



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**Instituto Nacional de Perinatología
“ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES”
Subdirección de Neonatología**

**MONOGRAFIA
“USO DE PROBIÓTICOS PARA LA PREVENCIÓN
DE ENTEROCOLITIS NECROSANTE EN RECIÉN
NACIDOS PRETÉRMINO CON PESO \leq 1500g.”**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

ESPECIALISTA EN NEONATOLOGÍA

PRESENTA

DRA. MARISOL CABANILLAS AYON

**DR. LUIS A. FERNÁNDEZ CARROCERA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION**

**DR. LUIS A. FERNÁNDEZ CARROCERA
DIRECTOR DE TESIS**



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

MONOGRAFIA
“USO DE PROBIÓTICOS PARA LA PREVENCIÓN DE
ENTEROCOLITIS NECROSANTE EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO
CON PESO \leq 1500g.”

DR. JOSE JORGE ESPINOZA CAMPOS
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DR. LUIS ALBERTO FERNÁNDEZ CARROCERA
SUBDIRECTOR DE NEONATOLOGIA

DR. LUIS ALBERTO FERNÁNDEZ CARROCERA
DIRECTOR DE TESIS



DEDICATORIA

A **Dios** por la vida y darme la oportunidad de continuar el camino.

A mis **Padres Rigoberto y Loren**, por su amor, confianza y apoyo incondicional, por entender las ausencias y soportar la distancia.

A mis **hermanos Rigoberto, José Francisco y Juan Carlos**, por su cariño, amistad y ayuda constante.

A mis sobrinos **Juan Carlos y Allison** por ser una chispa de alegría en mi vida.

A **Felipe** por coincidir en mi vida en este tiempo y lugar. Por acompañarme a disfrutar cada momento.

A todos los **Recién nacidos** que durante estos 2 años me permitieron acompañarlos en sus primeros momentos de vida y que fueron parte fundamental en mi formación.

Al **Dr. Luis A. Fernández Carrocera** por su asesoría, tiempo y paciencia para este trabajo, pero sobre todo por sus conocimientos.

A todos mis **compañeros residentes de Neonatología, en especial a mis amigos** por compartir el trabajo diario y por ser un apoyo constante.

A todo el **personal de enfermería** del área de Neonatología del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" por aportarme parte

de su experiencia en el cuidado de los Recién Nacidos, además de su amistad y confianza.



AGRADECIMIENTO

A todos aquellos bebés que se adelantaron a iniciar su camino por la vida y a aquellos que tuvieron un tropiezo en el inicio de ese camino, por permitirme ser un apoyo y por haber contribuido a mi formación.

A todos mis Maestros del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", por su disciplina, conocimientos y confianza.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 DEFINICIÓN, INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGIA	1
1.2 ETIOLOGIA	2
1.3 FISIOPATOLOGIA.....	4
1.4 PRESENTACION CLINICA Y DIAGNOSTICO.....	5
1.5 TRATAMIENTO.....	6
1.6 PREVENCION.....	7
2. PROBIOTICOS.....	8
2.1 ESTUDIOS REALIZADOS CON PROBIOTICOS.....	10
3 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	16
4. ANEXOS.....	19
5. PROTOCOLO DE INVESTIGACION.....	24

CAPITULO 1. INTRODUCCION

La enterocolitis necrosante (ECN) es un problema mundial que surgió en los pasados 25 años como la emergencia gastrointestinal mas común en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN).¹

Aunque la ECN fue descrita inicialmente en un reporte de un caso de perforación gastrointestinal en 1825 y 1891. En 1888, se reportaron 5 muertes secundarias a necrosis y perforación múltiple de segmentos largos de intestino. En 1953 Schmid y Quasier describieron la presentación clínica y más tarde Dossier en 1959. Pero no fue hasta mitad de 1960, con el advenimiento de las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales, cuando Santulli y cols. profundizan en este desorden llegando a reconocerla como una entidad clínica, incluyendo hallazgos clínicos y radiológicos, los cuales fueron publicados por Berdon y Mizrahi y colaboradores.^{2,3}

1.1 DEFINICIÓN, INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA.

La ECN es definida con una necrosis isquémica inflamatoria del intestino grueso o delgado, que involucra con mayor frecuencia íleon terminal, ciego y el colon ascendente. Es más frecuente el diagnóstico durante la segunda semana de vida en RNPT previamente alimentados.⁴

La incidencia es inversamente proporcional al peso al nacer y la edad gestacional. Los más susceptibles a presentarla son los RNPT menores de 1000g y menores de 28 SDG. Datos del Instituto nacional de la red de desarrollo neonatal humano y de la salud del niño (NICHD Neonatal Network) y la red de ensayos clínicos de Oxford –Vermont, confirman este incremento en la incidencia ente los RNPT de muy bajo peso al nacer. El riesgo de ECN persiste hasta una edad posconcepcional mayor a las 36 SDG.⁴

