



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

# PROBIOTICOS EN PEDIATRIA

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA MEDICA  
P R E S E N T A :  
DR. JESÚS HUGO GONZÁLEZ MERCADO

TUTOR TESIS:  
DRA. MIRELLA VAZQUEZ RIVERA



MÉXICO, D.F.

2010

# PROBIOTICOS EN PEDIATRIA



DR. GUILLERMO SOLOMON SANTIBAÑEZ  
DIRECTOR GENERAL  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE  
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA



DR. JOSE N. REYNES MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DRA. MIRELLA VAZQUEZ RIVERA  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y  
POSGRADO.  
TUTOR DE TESIS



## PROBIOTICOS EN PEDIATRIA

### INDICE

1.- INTRODUCCION.....	2
2.- DESARROLLO DE LA FLORA INTESTINAL.....	4
3.- COMPOSICION DE LOS PROBIOTICOS.....	6
4.- CLASIFICACION DE LOS PROBIOTICOS.....	7
5.- MECANISMO DE ACCION.....	8
6.- DIARREA AGUDA.....	9
7.- DIARREA ASOCIADA A USO DE ANTIBIOTICOS.....	10
8.- ENTEROCOLITIS NECROSANTE.....	11
9.- FUNCION INMUNITARIA DE LOS PROBIOTICOS.....	12
10.- COLICO DEL LACTANTE.....	14
11.- ESTREÑIMIENTO.....	14
12.- USOS EN ESTUDIO.....	14
13.- DOSIS.....	15
14.- SEGURIDAD.....	15
15.- CONCLUSIONES.....	15
16.- REFERENCIAS.....	17

## INTRODUCCION.

La importancia de la micro flora intestinal ha sido tomada en cuenta en los últimos años, particularmente con respecto a las vías en las cuales el microambiente puede ser manipulado para mejorar la salud, esto ha sido facilitado por el desarrollo de métodos moleculares de análisis de las complejas comunidades bacterianas.

El concepto de probióticos se estableció a principio del siglo pasado en el Instituto Pasteur con el trabajo de Metchnikoff, siendo la hipótesis que la ingesta de leche fermentada o sus derivados tenía efectos benéficos en la salud. (1) El término probiótico (del griego pro "para" y biosis "vida") se introdujo en 1965 al referirse a las sustancias que favorecen el crecimiento bacteriano y que promueven una flora intestinal saludable.(2) En la actualidad en base a investigaciones acerca de su función se han definido como especies bacterianas que colonizan y se replican en el tracto gastrointestinal dando beneficio al huésped.(1)

Al nacimiento, el intestino es estéril. El tracto digestivo provee un excelente ambiente para el crecimiento bacteriano, con un mínimo de oxígeno y lleno de nutrientes. El epitelio intestinal contiene mucinas y compuestos proteínicos glicosilados que funcionan como sitios de adherencia de bacterias, colaborando en la asistencia o inhibición de las mismas para invadir la mucosa intestinal, además de producir antígenos de superficie. Algunos probióticos tienen la capacidad de estimular genes de mucinas para modular la flora bacteriana intestinal. (1)

La colonización comienza inmediatamente posterior al nacimiento mediante interacciones complejas con el medio ambiente, siendo la flora materna el primer contacto. Existe flora significativamente diferente en pacientes obtenidos vía vaginal y aquellos obtenidos por cesárea (1,2). Se ha determinado que la leche materna no es estéril y dentro de sus componentes se encuentran bacterias del medio ambiente materno, influyendo factores genéticos, raciales y demográficos entre otros (3). Inicialmente se coloniza el tracto gastrointestinal por bacterias gram-positivas, particularmente lactobacilos, estreptococos, enterococos, lactococos y bifidobacterias. (1)

Al nacimiento se establecen algunos anaerobios facultativos como enterobacterias, coliformes y lactobacilos, posterior a la ingesta de fórmula maternizada y leche materna se desarrollan lactobacilos acidophilus, L gasseri, y L johnsonii; sin embargo en los alimentados en forma exclusiva al seno materno predominan Bifidobacterium breve, B infantis y B longum. Las bacterias nativas deben desarrollarse en el tracto gastrointestinal sin provocar una respuesta inmunológica adversa, siendo esto un evento complejo que se completa en el primer año y permanece estable durante la vida. Gracias al reconocimiento de las bacterias nativas por el sistema

inmune, se establecen muestras de antígenos patógenos contribuyendo a la defensa del tracto gastrointestinal por gérmenes patógenos. (1,3)

Se han identificado ingredientes no digeribles que estimulan el crecimiento y la actividad de bacterias, llamados prebióticos; siendo principalmente carbohidratos de los cuales predominan los oligosacáridos (galacto-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos). El calostro contiene altos niveles de fructo-oligosacáridos que parecen estimular la colonización bacteriana selectiva con bifidobacterias. (4)

Los mecanismos de acción de los probióticos incluyen la fermentación de carbohidratos con producción de ácidos grasos de cadena corta que proporcionan una acción anti-inflamatoria y calórica, síntesis de vitaminas como Vitamina B12, interfieren en la adhesión a la mucosa intestinal de bacterias patógenas, mantienen la función normal de los macrófagos, aumentan la secreción intestinal de IgA, facilitan la eliminación de toxinas, aumentan la expresión de genes de mucina lo cual aumenta y fortalece la unión de células del epitelio intestinal, proveen un ambiente favorable para el crecimiento de otras bacterias benéficas.(5,6,7,8)

Diversos estudios han demostrado que la administración oral de lactobacilos y bifidobacterias no aumenta el riesgo de enfermedad aun en pacientes inmunocomprometidos (9). Sin embargo se debe tener cuidado al administrar probióticos ya que cuentan con funciones de gérmenes oportunistas que deberán vigilarse. (10,11,12,13,14)

