



Nutrición Hospitalaria



Impacto de la nutrición en el origen, prevención y control de diversas enfermedades

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* CECT 7210 (*B. infantis* IM-1®) muestra actividad frente a patógenos intestinales

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* CECT 7210 (*B. infantis* IM-1®) shows activity against intestinal pathogens

José Antonio Moreno-Muñoz, Manel Martín-Palomas, Jesús Jiménez López

Laboratorios Ordesa. Parc Científic de Barcelona. Barcelona

Resumen

La diarrea causada por gastroenteritis agudas graves es una de las principales causas de mortalidad infantil en niños menores de 5 años. Por ello es interesante realizar una validación preclínica y clínica de la eficacia de *B. longum* subsp. *infantis* IM-1® frente a diversos patógenos gastrointestinales. El *B. infantis* IM-1® fue evaluado frente a diferentes patógenos gastrointestinales causantes de diarrea en bebés utilizando modelos *in vitro*, modelos animales y estudios clínicos.

B. infantis IM-1® es capaz en un modelo *in vitro* de células MA-104 y HT-29 de inhibir la replicación de rotavirus (hasta un 36,05 %), así como de proteger las células de la infección por rotavirus (hasta un 48,50 %). Se ha identificado un péptido de 11 aminoácidos (MHQPHQPLPPT) con una masa molecular de 1282 KDa producido por este probiótico con capacidad antirotaviral. En un modelo murino, la cepa IM-1® ha demostrado proporcionar protección *in vivo* contra la infección por rotavirus. En experimentos de adhesión con HT29, IM-1® fue capaz de desplazar algunos patógenos del enterocito, especialmente *C. sakazakii* y *Salmonella enterica*, e impedir la adhesión de *C. sakazakii* y *Shigella sonnei*. En un estudio clínico con 190 bebés de menos de 3 meses de edad IM-1® redujo los episodios de diarrea. Fue seguro, se toleró bien y se asoció con una menor prevalencia de estreñimiento.

B. infantis IM-1® es un probiótico seguro, que se tolera bien y es eficaz en la reducción de los episodios de diarrea causados por los principales patógenos gastrointestinales en bebés.

Palabras clave:

Bifidobacterium. Probiótico.
Microbiota. Patógeno.
Intestino.

Abstract

Diarrhea caused by severe acute gastroenteritis is one of the main causes of infant mortality in children under 5 years of age. Therefore, it is interesting to perform a preclinical and clinical validation of the efficacy of *B. longum* subsp. *infantis* IM-1® against various gastrointestinal pathogens. *B. infantis* IM-1® was evaluated against different gastrointestinal pathogens that cause diarrhea in infants, using *in vitro* models, animal models, and clinical studies.

B. infantis IM-1® is able in an *in vitro* model of MA-104 and HT-29 cells to inhibit rotavirus replication (up to 36.05%) as well as to protect cells from infection due to rotavirus (up to 48.50 %). An 11-amino acid peptide (MHQPHQPLPPT) with a molecular mass of 1,282 KDa produced by this probiotic with antirotaviral capacity has been identified. In a murine model, the IM-1® strain has been shown to provide *in vivo* protection against rotavirus infection. In adhesion experiments with HT29, IM-1® was able to displace some pathogens from the enterocyte, especially *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica*, and prevent the adhesion of *C. sakazakii* and *Shigella sonnei*. In a clinical study with 190 babies under 3 months of age, IM-1® reduced episodes of diarrhea, being safe, well tolerated and associated with a lower prevalence of constipation.

B. infantis IM-1® is a safe, well tolerated and effective probiotic in reducing episodes of diarrhea caused by the main gastrointestinal pathogens in infants.

Keywords:

Bifidobacterium. Probiotic.
Microbiota. Pathogen. Gut.

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Agradecimientos: los estudios realizados en este artículo han sido parcialmente financiados por el Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, ayuda PROFIT (FIT-0600000-2006-22), y el Fondo Social Europeo (ayudas PTQ06-2-0642 y PTQ05-0101208). También ha financiado parcialmente estos estudios el Centro para el Desarrollo Tecnológico e Industrial (CDTI) a través del PROYECTO SENIFOOD (IDI 2009-0001006) y del PROYECTO SMARTFOODS (IDI-20141216). José Antonio Moreno-Muñoz fue cofinanciado por ICREA Junior Empresa Grant (Cataluña, España).