La enterocolitis necrosante (ECN) es un problema mundial en los recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento y su incidencia es variable. Afecta del 2.6 al 28% de estos niños. Datos de los Estados Unidos demuestran que la enfermedad puede ocurrir en aproximadamente 10% de los RNPT menores de 1500g, pero el rango varia de 2 a 22%, llegando hasta un 30%.⁵⁻⁸

Es la emergencia intestinal más común del prematuro, ocurre en el 1% al 5% de pacientes ingresados a la unidad de cuidado intensivo neonatal y en 1 a 3 por 1.000 nacimientos vivos. Los datos del centro nacional para la estadística de la salud indican una incidencia de 1.200 a 9.600 casos por año en los Estados Unidos que dan lugar a más de 2,600 muertes anualmente, la incidencia de enterocolitis se correlaciona fuertemente con el grado de prematuridad y es más baja en los países en que esta se ha disminuido.⁵

En el mundo se reporta la siguiente incidencia 1-2% en los RNPT de muy bajo peso al nacer en Japón, 7% en Austria, 14% en Argentina, 28% en Hong Kong.^{6,8}

En el instituto nacional de perinatología se registraron 79 casos de ECN en un periodo comprendido del 2000 al 2007. Tabla 1

La tasa de mortalidad no ha mejorado significativamente en los últimos 30 años y varia entre 10 y 30% en cada centro hospitalario⁵⁻⁶, llegando a reportarse una tasa de mortalidad del 35-50% en Recién nacidos con ECN que presentaron perforación.^{9,10}

Los sobrevivientes quedan con secuelas de tipo de síndrome de intestino corto, síndrome de mala absorción intestinal o colestasis inducida por NPT.^{10,11}

El costo por cada caso en una unidad de cuidados neonatales se estima entre 74 a 186 mil dólares comparado con otros pacientes.¹⁰ La mayoría de las complicaciones posquirúrgicas están relacionadas a la herida o al estoma.⁴

1.2 ETIOLOGÍA

Se desconoce la patogenia exacta del proceso, aunque generalmente se considera multifactorial. Santulli describe en animales de experimentación tres factores que intervienen en el desarrollo de ECN: 1) La presencia de gérmenes patógenos, 2) La exposición a la alimentación enteral y 3) Un trastorno de la integridad de la mucosa intestinal, estos factores pueden combinarse para ocasionar una lesión intestinal.²

Para su desarrollo confluyen varios factores de riesgo como: prematurez, alimentación con sucedáneos de la leche humana, isquemia intestinal y colonización bacteriana.^{12,13}

La prematurez es el factor de riesgo más importante asociado a ECN, debido a la inmadurez de la barrera intestinal en el neonato prematuro. Se han identificado cuatro áreas generales de inmadurez gastrointestinal para el recién nacido prematuro: factores inmunológicos, factores luminales, inmadurez de la barrera intestinal y disminución de la motilidad del tracto GI.

Evidencias de estudios de animales y en humanos muestran diferencias significativas entre recién nacidos de término y pretérmino en varios aspectos del desarrollo y función intestinal. Se encuentran suprimidas o deficientes varias enzimas y hormonas gastrointestinales en los RNPT, así como también limitación del complejo de la cascada responsable de limitar la invasión de múltiples patógenos, incluyendo deficiencia o disfunción de la respuesta de la inmunoglobulina A, función de neutrófilos, activación de macrófagos, producción y función de citocinas.^{14,15}

Sobre la **Alimentación**, se sabe que más del 95% de los pacientes diagnosticados con ECN han sido alimentados enteralmente.

Aunque el mecanismo no se conoce, se ha reportado que la alimentación enteral promueve la ECN proporcionando un medio para una mayor proliferación de bacterias potencialmente patógenas que pueden invadir la pared intestinal. A pesar de que el tracto gastrointestinal (GI) del recién nacido es estéril en el momento del nacimiento, se produce la colonización bacteriana en cuestión de horas. Se inicia este proceso con el contacto con la flora vaginal de la madre, posteriormente con la alimentación por vía oral y la exposición al medio ambiente.

