa o/y diamino oxidasa, que son las enzimas responsables de su degradación. Por este motivo, la incapacidad de sintetizar AB debe estar incluida en los criterios de selección de los cultivos iniciadores y también de aquellos probióticos que se vayan a vehicular a través de alimentos donde se puedan dar las condiciones para su formación.

Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos puede ser intrínseca y adquirida. En el primer caso, todas las cepas de una determinada especie son resistentes y la causa es, habitualmente, la falta de la estructura diana (ausencia del dímero D-ala-D-ala en los precursores de la pared de

los lactobacilos, que media la resistencia a glicopéptidos) o la impermeabilidad al antimicrobiano (caso de la resistencia de las bacterias Gram negativas frente a la penicilina G). Por tanto, la resistencia intrínseca no es transmisible y no constituye un motivo de especial preocupación. La resistencia adquirida la presentan determinadas cepas de una especie y es debida, en general, a la adquisición de genes que codifican enzimas que promueven la exportación del antibiótico o su alteración, de manera que ya no sea capaz de reconocer su estructura diana. Los genes responsables están, por tanto, localizados en elementos transmisibles (plásmidos, transposones e islas de patogenicidad) por lo que las cepas que los poseen no son aptas para su uso como organismos probióticos. Por eso es esencial determinar el patrón de susceptibilidad antibiótica de los organismos candidatos (Fig. 4)³¹. Actualmente se considera que se debe realizar de acuerdo a procedimientos aceptados internacionalmente como, por ejemplo, la versión más actualizada de la guía del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) o la norma ISO 10932:2010 (IDF 223:2010) o los criterios propuestos por Klare et al^{32,33}. La secuenciación de los genomas también es muy útil para determinar si existen determinantes de resistencia en el acervo génico de un organismo candidato a probiótico.

Efectos negativos sobre el sistema inmunitario

La evaluación de la seguridad de los probióticos también debe contemplar su impacto en hospedadores

inmunológicamente inmaduros o inmunocomprometidos. Todos los microorganismos, tanto autóctonos como alógenos (<http://www.sepyp.es/es/wiki>), ejercen un impacto sobre sistema inmunológico. La microbiota autóctona o de ocupación es crucial para el desarrollo y mantenimiento de la fisiología y homeostasis de las mucosas y epitelios que habitan, los cuales actúan como barrera y órgano de comunicación entre el medio ambiente luminal y el medio interno del anfitrión³⁴. Un fracaso en esta interacción puede contribuir al desarrollo de patologías inflamatorias, metabólicas o infecciosas.

Todavía no conocemos bien los mecanismos por los que los microorganismos ejercen su acción sobre el sistema inmune, lo cual es un inconveniente para poder predecir la seguridad inmunológica de una intervención probiótica. El que un probiótico ejerza efectos inmunoestimulantes o inmunosupresores, que según las circunstancias pueden ser protectores o nocivos, depende de las interacciones entre las señales microbianas, la base genética del hospedador y las condiciones ambientales. Diversos estudios han mostrado que ciertas bacterias probióticas estimulan la proliferación y actividad de las células inmunitarias, aumentando la eficacia de la respuesta frente a patógenos. En contraste, otros probióticos son eficaces frente a la inflamación crónica y las alergias mediante la supresión de células efectoras y la inducción de mecanismos de tolerancia^{35,36}. El conocimiento de las relaciones entre la estructura (genotipo, fenotipo) y las funciones de los probióticos en las poblaciones diana limitará el riesgo de inducir efectos inmunológicos adversos en el hospedador.

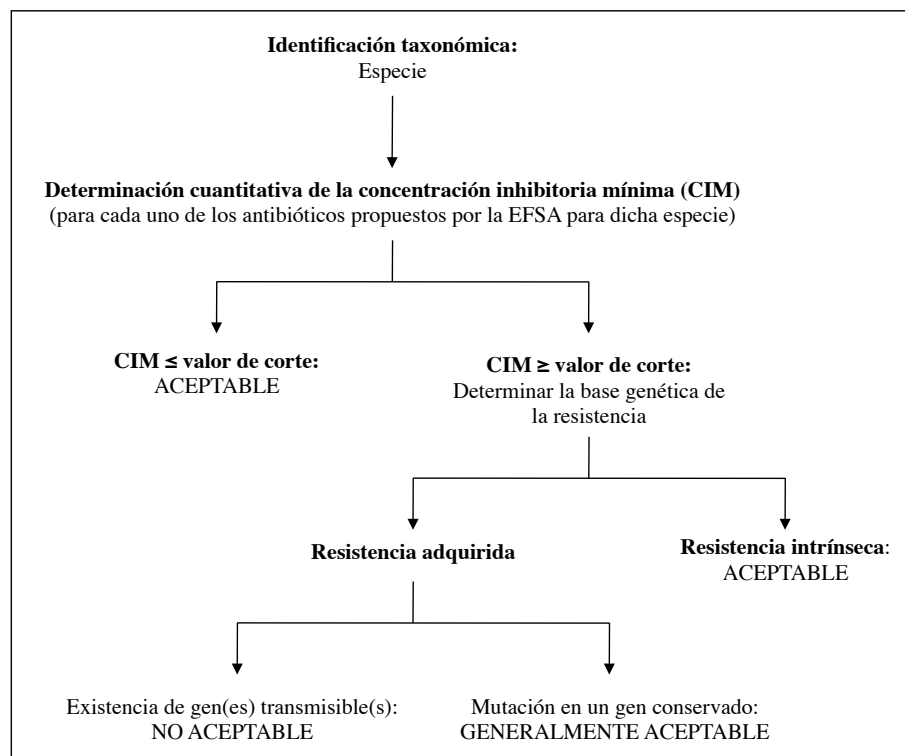


Fig. 4.—Esquema propuesto por la EFSA³¹ para la evaluación de la resistencia a antibióticos en bacterias potencialmente probióticas.