La enterocolitis necrosante es la complicación gastrointestinal más frecuente y grave en la etapa neonatal (15). A pesar de no conocer la causa exacta que la origina, la enterocolitis necrosante resulta de una lesión a la mucosa intestinal secundaria a varios factores que llevan a la pérdida de la integridad de la mucosa intestinal inmadura. Con los sustratos en la luz intestinal provenientes de la alimentación, las bacterias proliferan invadiendo la mucosa intestinal dañada, produciendo inflamación y finalmente necrosis de las áreas afectadas. Diversas estrategias para prevenir se han implementado, la mayoría de ellas de forma experimental y de manera observacional. (7)

Se ha encontrado la presencia de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal de neonatos de muy bajo peso al nacer solo hasta la tercera semana de vida, y no antes (5,8,9). En el caso de lactobacilos solo se han aislado en heces en menos del 5% de pacientes con muy bajo peso al

nacer, y después del primer mes de vida (16). Algunas medidas preventivas para el desarrollo de enterocolitis necrosante en pacientes pretermino se basan en la integración de probióticos de manera temprana en la alimentación del paciente.(17,18,19)

El crecimiento bacteriano patógeno es el efecto adverso más común en el uso de antibióticos y una de las indicaciones más comunes para el uso de probióticos. Aproximadamente el 20% de los pacientes que reciben antibióticos presentan este problema, que es asociado al aumento del número de internamientos, mayor costo médico, mayor riesgo de contraer infecciones nosocomiales. Algunos probióticos han demostrado disminuir el número de deposiciones asociadas con el uso de antibióticos.

Los probióticos han demostrado utilidad en la curación de la diarrea aguda de diversa etiología, siendo su mayor beneficio demostrado en el acortamiento de la duración y el número de evacuaciones en diarrea secundaria a rotavirus.

Los probióticos interfieren en la regulación del desarrollo del sistema inmunológico en la infancia por lo que se han estudiado en enfermedades como la dermatitis atópica en la cual han mostrado mejoría significativa, además se ha demostrado su uso en el control del cólico infantil, así como adyuvantes en el tratamiento del síndrome de colon irritable y la constipación, siendo investigados en diversos padecimientos como el acné, gingivitis y la enfermedad de Crohn sin hasta el momento contar con estudios suficientes para su recomendación.

A continuación se realiza una extensa revisión de la literatura sobre el uso de los probióticos en pacientes pediátricos.

## DESARROLLO DE LA FLORA INTESTINAL.

La colonización microbiana se inicia inmediatamente después del nacimiento, a partir de la flora intestinal materna y microorganismos del medio ambiente. Los recién nacidos presentan una secuencia de colonización, siendo la primera fuente de microorganismos la flora materna vaginal y fecal que generalmente es ingerida en el nacimiento; primero se colonizan con enterobacterias y cocos gram positivos, las bacterias anaerobias llegan al segundo día de vida: posteriormente las bifidobacterias comienzan a predominar cuando los niños son alimentados con leche materna o leches artificiales. El establecimiento de *Bacteroides* sp ocurre durante la primera semana de vida a diferencia de los lactobacilos que aparecen un poco más tarde: luego se establece un equilibrio en el micro hábitat intestinal entre los diferentes microorganismos presentes.(20,21)

Después de la ablactación la composición de la flora intestinal se hace más compleja y se va pareciendo a la del adulto. La flora intestinal previene y limita el crecimiento excesivo de patógenos intestinales y por otro lado la presencia de antígenos de la flora intestinal normal estimula una respuesta inmune local y sistémica la cual incluye diferentes inmunoglobulinas principalmente tipo A.

Las bifidobacterias son los microorganismos predominantes en las evacuaciones de los lactantes alimentados con leche materna; son microorganismos anaerobios que fermentan glucosa, galactosa, fructosa, esta fermentación genera acidez intestinal que inhibe el desarrollo de bacterias patógenas. El patrón adulto de la flora intestinal es muy complejo y consta con más de 400 especies bacterianas. Los lactobacilos constituyen parte de la flora intestinal normal de los humanos.

Posterior al nacimiento, la exposición a ingredientes de alimentos no digeribles como carbohidratos del tipo de fibras orgánicas así como oligosacáridos no absorbibles de los cuales destacan los galacto-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y los xylo-oligosacáridos que en conjunto son nombrados prebióticos, estimulan el crecimiento y la actividad de algunas bacterias. El calostro contiene niveles altos de fructo-oligosacáridos lo cual parece estimular de manera selectiva la colonización con bifidobacterias predominantemente en el niño alimentado al seno materno. Además se ha observado que los bajos niveles de hierro altamente biodisponible contribuye a la colonización por *Bifidobacterium breve*, *B. infantis* y *B. Longum*, así como de *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasserii*, y *L. johnsonii*. Los niños alimentados a base de formulas maternizadas desarrollan preferentemente probióticos del tipo de clostridia y enterobacterias.(22,23)

En el adulto, la flora aeróbica predomina en el tracto gastrointestinal superior, con anaerobios estrictos en el intestino delgado. El número de bacterias también es diferente en las diversas porciones del intestino con un promedio de  $10^3$  bacterias/ml en el duodeno hasta  $10^{11}$  bacterias/ml en el colon. En total el promedio de bacterias en el intestino es alrededor de 10 trillones, divididos en 500 especies diferentes aproximadamente.(24) Las especies pueden variar notablemente entre las personas, siendo la causa principal la edad, sin embargo la mayoría contiene las especies más comunes como lo son:

- Bacteroides
- Bifidobacterias
- Fusobacterias
- Eubacterias
- Lactobacilos
- Peptoestreptococos
- Clostridia
- Escherichia
- Veionella

El mecanismo primario que previene el sobrecrecimiento bacteriano a todas las edades es la peristalsis intestinal que proyecta el contenido del intestino distalmente hacia el colon, además la

producción y secreción de abundantes cantidades de IgA en el intestino previene la proliferación bacteriana. Algunas de las especies de lactobacilos y bifidobacterias poseen beneficios al promover la salud y ayudar en la resistencia de la colonización bacteriana patógena del tracto gastrointestinal. Las bacterias nativas estimulan el sistema inmune intestinal durante el primer año de vida.(25)