La alimentación con fórmula, más que la lactancia materna, parece predisponer a los recién nacidos a ECN. La fórmula probablemente proporciona un sustrato para la proliferación bacteriana en el tracto gastrointestinal. Las investigaciones indican que la leche materna puede ofrecer protección contra el ECN, ya que contiene tanto propiedades inmunológicas y no inmunológicas que son benéficas para el recién nacido prematuro. Los factores inmunoprotectores en la leche humana incluyen IgA, acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (FAP), vitamina E, carotenos y

ácido ascórbico. Así como la presencia de bacterias no patógenas tales como bifidobacterias. Todos estos compuestos han sido postulados para mantener un adecuado ambiente intestinal y ellos reducen el riesgo de ECN.¹⁵

Isquemia intestinal. Las teorías que comprometen el flujo intestinal en el feto y el neonato contribuyen a la fisiopatología de la ECN, los estudios reflejan que la inmadurez de la barrera intestinal del neonato puede ser especialmente sensible a la hipoperfusión esplácnica. El insulto inicial en la secuencia de acontecimientos que conducen a la ECN podría ser la hipoxia, por ejemplo pacientes con asfixia perinatal, policitemia, exanguinotransfusión, síndrome de dificultad respiratoria SDR, en pacientes con persistencia del conducto arterioso con cortocircuito de izquierda a derecha tienen disminuida la perfusión intestinal e incrementa el riesgo de ECN, además los pacientes tratados con indometacina para el cierre de PCA tienen incrementado el riesgo de ECN debido al efecto de la indometacina a la circulación intestinal, así como metilxantinas la cual ha demostrado disminución del flujo sanguíneo de la mesentérica superior, otro factor que genera controversia es la importancia del catéter de la arteria umbilical, ya que reduce la circulación intestinal o genera émbolos que cruzan la arteria mesentérica superior. Finalmente el abuso de cocaína materna se ha asociado con incremento en la incidencia de ECN en donde se sugiere que el flujo sanguíneo intestinal está reducido por la exposición a la cocaína.^{3,4,14,15.}

El sitio habitual de necrosis isquémica es la región ileocólica.

En momentos de baja perfusión o durante los períodos de asfixia y de la redistribución circulatoria, estas áreas pueden ser vulnerables a la lesión isquémica.¹⁵

Colonización bacteriana. La mayoría de las bacterias aisladas de recién nacidos con NEC son de la flora intestinal normal, pero, tanto los organismos que forman parte de la flora normal del tracto intestinal como la anormal y patógenas han participado en el desarrollo de la ECN.

Aunque muchos tipos de bacterias y virus se han asociado con ECN, *Clostridium* especies parecen ser los más importantes.

Estos producen exotoxinas, que pueden ser importantes en el daño que causan a la mucosa intestinal observados en la ECN. La pneumatosis intestinal asociada con ECN en los lactantes puede ser causada por bacterias anaerobias.

Para los lactantes en riesgo de ECN, puede haber aumentado el paso de bacterias desde el intestino a la circulación sistémica. La mayor parte de las defensas que normalmente impiden el paso de bacterias a través de la barrera mucosa, el buen funcionamiento del sistema inmunológico, las defensas mecánica y la microflora intestinal normal están afectadas en pacientes que están en riesgo de NEC. Una mayor incidencia de *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* se han encontrado en los intestinos de los niños en alto riesgo de NEC.

Inflamación aguda puede ser el resultado de sobrecrecimiento bacteriano de la flora normal o la presencia de organismos patógenos.

Si el bebé es alimentado prematuramente, antes de la adecuada la función intestinal, proliferan Gram-negativos aerobios y anaerobios que producen toxinas, causando ECN. Las endotoxinas producidas por bacterias Gram-negativas pueden escaparse vía porta a la circulación, si el hígado no puede contener, puede seguir la fuga a la circulación sistémica, provocando endotoxemia, shock y muerte.

La colonización bacteriana es un prerrequisito para el inicio de la inflamación intestinal, necrosis y presentación clínica de ECN, posterior al parto el intestino es colonizado rápidamente con múltiples microorganismos incluidos las bacterias anaerobias facultativas; bifidobacterias y lactobacilos entre los RN alimentados al seno materno. En los RNPT hospitalizados en la UCIN quienes no han sido alimentados tempranamente con leche humana existen diferencias en la microflora intestinal.¹⁵

La colonización bacteriana del intestino de los RNPT es diferente de la de los recién nacidos de término, ello depende de los diferentes cuidados neonatales, tales como tratamiento con antibióticos, humedad de la incubadora lo que puede deteriorar los procesos de colonización.^{16,17}

Los niños sanos desarrollan una colonización de microbiota en la que predominan en el intestino flora no patógena especies tales como bifidobacterias, los RNPT adquieren menor cantidad de bifidobacterias por lo que son más susceptibles de colonización patógena.^{16,17}

El predominio de bacterias facultativas en la flora fecal de los RNPT que están en la UCIN es con predominio de *Staphylococcus* (coagulasa negativo, *Staphylococcus* spp y *Staphylococcus aureus*); enterobacterias (*Klebsiella* spp y enterococos), siendo los anaerobios más comunes los Clostridios.^{16,18}

1.3 FISIOPATOLOGÍA.

El principal factor de riesgo para el desarrollo de ECN es el resultado de la vía final de la necrosis intestinal a través de la activación de la cascada inflamatoria.