Seguridad de los excipientes

La evaluación de seguridad de un probiótico debe tener en cuenta los excipientes empleados en la formulación de los productos finales. A modo de ejemplo, se han descrito casos de niños que han sufrido reacciones anafilácticas debidas a la exposición a las proteínas de leche de vaca empleada como excipiente^{37,38}. En este sentido, los productos probióticos deben respetar la normativa vigente relativa a la declaración de alérgenos en el etiquetado (Real Decreto 2220/2004, Directiva Europea 2006/142). Por lo que respecta a los ensayos clínicos, es importante incluir la alergia o intolerancia al excipiente entre los criterios de exclusión.

Pruebas y modelos para la evaluación de la seguridad

Existen numerosos tipos de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para evaluar la seguridad de los probióticos. En general, todos son útiles para tener más información a la hora de seleccionar las cepas más seguras aunque los que se basan en pruebas fenotípicas sencillas y en el empleo de cultivos celulares poseen, en mayor o menor medida, el inconveniente de no reflejar adecuadamente las complejas interacciones que se establecen en

un ser vivo. Las pruebas en animales han sido consideradas tradicionalmente como una parte esencial en la evaluación de la seguridad de cualquier preparado que se pretenda administrar a humanos. Para ello, se han empleado una amplia gama de especies pertenecientes a diversas clases zoológicas destacando, entre todas ellas, el modelo rata. No obstante, los modelos animales también son objeto de controversia por las connotaciones éticas inherentes y porque frecuentemente los datos de seguridad obtenidos no son directamente extrapolables a la especie humana⁸. Por ello, es deseable que el modelo animal sea seleccionado por su capacidad para predecir lo que pueda suceder en una persona, lo que implica que su anatomía y fisiología, incluyendo su desarrollo, los procesos metabólicos, las respuestas del sistema inmunitario y la composición de la microbiota, sean lo más similares posibles a las nuestras. En este sentido, el cerdo es el modelo ideal^{39,40} a pesar de que plantea problemas de coste y espacio que frecuentemente obligan a optar por otras especies.

Hasta la fecha, los estudios de toxicidad oral aguda, subcrónica y crónica de probióticos en modelos estándar (por ejemplo, ratas sanas) (Fig. 5) no han mostrado efectos adversos, incluso cuando se han administrado a grandes dosis (hasta 10.000 veces mayores que las consumidas normalmente en humanos) durante un

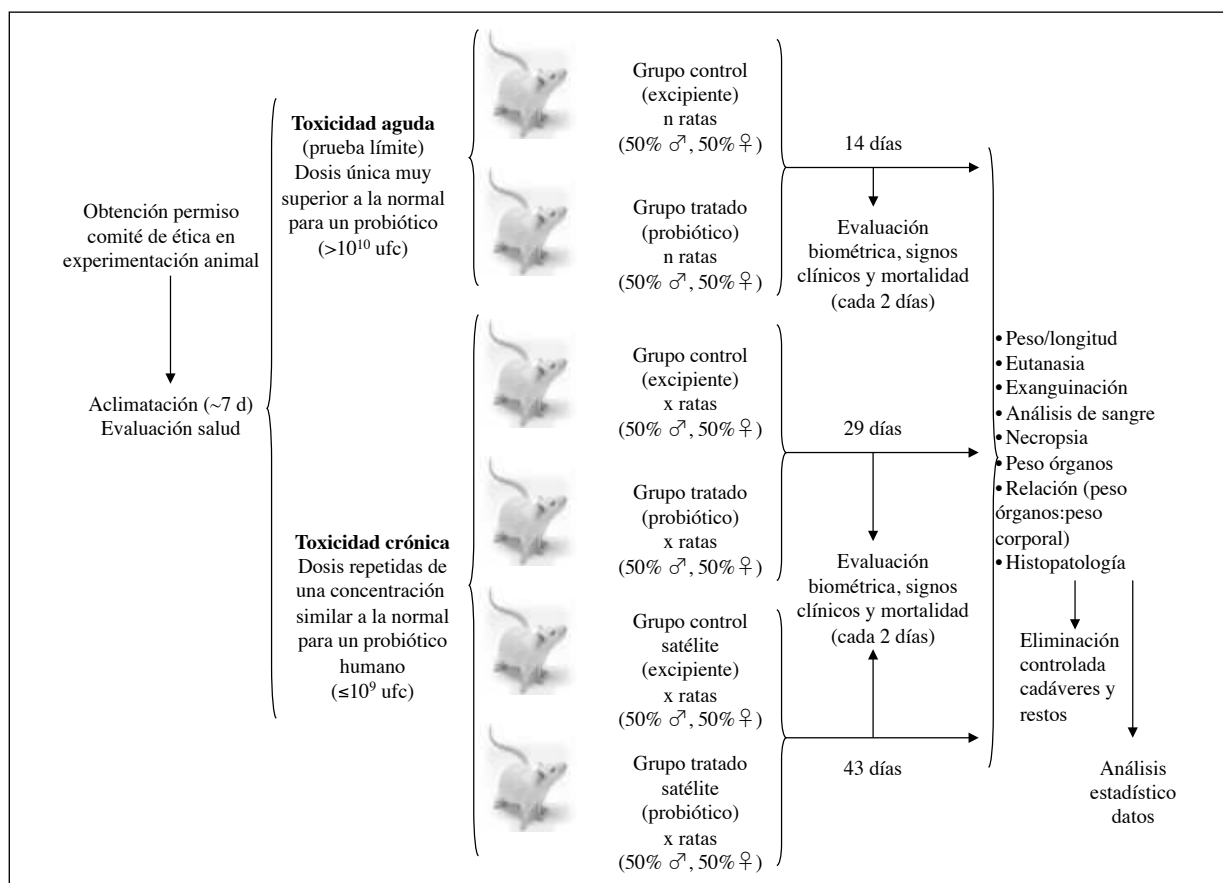


Fig. 5.—Diseño típico de los estudios de toxicidad oral en ratas.