Algunos desbalances en la composición de la microflora intestinal se han investigado y se han correlacionado con el incremento en el riesgo de desarrollar diversas patologías, el número disminuido y la composición atípica de bifidobacterias se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades alérgicas, efectos adversos al administrar antibióticos, así como enfermedad inflamatoria intestinal en los niños. (26)

#### COMPOSICION DE LOS PROBIOTICOS.

Los prebióticos son definidos como alimentos no-digeribles, pero sí fermentables, que afectan al huésped, por estimulación selectiva del crecimiento y actividad de una especie de bacterias o un número limitado de ellas en el colon. Estimulan el crecimiento preferencial de un número limitado de bacterias, especialmente, aunque no exclusivamente, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Dentro de los prebióticos más frecuentes se encuentran los fructans-tipo inulina y las fructooligosacaridasas, ambos presentes en alimentos como el trigo, vegetales y frutas. Debido a su estructura son fermentados en el colon por bacterias endógenas hacia sustratos metabólicos y energéticos, dado su potencial osmótico y su excesiva fermentación algunos efectos adversos son la flatulencia, meteorismo, dolor o malestar abdominal, y diarrea. Se ha mostrado que las oligosacaridasas son efectivas en inhibir el crecimiento de *Clostridium difficile* y que la inulina puede reducir la duración de la diarrea.(27,28,29,)

Los probióticos son definidos como organismos que cuando son ingeridos en cantidades adecuadas ejercen un beneficio sobre el huésped. Debe de ser de origen humano, ser resistente a la destrucción por los ácidos gástricos y biliares, adherirse al epitelio intestinal y ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal por un corto periodo de tiempo. (30,31) Los mecanismos de acción de los probióticos se podrían deber a la capacidad de interferir con la adhesión e invasión de la flora bacteriana patógena, producción de bacteriocinas, inhibición de la translocación bacteriana y aumento de la función de la barrera epitelial a través de un aumento de la fosforilación de la actina y oclusión de las uniones intercelulares. Además de ha demostrado experimentalmente que los probióticos poseen la capacidad de modular la superficie de las células dendríticas y con esto la liberación de citocinas, lo que podría contribuir en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales.(32,33)

Los microorganismos que son probióticos en humanos incluyen levaduras, bacilos, *Escherichia coli*, enterococos, y los más comúnmente usados bifidobacterias y bacterias ácido lácticas tales como lactobacilos, lactococos y estreptococos.



Algunas características son esenciales y deseables en un probiótico.

1. Tener un efecto benéfico en el huésped.
2. No ser patógenos ni tóxicos.
3. Proteger contra microorganismos patógenos mediante un proceso de exclusión competitiva.
4. Secretar productos inhibitorios tales como ácidos o sustancias similares a los antibióticos.
5. Ser capaz de sobrevivir y ser metabolizado en el intestino.
6. Adherirse a la mucosa del epitelio intestinal.
7. Colonizar temporalmente sitios del tracto gastrointestinal.
8. Contribuir a la nutrición del huésped mediante, por ejemplo la producción de vitaminas.
9. Ser aislado de la misma especie en la que se pretende utilizar (humano).

El probiótico ideal debería también proteger contra cambios en la permeabilidad intestinal, manifestar efectos anticancerígenos como los encontrados con el *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*, así como ser capaces de estimular el sistema inmune del huésped.(34)

#### CLASIFICACION DE LOS PROBIOTICOS.

Los probióticos son definidos como organismos que cuando son ingeridos en cantidades adecuadas ejercen un beneficio sobre el huésped. Recientemente se ha mostrado que a través de la ingeniería es posible no sólo aumentar el efecto de cepas ya existentes, sino que también crear probióticos completamente nuevos. Las cepas de probióticos que más se han estudiado y utilizado se enumeran a continuación:

##### Lactobacillus.

- *L. acidophilus*.
- *L. bulgaricus*.
- *L. casei*. (rhamnosus)
- *L. johnsonii*.
- *L. lactis*.
- *L. plantarum*.
- *L. reuteri*

##### Bifidobacterium.

- *B. adolescentis*.
- *B. bifidum*.
- *B. breve*.
- *B. infantis*.
- *B. lactis*.
- *B. longum*.

Otras especies:

- *Bacillus cereus*.
- *Enterococcus faecalis*.
- *Escherichia coli*.
- *Saccharomyces boulardii*
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Streptococcus thermophilus*.

Aún existen algunas cepas en estudio en diversas aplicaciones clínicas las cuales se unirán a la lista de probióticos con utilidad en la salud.(35)

### MECANISMOS DE ACCION

Existe una gran variabilidad y supervivencia entre las diferentes especies y cadenas de bacterias. Típicamente, la bacteria que es ingerida viva y sobrevive a los ácidos gástricos tiene un gran efecto probiótico. El desequilibrio en la flora intestinal se asocia al desarrollo de síntomas, sin embargo es difícil confirmar esta asociación solamente por encontrar cambios en las bacterias fecales.(36)

Algunos probióticos residen en la luz intestinal, donde la concentración de carbohidratos es mayor. Otras bacterias se adhieren al enterocito. Esta adherencia a la bacteria es conocida como exclusión competitiva, que es el mecanismo de acción más importante de los probióticos. Actualmente la adherencia y la subsecuente estimulación del sistema inmune del intestino son los mecanismos de acción más estudiados. La competencia por los nutrientes esenciales, la producción de factores antimicrobianos y la alteración de las condiciones del medio ambiente como el pH son los mecanismos de acción más importantes propuestos de los probióticos. Algunos mecanismos de acción propuestos incluyen:

1. Interferencia con la adhesión.
2. Mantener la función normal de los macrófagos.
3. Incrementar la secreción de IgA.
4. Facilitar la eliminación de toxinas.
5. Regulación alta de genes de mucinas.
6. Proveer un medio ambiente favorable para el crecimiento de otras bacterias benéficas.