La evidencia experimental ha mostrado que las concentraciones de mediadores químicos como el factor activador plaquetario (FAP), IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral (FNT), óxido nítrico y endotelina están elevadas en la circulación de recién nacidos con ECN y en varios modelos de daño intestinal.

El FAP es un fosfolípido que actúa como un mediador potente que parece tener un papel clave en la fisiopatología de la ECN. Este es sintetizado después de la activación de la fosfolipasa A2-II y es degradado por la enzima acetilhidrolasa-FAP.⁸

Los pacientes con ECN presentan niveles altos de PAF y disminución de los niveles de PAF-acetilhidrolasa, la PAF se acumula en la mucosa, incrementando la permeabilidad epitelial intestinal, ocasionando daño local con la entrada de bacterias, desencadenando la cascada inflamatoria, con activación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) con la adhesión al endotelio de las vénulas en el intestino, incrementando la permeabilidad vascular, involucrando mediadores de la inflamación como FNT, complemento, citocinas inflamatorias con la IL1, IL6 e IL8, prostaglandinas y leucotrieno C4. Las cuales se han asociado a neutropenia, trombocitopenia, CID, ácidos

metabólica, edema con fuga del tercer espacio y disminución de la presión sanguínea. Eventualmente hay liberación de norepinefrina resultado vasoconstricción mesentérica con isquemia esplácnica y reperfusión. Productos bacterianos como endotoxinas entran al tejido intestinal rompiendo la barrera mucosa local y las endotoxinas sinergizan con el PAF amplificando la inflamación. Especies de oxígeno reactivo producidos por la activación de los leucocitos y por la xantina oxidasa del epitelio intestinal podrían ser la vía final de la lesión tisular.^{19,20}

Se ha demostrado que el óxido nítrico (ON) es un modulador protector de la mucosa intestinal y la óxido nítrico sintetasa neuronal (nONS) es la enzima responsable de la producción de más del 90% de ON por el intestino. En modelos animales se demostró que la isquemia-reperfusión inducida por lesión intestinal se exagera marcadamente por endotoxinas y PAF con la concomitante inhibición de la ONS. Esto sugiere que el desbalance entre el ON endógeno y la producción de PAF puede ser el factor responsable de la lesión de la mucosa intestinal.^{10,19}

Se ha encontrado un incremento en la expresión de COX-2 en segmentos intestinales de neonatos que presentaron perforación por ECN. Con una coordinada inducción de en la expresión de COX-2 y con la presencia del factor nuclear (NF)-κB en modelos de roedores con ECN. Estos hallazgos sugieren que el COX-2 y en NF-κB juegan un rol importante en la patogénesis de la ECN.¹³

El resultado final de la ECN depende del balance entre los mecanismos agresores (mediadores de la inflamación, citocinas, isquemia) y los mecanismos protectores (principalmente nONS), un desbalance favorece a la ruptura de la barrera mucosa con la entrada de bacterias, perpetuando el ciclo vicioso, ocasionando choque, sepsis y en algunas ocasiones la muerte.¹⁹

1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO.

Las manifestaciones clínicas de la ECN pueden tener una presentación sutil o catastrófica. Los signos sistémicos tempranos son típicamente inespecíficos, pueden similares a los que se presentan en otras causas de deterioro y sepsis. Incluyendo distensión abdominal, vómito biliar, prueba de guayaco positiva, períodos de apnea, letargo, inestabilidad de la temperatura, inestabilidad de la glucosa sanguínea, hipotensión y bradicardia.^{3,11,15}

Los signos de presentación temprana son: distensión abdominal (70-98%), intolerancia a la alimentación con incremento del residuo gástrico (>70%), emesis (>70%), presencia de sangre por el recto (25-63%), sangrado gastrointestinal oculto (25-59%) y ocasionalmente diarrea (4-26%). Conforme la enfermedad progresa los hallazgos abdominales pueden llegar a ser más severos, los pacientes pueden llegar a desarrollar distensión abdominal marcada debido a dilatación intestinal y ascitis. El eritema en la pared abdominal puede ser ocasionado por necrosis de la pared abdominal.¹¹