periodo de tiempo prolongado^{8,41,42}. Debido a esta baja o nula patogenicidad, algunos autores han recurrido al empleo de animales inmunodeprimidos o genéticamente predispuestos a padecer ciertas patologías para evaluar la seguridad de los probióticos, aunque esta estrategia ha sido cuestionada por la dificultad de extrapolar los resultados a una situación real. Otra alternativa a la que se ha recurrido para tratar de forzar la patogenicidad de los probióticos es su administración por rutas inusuales (intravenosa, intraperitoneal...). Nuevamente, son abordajes difíciles de validar ya que los resultados obtenidos no son, en absoluto, extrapolables a lo que sucede cuando la misma cepa se administra por vía oral.⁴² Globalmente, aunque las distintas pruebas *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales pueden proporcionar información útil durante el proceso de selección de cepas, los únicos datos que permiten evaluar la seguridad de un probiótico de una forma directa son los que se obtienen en el curso de ensayos clínicos de fase 1, 2 y 3, correctamente diseñados y dirigidos específicamente a la población diana.

Funcionalidad

De forma similar a la evaluación de la seguridad, también existen numerosos ensayos *in vitro*, *ex vivo*

e *in vivo* para detectar aquellas cepas que poseen propiedades funcionales relevantes. En mayor o menor medida, todos son útiles para disponer de la mayor información posible a la hora de hacer un escrutinio para seleccionar las cepas con mayor potencial probiótico pero, en la práctica, la mayor parte de los ensayos *in vitro* y *ex vivo* no permiten garantizar la funcionalidad de los microorganismos probióticos en un hospedador. Nuevamente, serán los ensayos clínicos (fase 2 y 3) los que determinen si un probiótico ejerce el efecto beneficioso que se esperaba sobre la población diana⁴³.

Desde el punto de vista funcional, los criterios de selección suelen incluir, por una parte, una serie de prerequisites para que la cepa pueda alcanzar su lugar de acción a una concentración adecuada (componente de la microbiota normal del hospedador diana, resistencia al tránsito por el aparato digestivo, capacidad de adherencia a células epiteliales...) y, por otra, propiedades que pudieran asociarse a un efecto beneficioso (producción de sustancias antimicrobianas, exclusión competitiva de patógenos, estimulación de la síntesis de mucinas, producción de ácidos grasos de cadena corta, síntesis de compuestos bioactivos determinados, neutralización o detoxificación de carcinógenos y de contaminantes abióticos, inmunomodulación, endocrinomodulación, neuromodulación...) (Fig. 6).

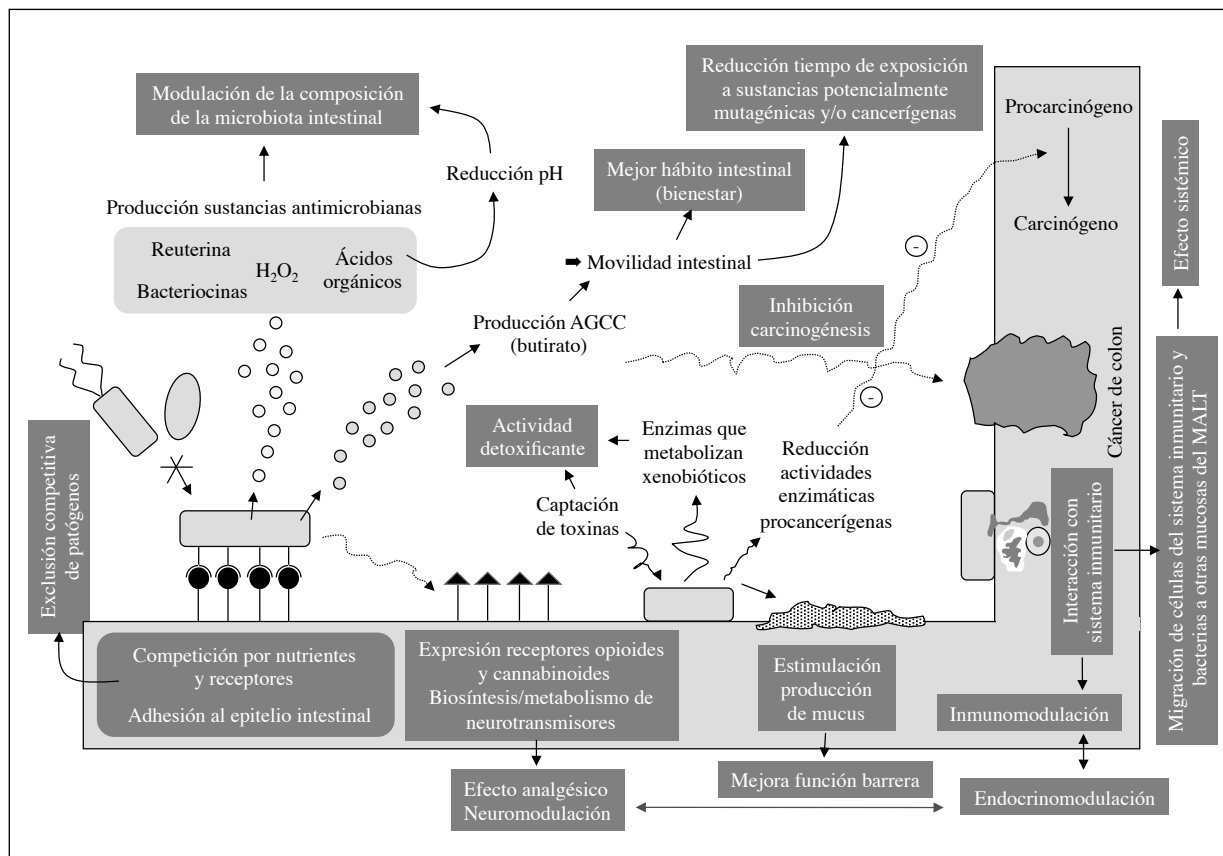


Fig. 6.—Representación esquemática de algunos de los efectos que pueden ejercer los probióticos en un hospedador, muchos de los cuales pueden estar interrelacionados.