Las Bifidobacterias y Lactobacilos inhiben el crecimiento de organismos dañinos mediante la producción de ácido láctico, ácido acético y otros ácidos orgánicos. En el intestino grueso algunas otras funciones de los probióticos incluyen la fermentación de carbohidratos, con la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales proveen de acciones anti-inflamatorias y proporcionan calorías, así como la producción de vitaminas como la B12. (1)

Diferentes bacterias inducen diferentes respuestas inmunológicas. Las bacterias no patógenas desencadenan diferentes respuestas en las células epiteliales por medio de diversas citocinas,

induciendo efectos diferentes en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) así como en el sistema inmune adaptativo. Por medio de la interacción dinámica entre la flora intestinal y el GALT, el sistema inmunológico puede modificar sus acciones basados en los cambios en la dieta (por medio de prebióticos) y por la presencia de bacterias benéficas (los probióticos). (37).

#### DIARREA AGUDA.

La diarrea aguda es común en los niños y contribuye sustancialmente a la morbilidad y mortalidad pediátrica mundialmente. En los Estados Unidos se estima que de 21 a 37 millones de casos ocurren, 16.5 millones en niños menores de 5 años anualmente. Tres millones de visitas médicas por año se atribuyen a diarrea aguda, requiriendo el 13 % de manejo hospitalario.(38)

El uso de probióticos para la prevención y tratamiento de la diarrea aguda en niños ha sido extensamente estudiado. Un meta-análisis de 18 estudios concluyeron que la terapia con probióticos acorta la duración de la enfermedad diarreica aproximadamente por 1 día.(39) Un meta-análisis de 23 estudios ha confirmado que los probióticos parecen ser útiles como estrategia asociada a la hidratación en pacientes adultos y niños, con diarrea infecciosa, incluyendo aquellos por diarrea por Rotavirus. (40).

La colonización competitiva es una de las principales razones de la efectividad del *Lactobacillus* GG (LGG) en infecciones intestinales.LGG se une al epitelio enteral, inhibiendo la adhesión de patógenos, lo cual ha sido demostrado in vitro contra *E. Coli* O157:H7. LGG compete con otras bacterias por el consumo de monosacáridos, lo que disminuye su crecimiento. Estas características parecen ser las responsables de la efectividad de LGG en colitis por *Clostridium difficile*, además otros probióticos llegan a bloquear la toxina A por medio de procesos enzimáticos contra *C. difficile*.(41)

En pacientes hospitalizados por cuadros de diarrea por rotavirus se demostró que el uso de *Lactobacillus* cepa GG, reduce la severidad (por 1.6 deposiciones al día) y la duración (por 0.7 días), sin embargo tales datos parecen insuficientes para aconsejar su uso rutinario.

Los mecanismos de acción mediante los cuales estas sustancias podrían resultar útiles en el tratamiento de las diarreas agudas son.

- Producción de sustancias antimicrobianas, que inhiben un gran número de bacterias patógenas, así como peróxido de hidrogeno que tiene una función bactericida.
- Competencia por nutrientes, consumo de monosacáridos por los probióticos.
- La resistencia a la colonización ocurre inhibiendo la adhesión bacteriana y disminuyendo la permeabilidad intestinal.
- Modificación de los receptores de toxinas, mediante un mecanismo de inhibición enzimática.
- Mejoramiento del sistema inmune, gracias a la habilidad de unirse a células epiteliales se puede estimular la producción de anticuerpos benéficos.

Actualmente se analizan estudios para determinar la utilidad de la administración de los probióticos de manera preventiva para evitar el desarrollo de diarrea aguda de diversas etiologías.(34)

#### DIARREA ASOCIADA A USO DE ANTIBIOTICOS.

La diarrea asociada a antibióticos resulta de un desequilibrio en la flora endógena como resultado de la terapia antimicrobiana. La diarrea es una complicación común del tratamiento antimicrobiano y llega a ocurrir entre 5 y 39% de los pacientes, dando como resultado estancia hospitalaria más prolongada, incremento en la incidencia de otras infecciones nosocomiales, así como aumento en los costos del tratamiento. Aunque la patogénesis no es comprendida en su totalidad, se postula que la ruptura de la flora fecal normal lleva a sobrecrecimiento de patógenos oportunistas, así como alteración en la función metabólica de la flora y consecuentemente diarrea. *C. difficile* es responsable de aproximadamente 26% a 50% de los casos.(42)

Algunos casos de diarrea asociada a antibióticos se relacionan con el sobrecrecimiento de *Clostridium difficile*, un gram-positivo, anaerobio formador de esporas. La incidencia en hospitales de la unión americana es cercana al 1.2% en pacientes hospitalizados, siendo en forma muy severa hasta en el 3.2% de los casos. Hasta 40% de los pacientes hospitalizados se encuentran colonizados por *C. difficile*, un incremento en las complicaciones se ha visto en pacientes mayores de 65 años. El uso de fluoroquinolonas ha mostrado un incremento en la presentación de especies de *C. difficile* multiresistente productora de toxina A y B.