En cuanto a los hallazgos de laboratorio, un paciente con ECN pueden presentar una cuenta anormal de leucocitos, la cual puede estar elevada, pero generalmente se encuentra disminuida (<1.5x10⁹/L), hasta en 37% de los casos, la trombocitopenia también es común, se ha encontrado en 87% de los pacientes, anomalías de la coagulación (prolongación del tiempo de protrombina e hipofibrinogenemia), inestabilidad en la glucosa (hipo o

hiperglicemia), acidosis metabólica, desequilibrio hidroelectrolítico también se han observado en estos paciente, algunos pacientes presentan elevación de la Proteína C reactiva.¹¹

En 1973 Bell fue el primero en tratar de clasificar la ECN, por presentación y severidad. Estos criterios fueron modificados en 1978 incluyendo aspectos de tratamiento y pronóstico de la enfermedad.¹¹. Tabla 2

1.5 TRATAMIENTO.

La mayoría de los pacientes que cursan con ECN requieren manejo médico, sin tratamiento quirúrgico, la mayoría requiere soporte ventilatorio mecánico, si es necesario, la intubación traqueal se prefiere a la presión positiva continua para prevenir la aerofagia y la subsecuente distensión intestinal. Se recomienda tener acceso arterial periférico para la medición de gases arteriales. Algunos pacientes que cursan con hipovolemia requieren manejo de líquidos y corrección de desequilibrio ácido-base, la acidosis en la ECN es mixta, con un componente respiratorio por hipoventilación, así como componente metabólico por hipoperfusión. Si hay evidencia de coagulopatía la administración de plaquetas, plasma fresco congelado o crioprecipitados, en caso de acidosis metabólica severa se evaluara el uso de bicarbonato de sodio, la dopamina y la epinefrina en infusión son necesarios cuando la hipoperfusión no responde a la administración de líquidos.¹¹

Al obtener cultivos en sangre y sensibilidad antimicrobiana se podrá iniciar la terapia adecuada, ampicilina y un aminoglucósido son una opción de antibióticos, pero la elección, dependerá del patrón de resistencia de cada UCIN. Los recién nacidos de peso muy bajo al nacimiento con riesgo de bacteremia deberán ser cubiertos con antibiótico para prevenir *Staphylococcus coagulasa negativo*, de acuerdo al tratamiento empírico, vancomicina y una cefalosporina de tercera generación son apropiados. La terapia antimicrobiana podrá continuarse de 7 a 14 días dependiendo de la severidad del episodio.¹¹

Se debe suspender la alimentación enteral y colocar una sonda gástrica de calibre grande (10-12 Fr) para descomprimir. Deben tenerse mediciones seriadas del perímetro abdominal, así como exploración seriada por el mismo examinador y control radiológico frecuente.^{10,11} Tabla 3

Aproximadamente de un 34 a 50% de los pacientes con ECN requieren de intervención quirúrgica, la cual esta indicada en pacientes con evidencia de perforación o en casos de enfermedad progresiva a pesar del tratamiento médico.^{6,11}

1.6 PREVENCIÓN.

Las estrategias preventivas se han desarrollado en base a observación clínica y datos epidemiológicos y experimentales. Algunas estrategias como: alimentación con leche humana, esteroides antenatales, restricción hídrica y administración de antibióticos han comprobado su eficacia. Se mencionan otras estrategias para prevenir ECN cuya eficacia aún no esta comprobada como: precauciones en los incrementos de la alimentación, administración

enteral de inmunoglobulinas, suplementos con L-arginina, suplementación con fosfolípidos, acidificación de la leche y administración de pre y probióticos.^{4,12}

La administración de bacterias probióticas ha sido propuesta como una vía de colonización intestinal de flora deseable que cubre y cambia la permeabilidad de la mucosa intestinal, aumenta la respuesta de la IgA, incrementa la producción antiinflamatoria de citocinas y normaliza la microflora intestinal.^{4,19}

Una alternativa preventiva de la ECN sería evitar el crecimiento de patógenos, administrando probióticos para colonizar el intestino con flora no patógena. La última revisión de Cochrane sobre el uso de probióticos para la prevención de ECN concluye que la administración enteral de probióticos disminuye significativamente la incidencia de estadios I y II de ECN, así como una reducción en la mortalidad por esta causa.^{20,21}

CAPITULO 2. PROBIÓTICOS.