Moreno-Muñoz JA, Martín-Palomas M, Jiménez López J. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 (*B. infantis* IM-1®) muestra actividad frente a patógenos intestinales. Nutr Hosp 2022;39(N.º Extra 3):65-68

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.04315>

Correspondencia:

José Antonio Moreno Muñoz. Laboratorios Ordesa.
Parc Científic de Barcelona. C /Baldiri Reixac, 15-21.
08028 Barcelona
e-mail: josea.moreno@ordesalab.com

INTRODUCCIÓN

Las infecciones agudas gastrointestinales son la principal causa de gastroenteritis entre los niños de todo el mundo. Entre los principales agentes causantes de estas gastroenteritis tenemos enterovirus como rotavirus, norovirus y astrovirus y también patógenos bacterianos como *Salmonella*, *Escherichia* o *Campylobacter*, entre otros. A nivel mundial cada año se producen más de 250 millones de episodios de diarrea y cerca de 200 000 muertes asociadas a rotavirus, que es la principal causa de gastroenteritis en niños menores de 5 años (1). La gran mayoría de los casos ocurren en países en desarrollo, pero también en los países desarrollados la gastroenteritis asociada a rotavirus sigue siendo una causa importante de hospitalización en niños (2).

La lactancia materna previene enfermedades infecciosas en los lactantes, ya que gran parte de las inmunoglobulinas excretadas en la leche materna son inmunoglobulinas A (IgA), que protegen principalmente contra infecciones, como el rotavirus. De hecho, la IgA pueden detectarse en las heces de los lactantes, pero no en los alimentados con biberón. La industria ha centrado esfuerzos en el uso potencial de los probióticos como agentes preventivos frente a este tipo de infecciones gastrointestinales.

OBJETIVOS

Validación preclínica y clínica de la eficacia de *B. longum* subsp. *infantis* IM-1® frente a diversos patógenos gastrointestinales causantes de gastroenteritis agudas en bebés.

MÉTODOS

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *B. LONGUM* SUBSP. *INFANTIS* IM-1®

B. longum subsp. *infantis* IM-1® se aisló en las heces de un lactante alimentado exclusivamente con leche materna en presencia de jugos gastrointestinales y concentraciones fisiológicas de sales biliares. Se realizó un estudio del perfil de utilización de carbohidratos utilizando el API 50CH (bioMérieux España) y un estudio de actividades metabólicas no deseadas utilizando el API ZYM (bioMérieux España). La identificación de la cepa probiótica se realizó por secuenciación del gen ribosomal *16S* (3). La secuencia genómica completa de *B. infantis* IM-1® se obtuvo utilizando la tecnología de secuenciación a tiempo real molécula única de ADN (SMRT) de PacBio, lo que permitió un análisis de la actividad funcional del genoma del probiótico y su caracterización genotípica definitiva (4).

ESTUDIOS PRECLÍNICOS EN LÍNEAS CELULARES

Se realizaron estudios de la capacidad de *B. infantis* IM-1® de inhibir la replicación del rotavirus Wa y de la capacidad

de proteger las células de la infección por el virus en líneas celulares MA-104 y HT-29, así como de la capacidad para desplazar e impedir la adhesión de diferentes patógenos bacterianos a HT29 en presencia de galactooligosacáridos (GOS) (3,5).

PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA ACTIVA FRENTE AL ROTAVIRUS

La estrategia utilizada para identificar el principio activo frente a rotavirus comenzó con su purificación a partir del sobrenadante de *B. infantis* IM-1®. Se seleccionaron fracciones de fase inversa para ensayos de inhibición de rotavirus. Todas las fracciones que inhibieron la infección en cultivo celular del rotavirus fueron analizadas por MALDI-TOF para obtener su huella peptídica y determinar los pesos moleculares de los péptidos presentes en cada fracción (6).

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIROTAVIRAL DE *B. INFANTIS* IM-1® *IN VIVO*

Se utilizaron dos grupos de nueve ratones BALB/c de 8 semanas de edad. En el grupo control cada ratón se trató con una dosis de 100 µl de tampón bicarbonato de sodio (0,2 M). El grupo experimental recibió una dosis por vía oral de 10⁹ UFC de *B. infantis* IM-1® resuspendidas en 100 µl del mismo tampón. Después de la primera semana, en el grupo experimental se le administró una dosis de refuerzo de probiótico a cada ratón de forma repetida durante los siguientes 4 días. Posteriormente se inoculó oralmente con 100 DD50 de virus murino McN en 50 µl de solución salina equilibrada de Earle a todos los ratones de ambos grupos y se recolectaron las heces de cada animal diariamente durante los siguientes 9 días para evaluar la presencia de *Bifidobacterium* y la excreción viral por ELISA (3).