Diferentes especies de probióticos han sido estudiadas como agentes preventivos de diarrea asociada al uso de antibióticos, siendo las especies de *Sacharomyces boulardii* y *Lactobacillus rhamnosus* las que mejores resultados muestran como preventivos en los estudios controlados aleatorizados.(43)

Arvola et al, aleatorizaron 119 niños bajo tratamiento antimicrobiano para infección respiratoria para tomar *L. casei* *rhamnosus* (LGG) contra placebo encontrando una reducción de 2/3 en la incidencia con relación al grupo placebo durante las primeras 2 semanas del inicio del antibiótico. Vaanderhoof et al, aleatorizaron 202 niños bajo tratamiento de antibiótico oral, a recibir LGG contra placebo encontrando una reducción en la incidencia de diarrea de 26% a 8%.(44,45)

En pacientes hospitalizados que reciben B-lactámicos, la diarrea asociada al uso de antibióticos se reporto en el 7% de los pacientes que usaron *S. boulardii* como profiláctico a diferencia del 15% de los pacientes que usaron placebo, también se mostro mejoría en los pacientes alimentados por sonda, así como en los que recibieron tratamiento de erradicación para *Helicobacter pylori*. En pacientes bajo manejo antimicrobiano ambulatorio la diarrea asociada a uso de antibióticos en pacientes que recibían *S. boulardii* fue del 4% en comparación al 17% de los pacientes bajo placebo.(46,47)

No se han demostrado hasta el momento que las combinaciones de probióticos administrados conjuntamente reduzcan de manera más significativa la incidencia de diarrea asociada a uso de antibióticos.

## ENTEROCOLITIS NECROSANTE.

La enterocolitis necrosante (EN) es un desorden neonatal adquirido que representa la expresión final proveniente de una lesión intestinal severa provocada por alteraciones a nivel vascular, de mucosa y metabólicos en el intestino inmaduro.

Es una alteración predominante en el recién nacido pretermino, con una incidencia de 6-10% en recién nacidos con peso menor a 1.5kg. La incidencia incrementa con menor edad gestacional. Representan hasta el 2-5% de los ingresos a la unidad de cuidados intensivos neonatales.

Actualmente no existe una teoría única acerca de la patogénesis de la EN que explique satisfactoriamente las observaciones clínicas asociadas a este padecimiento. La fisiopatología generalmente aceptada consiste en una secuencia de eventos que inician con una lesión isquémica o tóxica a la mucosa intestinal con pérdida de la integridad de la misma, posteriormente una proliferación bacteriana asociada a organismos productores de gas (metano e hidrógeno) instalándose de manera intramural (neumatosis), generando necrosis transmural y gangrena intestinal con la posterior perforación intestinal y la subsecuente peritonitis. (48)

El intestino es prácticamente estéril al nacimiento, sin embargo se coloniza rápidamente, dentro de las primeras 24 hrs de vida extrauterina las enterobacterias son detectadas, siendo la flora materna y la flora ambiental los proveedores. Los recién nacidos alimentados con fórmulas maternas se colonizan por enterobacterias, coliformes y bacteroides principalmente así como por bifidobacterias, a diferencia de los alimentados con leche materna los cuales se colonizan por bifidobacterias y lactobacilos principalmente.

En pacientes con cuidados intensivos de término las bifidobacterias aparecen tempranamente a los 4 días de vida, en contraste con los pacientes prematuros en los cuales se llegan a detectar hasta 11 a 20 días posteriores al nacimiento posiblemente asociado a la pobre ingesta láctea de los prematuros. Este retraso en la colonización de la microflora puede contribuir al sobrecrecimiento de otros organismos potencialmente patógenos.

Además del retraso en la colonización normal de los pacientes prematuros con lactobacilos y bifidobacterias se cuenta con el uso de antibióticos, procesos para control de infecciones como el lavado de manos, la reducida exposición a la flora materna, alimentación dentro de las incubadoras, así como el uso de alimentos estériles lo que limita el desarrollo de microflora comensal normal. El resultado del patrón anormal de colonización en el paciente prematuro es generar un reservorio de bacterias resistentes a antibióticos, con el subsecuente desarrollo de complicaciones como la EN.(2,3)

Los probióticos regulan la permeabilidad intestinal, incrementan la barrera mucosa hacia bacterias o productos bacterianos, regulan favorablemente el sistema inmune intestinal y sistémico, degradan proteínas y carbohidratos, aumentan la producción de citocinas anti-inflamatorias, y normalizan la microecología intestinal., por lo cual han sido estudiados para el manejo complementario o preventivo de la EN(49)

Bin-Nun y colegas aleatorizaron 155 prematuros con peso al nacimiento menor a 1500grs, para recibir formulas maternizadas suplementadas con probióticos de las especies *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium bifidus* o formula estándar. La incidencia de EN se disminuyo significativamente (4% vs 16%) en los pacientes que recibieron formulas maternizadas suplementadas. (50). Lin y colegas estudiaron 367 prematuros con peso menor a 1500grs, adicionaron una mezcla de *L acidophilus* y *Bifidobacterium infantis* a la leche materna, encontrando que el riesgo de EN se redujo significativamente en el grupo tratado con respecto al control (180 pacientes en el grupo tratado vs 187 en grupo control).(51)

#### FUNCION INMUNITARIA DE LOS PROBIOTICOS.

Las enfermedades alérgicas en la infancia se han incrementado problemáticamente. Se estima que la dieta moderna contiene menos bacterias que las dietas pasadas. La "hipótesis de la higiene" sugiere que la disminución en la exposición a microbios que estimulan el sistema inmune durante la infancia temprana es una explicación para el incremento en la prevalencia de las alergias y asma.(52)

El descontrol en la regulación del sistema inmune parece ser la causa, sin embargo, el mecanismo exacto no se ha comprendido por completo. La exposición microbiana es la señal ambiental más fuerte para la maduración postnatal del sistema inmune, además de inducir maduración de las células presentadoras de antígenos y de las células T regulatorias que son esenciales para la programación y regulación de las respuestas de células T. Parece que la activación de vías regulatorias mediante la exposición a microbios por medio del reconocimiento de ciertas moléculas como los receptores tipo Toll juega un rol central en la reducción del riesgo de enfermedades mediadas inmunológicamente, como lo son las alergias mediadas por Th2 o las enfermedades autoinmunes mediadas por Th1. Las respuestas inmunes alérgicas son causadas por una acción anormal de los linfocitos Th2. La estimulación de los linfocitos Th2 produce sustancias proinflamatorias como las interleucinas (IL) 4 y 5, con estimulación de IgE y producción de eosinófilos. La exposición a bacterias inmediatamente posterior al nacimiento parece ser el principal regulador del sistema inmune dirigido hacia Th1 o Th2. La exposición a bacterias contenidas en la leche materna concentra la actividad hacia respuestas Th1, siendo menos comunes el desarrollo de reacciones alérgicas. Los estudios se han enfocado a la habilidad de las bacterias para prevenir las respuestas Th2 a los alérgenos y redirigir el sistema inmune a respuestas Th1.(53)