El término probiótico, propuesto por primera vez en 1965 por Lilley y Stillwell, proviene de raíz griega que significa por la vida y es antónimo de antibiótico. Si bien este concepto y su definición han evolucionado en los últimos 40 años, la evidencia de sus efectos benéficos para el hombre se conoce desde la época de Aristóteles, pero sólo se describió científicamente a principios de siglo en los trabajos de Elie Mentchnikoff en 1908 un premio nóbél que trabajaba en el Instituto Pasteur, observo que Bulgaria tenía un número increíble de personas que vivían más de 100 años, encontró que éstos se alimentaban de grandes cantidades de verduras cultivadas en forma casera y yoghurt, propuso que el envejecimiento es consecuencia de la acción de sustancias tóxicas producidas por la flora intestinal y sugirió que la ingestión de lactobacilos que se encontraban en los alimentos podían bloquear estas toxinas y prolongar la vida.²²

Los probióticos son inocuos y desde hace siglos se usan para conservar y producir alimentos. No se han reportado problemas de salud por el consumo de estas bacterias. En 1961 y 1998 se realizaron, por lo menos 143 estudios clínicos con probióticos en más de 7500 sujetos; en ninguno de los casos se ha registrado un problema de salud.²²

Respecto a la inocuidad y al control de calidad de la fabricación de productos con probióticos hay que seguir un protocolo muy riguroso y estricto de buenas prácticas de manufactura para asegurar la inocuidad del producto y la viabilidad de estos microorganismos en los productos finales, sin olvidar las estipulaciones dictadas por las instituciones gubernamentales responsables de vigilar su inocuidad.²²

Una vez en el intestino, los probióticos deben permanecer adheridos a la mucosa intestinal para liberar ciertos compuestos, que ejercen efecto positivo en el huésped y compiten por los sitios de adhesión con los patógenos. Se piensa que los probióticos deben de permanecer viables para ejercer un efecto positivo en el huésped; sin embargo se ha demostrado que son los metabolitos producidos y liberados por estos microorganismos los que interactúan con otras moléculas del intestino. Gracias a la capacidad de modificar la estructura de los receptores en la superficie de la mucosa o sus características de adhesión, los probióticos pueden funcionar como competidores o inhibidores de ciertas bacterias patógenas.²² Tabla 4

Los probióticos producen otros compuestos como: ácido láctico, peróxido de hidrogeno, piroglutamato, ácidos grasos de cadena corta o bacteriocinas que entre otros efectos disminuyen el pH del medio y actúan como agentes bactericidas o bacteriostáticos. Tienen propiedades inmunomoduladoras: modifican la respuesta a antígenos, aumentan la secreción de IgA, facilitan la captación de Antígenos en la placa de Peyler, producen enzimas hidrolíticas y disminuyen la inflamación intestinal.^{23,24}

Los probióticos más conocidos son los lactobacilos utilizados para la fermentación de alimentos y las bifidobacterias, gérmenes predominantes en la flora intestinal de los niños alimentados con leche materna y posiblemente los responsables de la menor incidencia de cuadros diarreicos en este grupo.²⁴

AGENTES PROBIÓTICOS²⁴

“Lactobacillus”

- ❖ *L. acidophilus*
- ❖ *L. casei: GG, ramosum*
- ❖ *L. bulgaricus*
- ❖ *L. plantarum*

“Bifidobacteria”

- ❖ *B. bifidum*
- ❖ *B. longum*
- ❖ *B. breve*
- ❖ *B. infantis*
- ❖ *B. animalis*
- ❖ *B. spp*

“Streptococcus thermophilus”

“Saccharomyces boulardii”

EFFECTOS DE LOS PROBIÓTICOS.

- Normalizan la microflora.
- Reducen la permeabilidad intestinal.
- Incrementan la función de la barrera mucosa.
- Protegen en contra la colonización de patógenos.
- Disminuyen las citocinas proinflamatorias e incrementan las citocinas antiinflamatorias.
- Mejoran la nutrición enteral.
- Reducen la traslocación bacteriana, reduciendo la sepsis.

CRITERIOS QUE DEFINEN A UN MICROORGANISMO COMO PROBIOTICO²⁵

- Origen humano.
- No patógeno.
- Resistente a destrucción por técnicas de procesamiento.
- Resistente a destrucción por ácido gástrico y biliar.
- Adherible al epitelio de la pared intestinal.
- Capaz de colonizar el tracto gastrointestinal en corto tiempo.
- Producir sustancias antimicrobianas.
- Modular la respuesta inmune.
- Influenciar las actividades metabólicas humanas.

2.1 ESTUDIOS REALIZADOS CON PROBIÓTICOS.

Existen algunos estudios realizados en animales de experimentación que han demostrado beneficios de los probióticos.