Tradicionalmente se recomendaba que las cepas probióticas se hubieran aislado de muestras de la misma especie a la que se le iban a administrar, basándose en la creencia de que las cepas de origen humano se implantarían o colonizarían nuestras mucosas con mayor facilidad que las aisladas de otras especies^{44,45}. Sin embargo, el informe del grupo de trabajo FAO/OMS citado anteriormente, concluyó que no existe un criterio definido para el término “origen humano”² ya que, en muchos casos, resulta extraordinariamente difícil, sino imposible, conocer el origen último de una cepa (humano, animal, ambiental, alimentario...) a pesar de que haya sido aislada, por ejemplo, de una muestra de heces humanas. Igualmente señaló que existen diversos ejemplos de cepas probióticas que pertenecen a especies alóctonas pero que presentan efectos beneficiosos documentados en humanos. Por todo ello, concluyó que, globalmente, la propiedad “origen humano” no constituye un criterio relevante en la selección de probióticos para su uso en nuestra especie.

Para que las cepas probióticas que se administran oralmente puedan ejercer sus efectos beneficiosos deben resistir las condiciones ambientales del aparato digestivo y especialmente, el efecto microbicida de la saliva, acidez gástrica, bilis, secreción pancreática... Debe tenerse en cuenta, además, que la composición de las distintas secreciones, el tiempo de vaciado gástrico o la motilidad intestinal pueden variar dependiendo de la edad y del estado de salud del hospedador. Para determinar la resistencia, se puede recurrir a métodos *in vitro* como la acidificación y/o la adición de sales biliares al medio de cultivo, al empleo de secreciones gastrointestinales obtenidas de individuos sanos o al uso de modelos dinámicos más sofisticados que simulan las condiciones del tracto digestivo en su conjunto⁴⁶. La supervivencia de los microorganismos candidatos a ser probióticos también se puede estudiar *in vivo* usando técnicas de intubación intestinal y biopsias del colon o analizando su presencia en las heces de personas o animales que los hayan ingerido, recurriendo a técnicas moleculares que permitan reconocerlas entre los miembros de la microbiota autóctona del anfitrión⁴⁷.

Un factor importante para la supervivencia de bacterias probióticas es el sustrato o matriz con el que se vehiculan⁴⁸⁻⁵⁰. Desde hace varios años se trabaja activamente en sistemas que permitan la máxima protección de las cepas probióticas durante su paso por el estómago y el duodeno, de tal manera que este criterio no suponga una limitación real.

Lo mismo es aplicable para la administración de probióticos por otras vías clásicas (vaginal) o emergentes (colirio oftalmológico, solución ótica, aplicación sobre la piel...) con relación a las condiciones específicas de cada ecosistema.

Las propiedades funcionales por las que se selecciona un probiótico pueden ser tan amplias como nos permita nuestra imaginación, la tecnología y el presupuesto disponible. Por este motivo, la intención de este apartado no es la de ofrecer un catálogo completo de características potencialmente probióticas sino destacar la diversidad y complejidad de las alternativas existentes. En principio, es necesario saber el uso que se dará al probiótico y sobre qué población se pretende aplicar; de esta manera, se seleccionarán las cepas pertinentes mediante las pruebas más adecuadas para poner de manifiesto las propiedades relevantes que permitan alcanzar el objetivo final.

El uso actual de los organismos probióticos pretende, en más del 90% de los casos, prevenir o erradicar las infecciones en las cavidades accesibles desde el exterior, principalmente, las del tracto digestivo y la vagina. Dentro de las primeras, se utilizan en el control de la diarrea, sea esta de origen infeccioso o iatrogénico, el estreñimiento, la intolerancia a la lactosa, la pouchitis, la enterocolitis necrotizante, el cólico del lactante, el síndrome del intestino irritable, etc. A nivel ginecológico se usan en vaginosis y vulvovaginitis de cualquier etiología, en la prevención de recidivas de dichos cuadros, en la prevención de la infección urinaria, en la corrección de los trastornos asociados a la menopausia y en las mastitis.

El antagonismo microbiano de los probióticos depende, en parte, de su capacidad de adherencia a las mucosas, aunque, como se ha comentado anteriormente, la adhesión a las células epiteliales es una propiedad controvertida. Sin embargo, es una característica clave para que una cepa pueda evitar el asentamiento de un patógeno potencial. En el proceso están implicados diversos componentes superficiales, incluyendo proteínas de unión al mucus, y algunas estructuras específicas, como los pili descritos en algunas cepas de *Lactobacillus rhamnosus*. Adicionalmente, la capacidad de auto-agregación puede aumentar sustancialmente la capacidad de colonización en aquellos ecosistemas en los que los probióticos tienen un tiempo de residencia corto.

El efecto protector de los probióticos viene también determinado por la generación de compuestos antimicrobianos. El más universal es el ácido (láctico, acético, propiónico y/o butírico) que resulta del metabolismo fermentativo de los azúcares, dado que la mayoría de los organismos probióticos son anaerobios aerotolerantes o estrictos. También juega un papel la producción de bacteriocinas, que son péptidos que producen poros en la membrana de las bacterias susceptibles o inducen su lisis, siendo, por tanto, bactericidas. Por último, la generación de agua oxigenada es un carácter muy demandado en los candidatos a probióticos vaginales, porque juega un papel capital en la protección de dicha cavidad.

Otra propiedad relevante de algunas cepas probióticas es la de coagregar con ciertos patógenos y, en conse-

cuencia, impedir su acceso a las mucosas. El efecto antimicrobiano de la congregación es particularmente intenso cuando la misma cepa es capaz de producir sustancias antimicrobianas que inhiban al patógeno en cuestión⁵¹.