ESTUDIOS CLÍNICOS

Se realizó un ensayo clínico controlado, aleatorizado, multicéntrico y doble ciego en el que los lactantes alimentados con fórmula (≥ 3 meses) recibieron una fórmula infantil suplementada (probiótico) o no (control) con 10⁷ UFC/g de *B. infantis* IM-1® durante 12 semanas. Se evaluaron los episodios de diarrea, el crecimiento, los síntomas digestivos y la presencia de bifidobacterias en las heces (7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aisló una nueva cepa de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* en las heces del lactante, que fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) como *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 y designada comercialmente como *B. infantis* IM-1®. Esta novedosa cepa posee

las principales propiedades requeridas en un probiótico, como resistencia a los jugos gastrointestinales, sales biliares, NaCl y bajo pH, así como buena adherencia a las células epiteliales del intestino y sensibilidad a los antibióticos. Su seguridad alimentaria se ha confirmado por la ausencia de producción de metabolitos indeseables y en estudios de ingestión aguda en ratones inmunodeprimidos (3). La obtención de la secuencia completa de su genoma ha permitido identificarla genotípicamente y descartar la presencia de marcadores de resistencia a antibióticos susceptibles de ser transferidos, así como de marcadores genéticos de virulencia o de actividades metabólicas indeseables (4).

Los estudios *in vitro* en células MA-104 y HT-29 evidencian que *B. infantis* IM-1[®] es capaz de inhibir la replicación del rotavirus Wa (hasta un 36,05 % de reducción de focos infecciosos) y también de proteger las células epiteliales de la infección del virus (hasta un 48,50 % de reducción de focos infecciosos).

En un modelo de ratón BALB/c de infección por rotavirus se evidenció que el consumo de *B. infantis* IM-1[®] proporcionaba una protección preliminar *in vivo* contra la infección por rotavirus murino McN, lo que producía un retraso en la infección y una aceleración en la recuperación de la infección al acelerarse la eliminación de partículas víricas en las heces de los animales (3).

Mediante digestiones con proteasa del sobrenadante de *B. infantis* IM-1[®] pudo revelarse tanto la naturaleza proteica del principio activo como el hecho de que la molécula responsable de inhibir la replicación del rotavirus se liberaba al sobrenadante. Tras purificar por cromatografía de intercambio catiónico el sobrenadante, se obtuvieron fracciones activas y se consiguió identificar el compuesto funcional producido por *B. infantis* IM-1[®] responsable de dificultar la replicación del rotavirus tanto *in vitro* como *in vivo*. El compuesto funcional se identificó como un péptido de 11 aminoácidos (MHQPHQPLPPT, denominado péptido 11-mer), con una masa molecular de 1282 KDa. La funcionalidad de 11-mer se verificó usando el péptido sintetizado en infecciones por rotavirus Wa, Ito y VA70 de las líneas celulares HT-29 y MA-104. Finalmente, se detectó actividad proteasa en el sobrenadante de *B. infantis* IM-1[®], responsable de la liberación del péptido 11-mer. En este mismo estudio pudo identificarse de forma preliminar la proteasa implicada (6).

La evaluación de la capacidad de *B. infantis* IM-1[®] de utilizar diferentes oligosacáridos o mezclas de oligosacáridos permitió determinar que de los oligosacáridos utilizados los galactooligosacáridos (GOS) y las mezclas que contienen GOS eran los que más aumentaban el crecimiento de *B. infantis* IM-1[®]. La combinación simbiótica, GOS junto con *B. infantis* IM-1[®], se utilizó para examinar la actividad antimicrobiana en experimentos de cocultivo frente a *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Cronobacter sakazakii*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*. La combinación simbiótica inhibió el crecimiento de *C. difficile*, pero no logró inhibir a *E. coli* mientras *B. infantis* IM-1[®] por sí solo sin concurso de los GOS consiguió disminuir el crecimiento de *C. sakazakii* en cocultivo. Los experimentos de adhesión utilizando la línea celular intestinal HT29 mostraron

que la cepa *B. infantis* IM-1[®] fue capaz de desplazar algunos patógenos de la capa de enterocitos, especialmente *C. sakazakii* y *S. enterica*, e impidió la adhesión de *C. sakazakii* y *S. sonnei* (5). Estudios posteriores en modelos porcinos de infección han permitido corroborar la eficacia de *B. infantis* IM-1[®] en la disminución de la sintomatología de las infecciones causadas por *E. coli* y *S. enterica*, así como en la aceleración de la recuperación en los animales infectados que habían consumido este probiótico (8-11).