En un estudio realizado por **Sprague-Dawley**²² con ratas en estado neonatal, a las cuales se les provoco ECN y las trato con una solución orogástrica enriquecida con *Bifidobacterium infantis* a razón de 1x10⁹ ufc/d, se mostró una colonización en el intestino por este microorganismo entre las 24 y

48hr de haber iniciado el tratamiento, mientras que en el grupo control, no hubo cambios en la población intestinal. También se observó que la colonización por bífidos reduce la incidencia y muerte de ECN comparada con el grupo placebo (murieron en el grupo experimental 5 de 22 y en el grupo control 18 de 26 ratas) con $p < 0.01$, con una disminución significativa en la producción de endotoxinas y en la expresión del gen que codifica para el factor activador de plaquetas, por lo que parece que la colonización con bifidobacterias disminuye el riesgo para ECN y modula la cascada inflamatoria. Se desconoce el mecanismo por el cual los bífidos pueden detener la cascada inflamatoria, aunque se piensa que es en la modulación de la flora intestinal y la permeabilidad del intestino.

Perdigón y su equipo observaron un marcado efecto en la producción de TNF alfa e IFN gama en un estudio realizado a ratones alimentados con varias especies de probióticos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* y *Sreptococcus thermophilus*. En presencia de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* se observó un incremento importante en las concentraciones de citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10, mientras que *Lactobacillus acidophilus* indujo la producción de IL-2 e IL-12.²⁶

Se sugiere que algunos componentes de la leche humana pueden estimular a la respuesta inmune humoral, por probable modulación del balance inmunológico en el intestino del recién nacido. Así mismo, se ha sugerido que la incorporación de probióticos a la dieta materna antes del parto y en el recién nacido durante la lactancia puede influenciar positivamente el proceso de maduración intestinal.^{27,28}

Varios estudios realizados recientemente han demostrado que la administración de probióticos en el recién nacido pretérmino disminuye la incidencia y severidad de la enterocolitis necrosante, así como la mortalidad en este grupo de pacientes.²⁹

Agarwal³⁰ realizó estudio con *Lactobacillus rhamnosus*, conocido como *Lactobacillus GG (LGG)*, por la capacidad de colonizar el intestino neonatal y modificar su flora bacteriana. Fue un estudio prospectivo, aleatorizado en 71 recién nacidos prematuros con peso menor al nacimiento de 2000 g. Los recién nacidos menores de 1500 g (24 tratados y 15 controles) recibieron 10 LGG oralmente 2 veces al día por 21 días. Los recién nacidos con peso entre 1500 a 1999 gr (23 tratados, 9 control) fueron tratados por 8 días. Encontrando colonización en 16 de 47, los pacientes que fueron tratados con probióticos Vs 0 de 24 en el grupo control $P=0.005$. LGG fue bien tolerado en todos los RN.

En varios ensayos clínicos aleatorizados, prospectivos se ha visto que el usar probióticos en prematuros parece que reduce el reservorio intestinal de especies patógenas, mejoran la tolerancia de la nutrición enteral y disminuyen la incidencia de la enterocolitis necrosante, con cambios significativos en la mortalidad. En ninguno de estos estudios se observaron efectos adversos tales

como bacteremia, diarrea o intolerancia a la alimentación relacionados a la administración de probióticos en los recién nacidos prematuros.^{29, 31}

Forero⁸ realizó un ensayo clínico controlado (estudio prospectivo, doble ciego, aleatorizado y comparativo) en 39 recién nacidos prematuros menores de 1500 gr, sin manifestaciones de patología intestinal, alimentados con leche artificial desde el primer día de vida. Se realizó en la unidad de cuidado intensivo neonatal en la clínica de Chicamocha de Bucaramanga, Colombia. Desde el 1º de mayo de 2003 al 30 de septiembre de 2004. Se eligieron todos los prematuros menores de 1500g ingresados a la UCIN que no podían recibir leche materna, que estuvieran estables.

Los recién nacidos pretérmino fueron asignados al azar a dos grupos: estudio y control con características demográficas de las madres similares y algunas variables de los recién nacidos sin encontrar diferencias estadísticas entre los 2 grupos estudiados. Con una población de 79 recién nacidos. El probiótico se mantuvo refrigerado de 4-8° C y se mezcla con agua destilada antes de su administración. El grupo control con 20 RNPT recibió 4ml de agua destilada. Tanto los pacientes del grupo de estudio como de control recibieron esta dosis diariamente hasta el egreso de la UCIN. La variable de salida fue la presencia de enterocolitis necrosante (estadio II o mayor).

A 19 se les administró una dosis diaria de 1 g de probiótico multiespecie, el cual se diluyó en 4 ml de agua destilada, previo al inicio de la alimentación hasta el egreso de cuidado intensivo. Entre los 20 pacientes del grupo control se presentaron 7 con enterocolitis necrosante y en los pacientes que recibieron probiótico se presentó solo un caso de enterocolitis en un RN prematuro de 632 gr. El riesgo de enterocolitis en el grupo del prebiótico fue de 0.15. La reducción absoluta del riesgo dada por el uso del prebiótico fue del 29.7%, con un número de pacientes necesario a tratar para prevenir un caso de enterocolitis de 4.