Actualmente se tiene evidencia de que ciertas cadenas de lactobacilos y bifidobacterias pueden influenciar la respuesta inmune mediante diferentes vías, incluyendo efecto modulador sobre enterocitos, células presentadoras de antígenos (monocitos y células dendríticas), células T reguladoras y células efectoras T y B. La microbiota intestinal tiene efecto anti-inflamatorio a nivel local, mediados aparentemente por receptores tipo Toll principalmente el tipo 9, 2 y 4 expresados en los enterocitos, además de promover la producción de factor de necrosis tumoral- B, y prostaglandina E2 los cuales promueven el desarrollo de células dendríticas genéticamente tolerantes. La producción de Ig-A se ve incrementada en sistemas distales como el respiratorio por efecto benéfico de la microbiota intestinal.(54)

Bjorksten y colegas demostraron diferente colonización entre niños con y sin alergias. Infantes de 2 años de edad alérgicos mostraron menor colonización por lactobacilos que los no alérgicos, además de que en los no alérgicos se encontró mayor número de coliformes y *Staphylococcus aureus*. Recientemente se encontró que niños alérgicos tienen colonización por especies de bifidobacterias que son más frecuentemente vistas en adultos.

La dermatitis atópica asociada a la alergia a la proteína de la leche de vaca en la infancia fue evaluada usando fórmula a base de hidrolizados con y sin probiótico LGG, aquellos que recibieron fórmula con probiótico mostraron mejoría significativa en la clasificación clínica de eczema, así como, cambios en los marcadores de inflamación intestinal. Se ha demostrado de LGG administrado junto con una dieta de eliminación a niños con dermatitis atópica a causa de alergia a leche de vaca, disminuyen IL4 e incrementan interferón, dirigiendo el sistema inmune a disminuir la inflamación.(55)

A pesar de que existen estudios que sugieren los efectos favorables de los probióticos en el tratamiento de la dermatitis atópica se requieren estudios controlados prolongados así como, con uso de varias cepas para determinar el rol de estos productos en la terapia. Por su falta de efecto de estos productos en otros individuos (asmáticos y pacientes con rinitis alérgica) se sugiere que su uso sea dirigido a los pacientes en la edad temprana antes de que la enfermedad alérgica se haya establecido. (54)

La prevención de la alergia en niños con historia familiar de atopia también ha sido estudiada. LGG fue administrado a mujeres embarazadas y a sus hijos hasta los 6 meses de edad quienes contaban con historia familiar de alergia demostrándose diferencia significativa en el desarrollo de eczema en el grupo tratada hasta los 2 años de edad. Se dio seguimiento longitudinal hasta los 4 años de edad, persistiendo el efecto protector de los probióticos, sin embargo no hubo reducción en el desarrollo de alergia respiratoria, niveles de IgE o sensibilización alérgica. Con los estudios actuales no es apropiado recomendar el uso de probióticos para la prevención de enfermedades alérgicas diferentes a la dermatitis atópica.(56)

## COLICO DEL LACTANTE.

El cólico del lactante es la patología pediátrica más común y una de las que más preocupa a los padres, su fisiopatología y causas desencadenantes aún no se han identificado por completo, por lo que la convierte en una entidad difícil de tratar. Se ha estudiado múltiples tratamientos, que van de lo farmacológico a lo cultural, en ocasiones involucrando modificaciones a la dieta materna. De los más estudiados se encuentran el uso de simeticona, administración de sucrosa, introducción de lactasa a la leche en pacientes que son intolerantes, uso de fórmulas lácteas hipoalérgicas, uso de herbolario, hasta el uso de simuladores para el paseo en carro de los niños sin lograrse un tratamiento exitoso.(57) La simeticona no ha mostrado eficacia significativa para el tratamiento del cólico del lactante, aún así se considera el tratamiento de elección. Se han realizado estudios con el uso de probióticos para su tratamiento. Savino y colaboradores administraron diez billones de unidades formadoras de colonias de *L. reuteri* diariamente a 41 lactantes alimentados al seno materno con criterios clínicos de cólico contra 60 mg de simeticona al día. Los efectos benéficos se identificaron a las 24 hrs con duración hasta 28 días de tratamiento en el grupo de probióticos, el promedio del tiempo de llanto se disminuyó hasta un 65%. Además 95% de los lactantes que reciben probióticos respondieron satisfactoriamente al control de sus síntomas en comparación con el 7% al que se le administró simeticona.

Aún falta realizar más estudios que comprueben la efectividad de los probióticos para el tratamiento del cólico del lactante, sin embargo el uso de probióticos se perfila para ser un tratamiento de elección en el control de esta patología.(58)

## ESTREÑIMIENTO.

El estreñimiento es un padecimiento frecuente en edad pediátrica, se ha estudiado el uso de probióticos como coadyuvante o tratamiento del mismo. Un estudio de Banaskiewicz y colaboradores en 84 niños de entre 2 a 16 años de edad a los cuales se les administró LGG contra placebo además de lactulosa mostró que ambos tratamientos eran igualmente eficaces controlando los síntomas en dos tercios de los pacientes tratados. Aún se realizan estudios para demostrar la utilidad de probióticos en esta área.(59)