En el ensayo clínico controlado, aleatorizado, multicéntrico y doble ciego realizado para determinar si una fórmula infantil suplementada con el probiótico *B. infantis* IM-1[®] era eficaz para reducir la incidencia de diarrea en lactantes sanos nacidos a término, del total de 97 (control) y 93 (probiótico) bebés fueron aleatorizados, y 78 (control) y 73 (probiótico) completaron el seguimiento de 12 semanas. En el periodo de estudio general, se observó una mediana de $0,29 \pm 1,07$ y $0,05 \pm 0,28$ eventos de diarrea/niño en los grupos de control y probiótico, respectivamente ($p = 0,059$). Esta tendencia a menos episodios de diarrea en el grupo de probióticos alcanzó significación estadística a las 8 semanas ($0,12 \pm 0,47$ frente a $0,0 \pm 0,0$ eventos/bebé, $p = 0,047$). La incidencia de estreñimiento fue mayor (OR 2,67, 1,09-6,50) y la frecuencia de las deposiciones fue menor ($2,0 \pm 1,0$ frente a $2,6 \pm 1,3$ deposiciones al día, $p = 0,038$) en el grupo de control después de 4 semanas. No se encontraron diferencias en otros puntos de tiempo ni en otros síntomas digestivos, crecimiento o ingesta de fórmula (7).

CONCLUSIONES

En general, estos resultados demuestran que *B. infantis* IM-1[®] puede considerarse un probiótico capaz de inhibir la infección por rotavirus en estudios *in vitro* e *in vivo* y de inhibir el crecimiento de patógenos gastrointestinales como *C. difficile* y *C. sakazakii*. Asimismo, es capaz de desplazar algunos patógenos de la capa de enterocitos, especialmente *C. sakazakii* y *S. enterica*, e impidió la adhesión de *C. sakazakii* y *S. sonnei*. La suplementación de una fórmula infantil con *B. infantis* IM-1[®] puede reducir los episodios de diarrea. Es segura, se tolera bien y se asocia con una menor prevalencia de estreñimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dian Z, Sun Y, Zhang G, Xu Y, Fan X, Yang X, et al. Rotavirus-related systemic diseases: clinical manifestation, evidence and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* 2021;47(5):580-95. DOI: 10.1080/1040841X.2021.1907738
2. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17083. DOI: 10.1038/nrdp.2017.83
3. Moreno-Muñoz JA, Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Ramón D, Genovés S, et al. Novel probiotic Bifidobacterium longum subsp. infantis CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Appl Environ Microbiol* 201;77(24):8775-83. DOI: 10.1128/AEM.05548-11
4. Chenoll E, Rivero M, Codoñer FM, Martínez-Blanch JF, Ramón D, Genovés S, et al. Complete Genome Sequence of Bifidobacterium longum subsp. infantis Strain CECT 7210, a Probiotic Strain Active against Rotavirus Infections. *Genome Announc* 2015;3(2):e00105-15. DOI: 10.1128/genomeA.00105-15

5. Ruiz L, Flórez AB, Sánchez B, Moreno-Muñoz JA, Rodríguez-Palmero M, Jiménez J, et al. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 (*B. infantis* IM-1[®]) Displays In Vitro Activity against Some Intestinal Pathogens. *Nutrients* 2020;12(11):3259. DOI: 10.3390/nu12113259
6. Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Buesa J, Ramón D, Genovés S, et al. Identification of a Peptide Produced by *Bifidobacterium longum* CECT 7210 with Antiviral Activity. *Front Microbiol* 2016;7:655. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00655
7. Escribano J, Ferré N, Gispert-Llaurado M, Luque V, Rubio-Torrents C, Zaragoza-Jordana M, et al. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210-supplemented formula reduces diarrhea in healthy infants: a randomized controlled trial. *Pediatr Res* 2018;83(6):1120-8. DOI: 10.1038/pr.2018.34
8. Barba-Vidal E, Castillejos L, López-Colom P, Rivero Urgell M, Moreno Muñoz JA, Martín-Orúe SM. Evaluation of the Probiotic Strain *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 Capacities to Improve Health Status and Fight Digestive Pathogens in a Piglet Model. *Front Microbiol* 2017;8:533. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00533
9. Barba-Vidal E, Castillejos L, Roll VFB, Cifuentes-Orjuela G, Moreno Muñoz JA, Martín-Orúe SM. The Probiotic Combination of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BPL6 Reduces Pathogen Loads and Improves Gut Health of Weaned Piglets Orally Challenged with *Salmonella Typhimurium*. *Front Microbiol* 2017;8:1570. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01570
10. Rodríguez-Sorrento A, Castillejos L, López-Colom P, Cifuentes-Orjuela G, Rodríguez-Palmero M, Moreno-Muñoz JA, et al. Effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001, Combined or Not with Oligofructose-Enriched Inulin, on Weaned Pigs Orally Challenged with *Salmonella Typhimurium*. *Front Microbiol* 2020;11:2012. DOI: 10.3389/fmicb.2020.02012
11. Rodríguez-Sorrento A, Castillejos L, López-Colom P, Cifuentes-Orjuela G, Rodríguez-Palmero M, Moreno-Muñoz JA, et al. Effects of the Administration of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and Their Synbiotic Combination with Galacto-Oligosaccharides Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 in an Early Weaned Piglet Model. *Front Microbiol* 2021;12:642549. DOI: 10.3389/fmicb.2021.642549