La integridad de las mucosas está influenciada por muchos factores, incluyendo su permeabilidad, la composición de las mucinas, el estrés oxidativo y el recambio de las células de la mucosa. Diversos estudios han demostrado la capacidad de algunos probióticos para mantener o mejorar la función de barrera intestinal mediante la modificación de la expresión de los genes que codifican proteínas de las zonas de oclusión (occludina, ZO-1, claudina-1, claudina-4, JAM-A...), la modificación de la composición de monosacáridos de las mucinas, el aumento del grosor de la capa de mucus, la inhibición de los procesos de apoptosis y/o la promoción de la diferenciación celular y de actividades citoprotectoras, incluyendo la reducción del estrés oxidativo⁵².

El tejido linfóide asociado a las mucosas representa la parte mayoritaria del sistema inmunitario y su interacción con la microbiota constituye uno de los pilares de la salud. De hecho, los procesos de disbiosis de la microbiota endógena alteran las respuestas inmunitarias y contribuyen a la aparición de enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunes. Por ello, no es de extrañar que la capacidad de inmunomodulación sea una de las actividades que más se hayan asociado a los probióticos. En este sentido, se ha evaluado el efecto de diversas cepas sobre los distintos componentes tanto de la inmunidad innata (células NK, células dendríticas, macrófagos, células epiteliales...) como de la adaptativa o adquirida (linfocitos Th1, Th2, Th17, Treg, Tc y B). Estos estudios abordan la proliferación y expresión génica de diversas poblaciones de células del sistema inmunitario y la producción de un amplio espectro de inmunoglobulinas, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por parte de las mismas⁵³. No obstante, el proceso de selección tiene que tener en cuenta que el tipo de respuesta inmunológica asociada a un probiótico (activación, desviación, regulación, supresión) puede ser positiva o negativa dependiendo del estado del hospedador. En consecuencia, para modular una inmunopatía en beneficio del hospedador se debe tener el mayor conocimiento posible sobre los mecanismos responsables de la patología y sobre las respuestas que se pueden esperar del probiótico. Por ello, la cepa debe ser cuidadosamente seleccionada dependiendo de la población a la que vaya dirigida.

La neuromodulación es uno de los efectos más prometedores en el campo de los probióticos. El tracto gastrointestinal humano contiene una red nerviosa muy compleja, denominada sistema nervioso entérico, cuyo objetivo principal es la regulación de las funciones fisiológicas y la armonización de la comunicación entre el cerebro, el tracto gastrointestinal, el sistema endocrinológico y el sistema inmunitario⁵⁴. Las alteraciones de este “eje intestino-cerebro” suelen asociarse a ciertas patologías psiquiátricas (desde la ansiedad y

la depresión hasta el autismo) e intestinales (síndrome de intestino irritable) y a la presencia de una microbiota aberrante en los individuos que las padecen^{55,56}. En este sentido, se considera que los probióticos pueden tener un impacto importante para estas poblaciones aunque, nuevamente, será necesaria una cuidadosa selección de las cepas (interacción con receptores nerviosos, efectos en la biosíntesis y metabolismo de neurotransmisores...) y estudios que revelen la magnitud, mecanismos y relevancia clínica de los posibles efectos beneficiosos.

Existe un amplio y creciente espectro de pruebas fenotípicas para poner de manifiesto propiedades probióticas mediante procedimientos *in vitro*. Además, la disponibilidad de un análisis funcional del genoma empleando las tecnologías de secuenciación de nueva generación^{7,57} y las nuevas micromatrices funcionales⁵⁸ han revolucionado el descubrimiento de propiedades potencialmente probióticas dentro de una cepa. Este abordaje permite un detallado análisis de genes implicados en la colonización, persistencia, interacción y señalización dentro del hospedador humano y, en consecuencia, una selección rápida de cepas con propiedades muy específicas.

Ensayos in vivo

Los ensayos *in vivo* ofrecen la ventaja de poder aplicar una amplia gama de técnicas (desde las ómicas hasta las avanzadas de imagen, pasando por las técnicas bioquímicas, de microbiología molecular y de biología celular) para intentar dilucidar los mecanismos de acción e identificar marcadores relacionados con los efectos beneficiosos (y, eventualmente, con los posibles efectos adversos) de un probiótico.

El empleo de modelos animales permite estudiar muestras, tejidos y órganos a los que, por motivos éticos, es imposible acceder en ensayos clínicos humanos, por lo que siguen siendo imprescindibles para determinar mecanismos de acción y marcadores biomédicos. Como ya se indicó al hablar de los aspectos de seguridad de los probióticos, existen múltiples modelos que se pueden utilizar para poner de manifiesto la funcionalidad de los probióticos *in vivo*, aunque las diferencias anatómicas y fisiológicas con nuestra especie hace que sean los ensayos clínicos con personas los que finalmente determinen el grado de eficacia del probiótico para la diana elegida. Los estudios descriptivos en los que se comparan muestras de individuos sanos y enfermos son extremadamente útiles para determinar los marcadores que hay que incluir en los ensayos clínicos, cuyo objetivo debe ser determinar si realmente se produce el “efecto beneficioso” incluido en la definición de probiótico y, en ese caso, cuál es su magnitud.