## USOS EN ESTUDIO

Ante la diversidad de usos que se ha encontrado en los probióticos aún falta demostrar su real utilidad en algunas patologías. Actualmente existen beneficios probados de su utilidad en el tratamiento y prevención de la diarrea aguda en niños y en la prevención de la diarrea asociada al uso de antibióticos. Existe evidencia sustancial pero se necesita profundizar en el uso de probióticos para la prevención y tratamiento de las alergias, la prevención de la diarrea del viajero, la prevención de infecciones respiratorias en guarderías, prevención de la caries dental y la eliminación de la colonización nasal de bacterias potencialmente patógenas. Estudios que se encuentran en curso acerca de la utilidad de los probióticos en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y la prevención de recaídas, tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal y fibrosis quística, así



como en el tratamiento contra *Clostridium difficile*. Áreas futuras de estudio en humanos incluyen investigar sobre la utilidad de los probióticos en el tratamiento de la artritis reumatoide y el síndrome de colon irritable, en animales se experimenta sobre la utilidad en la prevención del cáncer, prevención de las complicaciones de enfermedades hepáticas y exposición a radiación, tratamiento de la diabetes, así como el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped.(60)

## DOSIS

Dada la amplia variedad de probióticos y sus combinaciones examinados en estudios clínicos es difícil establecer un lineamiento de la cantidad necesaria para su administración. Las dosis van desde millones de unidades formadoras de colonias por día hasta 600 billones de unidades (para pouchitis crónica) y 3.6 trillones de unidades (para remisión de colitis ulcerativa). La dosis utilizada de *Saccharomyces boulardii* en la mayoría de los estudios ha sido de entre 250 y 500 mg por día. LGG, *Bifidobacterium* sp y sus combinaciones con otras cadenas bacterianas administradas para la prevención y tratamiento de diarrea aguda han mostrado que dosis de entre 5 y 10 billones de unidades formadoras de colonias son recomendadas. Los probióticos se encuentran en varias presentaciones las cuales incluyen polvo, capsulas y líquidas, en la mayoría de los estudios clínicos se administraron cada 12 hrs sin embargo no existe evidencia que administrarlas una vez al día no sea adecuado. Se recomienda mantener en refrigeración las preparaciones de probióticos, en el caso de prevención de diarrea aguda, se deberá administrar de ser posible 2 horas antes o después del antimicrobiano. La adición de probióticos a alimentos no ha demostrado beneficios por su disminuida concentración, por lo que no se recomiendan como medida terapéutica.(61)

## SEGURIDAD

Los probióticos son generalmente bien tolerados y la frecuencia de efectos adversos ha sido descrita entre 0.05-0.4%. La administración oral de probióticos en lactantes y niños ha demostrado que no incrementa el riesgo de enfermedad incluso en pacientes inmunocomprometidos.(35) Como toda bacteria pueden ser oportunistas por lo que se deben conocer todas las características de los probióticos al momento de ser prescritos a los pacientes. Algunas bacterias productoras de ácido láctico pueden producir D-lactato además de L-lactato, el D-lactato es pobremente metabolizado en algunos pacientes lo que se puede asociar a varios síntomas neurológicos. (1)

## CONCLUSIONES

La flora gastrointestinal juega un rol complejo e importante en el desarrollo de una saludable función digestiva e inmunológica en niños. Entender ese rol y asistir el desarrollo de flora intestinal saludable (promoviendo la alimentación al seno materno y disminuyendo el uso de antibióticos cuando sea posible) es una importante función para los médicos que atienden niños.

Los probióticos son extremadamente seguros en niños sanos, y en aquellos inmunocomprometidos o severamente enfermos, las complicaciones significativas son raras.

Los probióticos son altamente efectivos en la reducción de la diarrea asociada a antibióticos, así como la disminución en la duración de diarrea aguda.

Los probióticos pueden ser efectivos en la prevención de la diarrea aguda y en la reducción de la enterocolitis necrosante en prematuros. Puede ser de ayuda en el tratamiento de la dermatitis atópica.

La especie o combinación de especies de probióticos más efectiva clínicamente no ha sido determinada, por ahora, la especie a utilizar parece ser menos importante que la obtención de la dosis adecuada.

Dosis alrededor de 5 a 10 billones unidades formadoras de colonias por día o más son apropiadas en la mayoría de las aplicaciones clínicas en niños.

Existe una gran variedad en la calidad de los probióticos en el mercado, los médicos deben familiarizarse con los productos de más alta calidad disponibles.

## REFERENCIAS.

- 1.- Vanderhoof JA, Young RJ. Pediatric applications of probiotics. *Gastroenterol Clin N Am* 2005; 34: 451-463.
- 2.- Hammerman C, Bin-Nun A, et al. Germ warfare: probiotics in defense of the premature gut. *Clin Perinatol* 2004; 31: 489-500.
- 3.- Dalidowitz C. Fortified breast milk safety. *J Am Diet Assoc* 2005; 105(10):1572-3.
- 4.- Uauy R. Novel oligosaccharides in human milk: understanding mechanism may lead to better prevention of enteric and other infections. *J Pediatr* 2004; 145:283-5.
- 5.- Huebner ES, Suwaricz C. Probiotics in the Prevention and Treatment of Gastrointestinal Infections. *Gastroenterol Clin N Am* 2006; 35: 355-365.
- 6.- Floch MH , Montrose DC. Use of Probiotics in Humans: An Analysis of the Literature. *Gastroenterol Clin N Am* 2005; 34:547-570.
- 7.- Reber KM, Nankervis CA. Necrotizing enterocolitis: preventative strategies. *Clin Perinatol* 2004; 31:157-167.
- 8.- Neu J. Probiotics: protecting the intestinal ecosystem. *J Pediatr* 2005; 147: 143-146.
- 9.- Alona BN, Bromiker R, Kaplan M, et al. Oral Probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 2005; 147:192-6
- 10.- Salminen MK, Rautelin H, Tynkkyen S, et al. Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L rhamnosus CG. *Clin Infect Dis* 2004;38:62-9.
- 11.- Salminen MK, Rautelin H, Tynkkyen S, et al. The efficacy and safety of probiotic Lactobacillus rhamnosus GC on prolonged, noninfectious diarrhea in HIV patients on antiretroviral therapy: a randomized, placebo-controlled, crossover study. *HIV Clin Trials* 2004;5:183-91.
- 12.- Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, et al. Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 2005;115:178-81.
- 13.- Kunz AN, Noel JM, Fairchok MP. Two cases of lactobacillus bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38: 457-8
- 14.- Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:365-74.
- 15.- Stoll B. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994; 21:205-19.
- 16.- Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1999; 80:F167-73.