Los ensayos clínicos en los que se evalúa la eficacia son, típicamente, los de fase 2 y 3 (Tabla I). Los estudios de fase 2 evalúan la eficacia de un probiótico frente a un placebo, preferentemente en formato de do-

Tabla I*Aspectos que hay que tener en cuenta para la realización de un ensayo clínico humano*

Selección de la población diana
Selección del tipo de ensayo
Cálculo de la muestra (sobre la hipótesis de partida) para que tenga significancia estadística
Disponibilidad del probiótico tal y como se administraría realmente a la población a las que va destinado (concentración, excipiente, posología...)
Documentación (para presentar al Comité de Ética y para el seguimiento del ensayo):
Protocolo
Criterios de inclusión y de exclusión
Hoja de información al paciente y consentimiento informado
Memoria económica
Ficha técnica del producto que se va a administrar
CV del investigador principal (uno por cada centro participante)
Idoneidad instalaciones
Idoneidad investigador principal y colaboradores
Compromiso investigador principal
Póliza de seguros
Carta para fiscalía de menores (en el caso de que los participantes lo sean)
Procedimiento y material utilizado para el reclutamiento de los participantes
Cuaderno de recogida de datos (papel, formato electrónico) de los participantes
Diario de los participantes (en caso necesario)
Instrucciones para la recogida y conservación de las muestras biológicas
Registros de acontecimientos adversos (AA) y acontecimientos adversos graves (AAG)
Registro de abandono prematuro del estudio
Registro de muestras biológicas recogidas por el participante o personal sanitario
Registro de muestras biológicas recibidas en el laboratorio
Registro de control de temperaturas/tiempos (transporte/almacenamiento del probiótico y de las muestras biológicas)
Procedimiento de aleatorización
Sobres de ruptura de ciego
Permiso del Comité de Ética
Contrato con el/los hospital(es)/centro(s) de atención primaria
Seguimiento/comunicación con el Comité de Ética
Alta del estudio en base de datos de ensayos clínicos (ClinicalTrials.gov o similar)

ble ciego, y recogen los posibles efectos adversos. El resultado deseable sería una mejora biológica y estadísticamente significativa en alguno(s) de los siguientes aspectos: bienestar o calidad de vida, reducción del riesgo de enfermedad, recuperación más rápida, menor sintomatología y/o aumento del tiempo entre recurrencias. Se necesitan más evidencias clínicas derivadas de este tipo de estudios para que los probióticos (especie, cepa, formulación, dosis, aplicación específica para la que ha mostrado eficacia) ganen credibilidad entre los consumidores y, especialmente, entre la comunidad sanitaria, independientemente de que se comercialicen en forma de alimentos o presentaciones medicamentosas.

Los estudios de fase 3 evalúan la eficacia de un probiótico frente a la terapia estándar empleada para prevenir o tratar una enfermedad determinada⁵⁹. En general, son ensayos ciegos y aleatorizados en los que el tamaño de la muestra debe ser calculado cuidadosamente y en los que se deben incluir los posibles efectos adversos e incidencias, una evaluación de la relación riesgo/beneficio y una serie de controles para compro-

bar la calidad del ensayo. El problema de los estudios de fase 3 es que son muy caros, por lo que tienden a restringirse a aquellos casos en los que parece más evidente que puedan reemplazar o complementar a los medicamentos convencionales. Un ejemplo claro de ello es el tratamiento de las enfermedades infecciosas, debido a la incidencia creciente de la resistencia a antibióticos entre los microorganismos patógenos.

El grupo de trabajo de la FAO y la OMS recomendó la publicación en revistas científicas o médicas reconocidas internacionalmente, tanto de la documentación que demuestre el carácter probiótico de una cepa (incluyendo la evidencia de los ensayos clínicos) como la de aquellos casos en los que se obtengan resultados negativos².

Aspectos tecnológicos

El hecho de que una cepa bacteriana crezca bien en condiciones de laboratorio (pequeños volúmenes, me-

dios de cultivo complejos...) no significa, ni mucho menos, que vaya a suceder lo mismo en condiciones industriales. En este sentido, las empresas que comercializan o desean comercializar probióticos se enfrentan a dos retos tecnológicos importantes: (1) la necesidad de obtener una biomasa bacteriana muy elevada de forma económicamente rentable y (2) la necesidad de que la concentración de bacterias viables necesaria para ejercer el efecto beneficioso se mantenga hasta el final de la vida útil del producto.

Ambos aspectos están relacionados con las características fisiológicas de cada cepa, por lo que las condiciones deben establecerse caso a caso. Además, la viabilidad también depende del formato en el que se vayan a administrar las bacterias ya que, por ejemplo, la vida útil de los productos lácteos probióticos refrigerados es notablemente más corta que la de los productos liofilizados que se venden con una presentación medicamentosa (cápsula, polvo...). A su vez, dentro de los productos liofilizados existen diversos parámetros (concentración de oxígeno, humedad, temperatura de almacenamiento...) y formatos (microencapsulación, recubrimientos...) que juegan un papel importante en la estabilidad del producto. En cualquier caso, resulta inevitable que una cierta proporción de bacterias mueran o resulten dañadas durante el proceso productivo o el almacenamiento del preparado probiótico y, en este sentido, las empresas suelen recurrir a la sobredosificación inicial, de tal manera que se conserve la dosis eficaz hasta el final de su vida útil.

Las empresas que se dedican al desarrollo de probióticos (incluyendo el escalado industrial y los estudios de viabilidad) suelen organizar su trabajo en forma de etapas con un grado creciente de dificultad en las que es absolutamente necesario que se alcancen los objetivos de una fase para poder pasar a la siguiente. La primera etapa suele consistir en: (a) el depósito de la cepa en el banco de la empresa y la comprobación de su identidad (especie) y (b) la evaluación de su capacidad fermentativa (producción, limosidad, morfología...) a pequeña escala en biorreactores o mini-fermentadores que simulen las condiciones de los fermentadores de producción (temperatura, pH, agitación...).

La segunda fase consiste en el escalado a producciones en planta piloto para evaluar la productividad antes y después del proceso de liofilización y el estudio de la estabilidad a los tres meses. En general, el objetivo es que el microorganismo permanezca viable (pérdida $\leq 0,2 \log$ ufc) en una mezcla con celulosa (u otro excipiente) envasada en sobres de papel de aluminio, almacenados a una actividad de agua constante ($<0,2$) y a 25°C . En la siguiente fase, se determina el flujo de trabajo para que el probiótico entre en la fase de fabricación. Tras la primera producción, se define el precio sobre la base del perfil del producto (ufc/g) y se completa la validación analítica de la mezcla. El objetivo final es la liberación del producto mientras se continúan los estudios de estabilidad a largo plazo (dos años), tanto en refrigeración como a temperatu-

ra ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). En general, se pretende que el procedimiento permita disponer de un producto con una elevada concentración ($>5 \times 10^{10}$ ufc/g) que, una vez dosificado en los envases finales, tenga una vida útil prolongada a temperatura ambiente. En los casos en los que no es posible, el producto se tiene que conservar en refrigeración hasta su venta.

En cualquier caso, resulta imprescindible la aplicación de los principios del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) y de buenas prácticas de fabricación para garantizar que los preparados probióticos llegan al consumidor con la máxima calidad posible; por ejemplo, es importante descartar la contaminación por otros microorganismos y el mantenimiento de la viabilidad de las cepas y la estabilidad de los excipientes hasta, al menos, el final del periodo de vida útil del preparado. Es recomendable, asimismo, que las empresas que comercializan probióticos hagan controles de los productos de la competencia en el marco de la protección de cepas patentadas y de los derechos de propiedad industrial.

Cuando una empresa introduce un probiótico en el mercado, debería asegurar que está bien etiquetado. En este sentido, el comité de expertos de la FAO/WHO² recomendó que se recoja la siguiente información en la etiqueta de cualquier producto que contenga probióticos: a) género, especie y cepa; b) dosis mínima de microorganismos viables al final de la vida útil; c) cantidad necesaria de producto que se debe consumir para conseguir la dosis efectiva; d) efecto(s) beneficioso(s); e) condiciones de almacenamiento y f) forma de contacto con el servicio de atención al cliente.

Finalmente, es de esperar que el acúmulo de evidencias científicas obtenidas desde la primera evaluación por EFSA de las alegaciones de salud de productos probióticos, unida a una presentación adecuada de las mismas, permita la admisión de los preparados que los contienen y que cumplen con las exigencias publicadas en su día⁶⁰.

Aspectos comerciales

La opinión del departamento comercial de una empresa alimentaria o farmacéutica resulta fundamental a la hora de tomar una decisión sobre el desarrollo industrial y la eventual puesta en el mercado de un probiótico. Las funciones de dicho departamento incluyen, entre otras, los estudios de mercado (que permiten detectar aquellas necesidades de los consumidores, cuya resolución pueda ser rentable), la promoción y publicidad del producto, las ventas y el servicio post-venta. Normalmente, son actividades que implican una interacción constante con los departamentos de producción, financiero y de recursos humanos.

En general, se suelen identificar tres figuras con relación a la decisión de compra: el *prescriptor* (profesional que recomienda el producto y cuya opinión es valorada por el consumidor; por ejemplo, el médico, el veterina-

rio o el farmacéutico), el *comprador* (persona que adquiere el producto pero que no tiene por qué coincidir con el consumidor; por ejemplo, los padres que compran un preparado probiótico indicado para cólico del lactante) y *el consumidor*. Por otra parte, resulta importante tener en cuenta la segmentación de mercado, bien por género (por ejemplo, los probióticos para infecciones vaginales o para mastitis), edad (probióticos pediátricos o para la tercera edad), nivel de ingresos, etc.

Las campañas de marketing básicamente se suelen enfocar, como en cualquier otro tipo de producto, en distintos elementos: sus características (incluyendo el envase), el precio, la distribución o disponibilidad y el servicio post-venta. Normalmente, el ciclo de vida de un producto comprende las etapas de *introducción o lanzamiento* (salida al mercado de un nuevo preparado; se producen ventas pero el saldo puede llegar a ser negativo ya que implica un gasto de promoción notable), *crecimiento* (el producto empieza a ser conocido, las ventas experimentan un fuerte desarrollo y los beneficios también) y *madurez* (las ventas se estabilizan y los beneficios hacen lo propio). Eventualmente, puede existir una etapa de *declive* o *saturación* (caída considerable de ventas y beneficios), durante la que se puede intentar relanzar el producto introduciendo alguna innovación.

La determinación del precio se puede basar en los costes, en la elasticidad de la demanda, en los precios que fija la competencia para productos similares, etc. En general, los preparados probióticos disponibles en farmacias y parafarmacias no están cubiertos por el Sistema Público de Salud por lo que suelen tener un coste final elevado para el comprador (~1 €/cápsula, sobre u óvulo). Este hecho propicia que un porcentaje relativamente elevado de usuarios potenciales no tenga acceso a ellos, especialmente cuando se requiere un tratamiento prolongado. En el futuro, la mayor disponibilidad de resultados basados en ensayos clínicos bien diseñados y ciertos cambios normativos podrían hacer variar la situación.

La política de distribución permite que el producto se encuentre en el lugar y momento adecuados para poder ser adquirido por el consumidor. En general, el proceso que sigue el producto desde que sale de la cadena de producción hasta que llega a manos del cliente es el siguiente: almacenamiento del producto, distribución física, facturación y cobro. El canal de distribución es cualquiera de los medios (establecimientos alimentarios, farmacias, parafarmacias...) que se utilizan para conseguir que los productos recorran el camino desde el productor hasta el consumidor.

La promoción del producto incluye la publicidad en diversos medios, especialmente en revistas especializadas y en el lugar de venta y la visita a los prescriptores por parte de representantes de la empresa. En este sentido, es también importante la promoción de la interacción entre los investigadores y clínicos que aislaron y evaluaron la(s) cepa(s) probiótica(s) y los prescriptores, a través de reuniones o sesiones en congresos.

Esto les facilitará una información de primera mano sobre las bondades del preparado, que probablemente se percibirá como menos sesgada que la ofrecida por los representantes de la compañía comercializadora. Por último, existe la posibilidad de la divulgación para el público en general, aunque en este caso parece más apropiado suministrar información sobre la microbiota de ocupación, sus funciones y los beneficios que aporta, de modo que el uso de probióticos se perciba como lo que es, una aplicación racional de dichos beneficios en aras de una mejor salud pública.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido auspiciado por la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP) y su contenido se corresponde básicamente con el de la ponencia homónima presentada en el VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud. Evidencia Científica (SEPyP, Oviedo, 5 y 6 de febrero de 2015). El autor desea expresar su mayor agradecimiento a Juan Evaristo Suárez (Área de Microbiología e Instituto de Biotecnología, Universidad de Oviedo; miembro de la junta directiva de la SEPyP) por revisar críticamente el manuscrito y mejorar sustancialmente tanto su forma como su fondo.