- 17.- Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999; 117:577-83.
- 18.- Hoyos AB, Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of lactobacillus acidophilus and bifidobacterium infantis to neonates in an intensive care unit. *Int J Infect Dis* 1999;3:197-202.
- 19.- Millar M, Wilks M, Costeloe K. Probiotics for preterm infants? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F354-8
- 20.- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, et al. Analysis of the intestinal flora development in the breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30(1):61-7.
- 21.- Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32(4):439-42.
- 22.- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125(6):1401-12.
- 23.- Bode L, Beemann C, Mank M, et al. Human and bovine milk gangliosides differ in their fatty acid composition. *J Nutr* 2004;134(11): 30 16-20.
- 24.- Gibson GR, Roberfroid MB, editors. *Colonic microbiota, nutrition and health*. 1 st Edition. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht; 1999.
- 25.- Riordan SM, McIver CJ, Wakefield D, et al. Small intestinal mucosal immunity and morphometry in luminal overgrowth of indigenous gut flora. *Am J Gastroenterol* 2001;96(2):494-500.
- 26.- Bjorksten B, Sepp E, Julge K, et al. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:516-20.
- 27.- Van Loo J. Prebiotics promote good health: the basis, the potential, and the emerging evidence. *J Clin Gastroenterol* 2004;38(suppl 6): S70-5.
- 28.- Gnoth M, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. Human Milk oligosaccharides and minimally digested in vitro. *J Nutr* 2000; 130:3014-20.
- 29.- Roberfroid M. Prebiotics and probiotics: are they functional food?. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(suppl 6): S1682-7.
- 30.- Schrezenemeyer J, de Vrese M. Prebiotics, probiotics, and synbiotics- approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73:361S-4S.
- 31.- Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää, et al. Probiotics effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73:444S-50S.

- 32.- McCarthy J, O'Mahony L, O'Callagan L, et al. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine. *Gut* 2003; 52:975-80.
- 33.- Drakes M, Blanchard T, Czinn S. Bacterial probiótico modulation of dendritic cells. *Infect Immun* 2004;72: 3299-309.
- 34.- Mendoza A, Paulsen K, et al. Probióticos en Pediatría. *Rev Soc Bol Ped* 2004; 43:2.
- 35.- Quera R, Quigley E, et al. El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos en gastroenterología. *Gastr Latinoam* 2005; 16:218-228.
- 36.- Wollowski I, Rechkemmer G, et al. Protective rol of probiotics and prebiotics in colon cáncer. *Am J Clin Nutr* 2001;73 (suppl2): 45 1S-5S.
- 37.- Borruel N, Carol M, Casellas F, et al. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiótico bacteria. *Gut* 2002;51:659-64.
- 38.- Lactobacillus Therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis. Cornelius W, Feudtner C, et al. *Pediatrics* 2002;109:678-84.
- 39.- Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, et al. Efficacy of probiótico use in acute diarrhea in children. A meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2002;47(11):2625-34.
- 40.- Allen S, Okoko B, Martínez E, Gregorio G, Dans L. Probiotics for treating infectious diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (2): CD003048.
- 41.- Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, et al. *Saccharomyces Boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology* 1993;104:1108-15.
- 42.- McFarland LV. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic associated diarrhea. *Dig Dis* 1998;16(5):292-307.
- 43.- Warren I, Lee E, Koller MH. Probiotic for preventing and treating nosocomial infections. Review of current evidence and recommendations. *Chest* 2007;132.
- 44.- Arvola T, Lainho K, Torkkeli S, et al. Prophylactic *Lactobacillus GC* reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* 1999; 104:e64.
- 45.- Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. *Lactobacillus GC* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 1999;135:564-8.
- 46.- Suwaricz CM, Elmer, Speelman P, et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 1989;96(4):981-9.

- 47.- McFarland LV, Suwaricz CM, Greenberg RN, et al. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995;90(3):439-48.
- 48.- William W. Hay, Jr. *Lange Diagnostico y tratamiento pediatrico*. Decimoctava edición. 2008:38-39.
- 49.- Millar M, Wilks M, Costeloe K. Probiotics for preterm infants? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F354-8.
- 50.- Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 2005;147(2):192-6.
- 51.- Lin HC, Su BH, Chen AC, et al. Oral probiótico reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005;115(1):1-4.
- 52.- Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, et al. The hygiene hypothesis of atopic disease-an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38(4):378-88.
- 53.- Ramagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?. *Immunology* 2004;112(3):352-63.
- 54.- Prescott SL, Björkstén B. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(2): 255-63.
- 55.- Rosenfeldt V, Benefield E, Nielsen SD, et al. Effect on probiótico *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2):389-95.
- 56.- Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow up of a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-71.
- 57.- Herman Martin. The crying infant. *Emerg Med Clin N Am* 2007;25:1137-1159.
- 58.- Savino F, Pelle E, Palumeri E, et al. *Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. *Pediatrics* 2007;119:124-30.
- 59.- Banaszkiwicz A, Szajewska H. Ineffectiveness of *Lactobacillus GG* as an adjunct to lactulose for the treatment of constipation in children: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *J Pediatr* 2005;146(3):364-9.
- 60.- Shira D, Snyderman DR, Gorbach SJ. *Lactobacillus GG*: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterol Clin N Am* 2005;34:483-498.
- 61.- Kligler B, Hanaway P, Cohrssen A. Probiotic in children. *Pediatr Clin N Am* 2007:949-967.