Referencias

1. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *WHO* 2001.
2. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *FAO* 2002.
3. Guarner F, Requena T, Marcos A. Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific evidence". *Nutr Hosp* 2010; 25: 700-704.
4. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506-514.
5. EFSA. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA J* 2013; 11: 3449.
6. Huys G, Vancanneyt M, D'Haene K, Vankerckhoven V, Goossens H, Swings J. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res Microbiol* 2006; 157: 803-810.
7. Douillard FP, de Vos WM. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb Cell Fact* 2014; 13 Suppl 1: S8.
8. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 2010; 1: 164-185.
9. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 125-126.
10. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1256-1264.

11. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, et al. *Lactobacillus bacteremia* during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1155-1160.
12. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 775-780.
13. Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol* 2008; 126:278-285.
14. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, et al. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1159-1160.
15. Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC, Hamilton-Miller JM. *Lactobacillus endocarditis* caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 290-292.
16. Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viard JP, Ricour C, Jacquemin JL, et al. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 16-20.
17. Oggioni MR, Pozzi G, Valensin PE, Galieni P, Bigazzi C. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 325-326.
18. Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol* 2000; 151: 361-368.
19. Vestlund S, Vankerckhoven V, Saxelin M, Goossens H, Salminen S, Ouwehand AC. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int J Food Microbiol* 2007; 116: 325-331.
20. Huys G, Botteldoorn N, Delvigne F, De Vuyst L, Heyndrickx M, Pot B, et al. Microbial characterization of probiotics-advisory report of the Working Group 8651 Probiotics of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 1479-504.
21. Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007; 119: e724-e732.
22. Rodríguez JM. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* 2014; 5: 779-784.
23. Franz CM, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4385-4389.
24. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628-1635.
25. Duc le H, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 2161-2171.
26. ISAPP. Annual Report. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. http://www.isapp.net/Portals/0/docs/Annual%20Reports/annual_report_2003.pdf, 2003.
27. Connolly E, Lönnerdal B. d(-)-lactic acid-producing bacteria: safe to use in infant formulas. *Nutrafoods* 2004; 3: 37-49.
28. Connolly E, Abrahamsson T, Bjorksten B. Safety of d(-)-lactic acid producing bacteria in the human infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 489-492.
29. Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ. D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathological mechanisms. *Medicine* 1998; 77: 73-82.
30. Hove H. Lactate and short chain fatty acid production in the human colon: implications for D-lactic acidosis, short bowel syndrome, antibiotic-associated diarrhoea, colon cancer and inflammatory bowel disease. *Dan Med Bull* 1998; 45: 15-33.
31. EFSA. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J* 2012; 10: 2740.
32. Klare I, Konstabel C, Müller-Bertling S, Reissbrod R, Huys G, Vancanneyt M, et al. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8982-8986.
33. Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 900-912.
34. O'Hara AM, Shanahan F The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7: 688-693.
35. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 1869-1871.
36. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53: 1617-1623.
37. Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Cordebar V, Codreanu F, Kanny G. Probiotics may be unsafe in infants allergic to cow's milk. *Allergy* 2006; 61: 507-508.
38. Lee TT, Morisset M, Astier C, Moneret-Vautrin DA, Cordebar V, Beaudouin E, et al. Contamination of probiotic preparations with milk allergens can cause anaphylaxis in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 746-747.
39. Patterson JK, Lei XG, Miller DD. The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Exp Biol Med* 2008; 233: 651-654.
40. Pang X, Hua X, Yang Q, Ding D, Che C, Cui L, et al. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME J* 2007; 1: 156-162.
41. Momose H, Igarashi M, Era T, Fukuda Y, Yamada M, Ogasa K. Toxicological studies on *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl Pharmacol* 1979; 17: 881-887.
42. Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 465-470.
43. Reid R, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 658-672.
44. Holzapfel WH, Haberer P, Snell J, Schillinger U, Huis in't Veld J. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101.
45. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 1999; 9: 43-52.
46. Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JHJ. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1031-1037.
47. Fernández L, Marín ML, Langa S, Martín R, Reviriego C, Fernández A, et al. A novel genetic label for detection of specific probiotic lactic acid bacteria. *Food Sci Tech Int* 2004; 10: 101-108.
48. Saxelin M, Ahorás M, Salminen S. Dose response on the faecal colonization of *Lactobacillus* strain GG administered in two different formulations. *Microbiol Ecol Health Dis* 1993; 6: 119-122.
49. Saxelin M, Pessi T, Salminen S. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *Int J Food Microbiol* 1995; 25: 199-203.
50. Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins. Development and application of an *in vivo* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 1998; 84: 759-768.
51. Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun* 1998; 66: 1985-1989.

52. Howarth GS, Wang H. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients* 2013; 5: 58-81.
53. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 2013; 5: 1869-1912.
54. Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12: 453-466.
55. Critchfield JW, Van Hemert S, Ash M, Mulder L, Ashwood P. The potential role of probiotics in the management of childhood autism spectrum disorders. *Gastroenterol Res Pract* 2011; 2011: 161358.
56. Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, et al. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes* 2013; 4: 17-27.
57. Saulnier DM, Santos F, Roos S, Mistretta TA, Spinler JK, Molenaar D, et al. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS One* 2011; 6:e18783.
58. Tu Q, He Z, Li Y, Chen Y, Deng Y, Lin L, et al. Development of HuMiChip for functional profiling of human microbiomes. *PLoS One* 2014; 9: e90546.
59. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1551-1558.
60. EFSA. Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA J* 2011; 9: 1984.