No hubo diferencias significativas en la disminución de la mortalidad y sepsis.

Sin embargo este artículo no cuenta con la metodología adecuada, cuenta con un tamaño de muestra pequeño, en donde no se observa una diferencia significativa en la incidencia de ECN entre el grupo de estudio y el grupo control, tampoco se puede hablar de reducción absoluta con el IC (0.02 – 1.11).

Hoyos³¹ En un estudio prospectivo, en el hospital Simón Bolívar en Bogotá, Colombia, examinó la hipótesis con la administración profiláctica de lactobacilos orales *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis* en los neonatos en la unidad de cuidados intensivos neonatales, en la que se plantea disminuir la incidencia de enterocolitis necrosante, utilizó una dosis diaria de 250 millones de lactobacilos vivos *L. acidophilus* y 250 millones de *B. infantis*. Los probióticos se administraron en 1237 recién nacidos admitidos en la unidad de cuidados intensivos durante un año, con un grupo control de 1282 pacientes los cuales fueron hospitalizados un año antes. En cuanto a los resultados no hubo complicaciones atribuidas a la administración diaria de *L. acidophilus* y *B. infantis*. Los grupos de estudio fueron comparados para el mismo lugar de origen, clínica y variables demográficas, no hubo diferencias estadísticamente significativas en estas variables. En el grupo control hubo 85 casos de

enterocolitis necrosante comparado con 34 casos en el grupo que recibió profilaxis con probióticos ($P < 0.0002$). Con un RR de 0.41 IC 95% (0.28 – 0.61), con NNT 26. En el grupo control hubo 35 casos de ECN asociada a complicaciones fatales comparada con 14 complicaciones fatales en el grupo que recibió profilaxis con probióticos ($P < 0.005$). Sin embargo la comparación fue hecha con controles históricos, el tratamiento no fue ciego y los RN de estudio generalmente tienen un peso más alto y además de mayor edad gestacional 37 SDG, el 10% de los RN tenían un peso de 1500g.³⁰ Respecto a la metodología los resultados son cuestionables.

Bin-Nun³² realizó un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, propuso la hipótesis de que al normalizar la flora intestinal con la administración profiláctica de probióticos se podrían mejorar las defensas naturales, reduciendo la incidencia y severidad de enterocolitis necrosante en neonatos pretérmino. Se ingresaron al estudio neonatos con peso al nacimiento menor de 1500g, que fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos del Centro Médico de Shaare Zedek entre Septiembre del 2001 y Septiembre del 2004. Los pacientes se asignaron al azar a cada grupo. El grupo de estudio recibió suplementos de probióticos diariamente de ABC Dophilus probióticos mixtos (*bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium bifidus*) una dosis de 1.05×10^9 UFC por día, diluido en 3 ml de leche materna ó en 3ml de sucedáneos de leche humana (Similac Special Care). El grupo control recibió leche humana o sucedáneos de leche humana. Los suplementos fueron continuados hasta las 36 semanas de edad gestacional posconcepcional, 72 RN fueron incluidos en el grupo de estudio, con 73 controles; el peso al nacer fue de 1152 +/-262g vs 1111 +/- 278g, la edad gestacional de 30 +/- 3 semanas vs 29 +/- 4 semanas.

La incidencia de ECN se redujo en el grupo de estudio (3/72 (4%) vs 12/73 (16.4%) $p = 0.03$; riesgo relativo de 0.25; IC 95%: 0.075-0.86. Reduciendo la incidencia de ECN de 17% a un 4% con una reducción del riesgo de 75% y una reducción absoluta del riesgo del 12%, con NNT 8, lo que podría significar que 8 RN necesitaran tratamiento para prevenir un caso de ECN. La incidencia de ECN (Criterios de Bell estadio 2 o 3) fue 1 de 72 (1%) Vs 10 de 73 (14%) $p = 0.013$ en el grupo de estudio y control respectivamente. Los 3 casos más severos ocurrieron en el grupo control, aunque no hubo diferencias significativas en el inicio de la presentación de ECN en los dos grupos. Se agregó al estudio *S. thermophilus* debido a que mejoran la eficacia previniendo diarrea secundaria a rotavirus y mejoran el crecimiento a largo plazo. No se aislaron en los cultivos positivos las cepas administradas en el estudio, no se observaron complicaciones debidas al uso de probióticos.³¹ Se muestra una disminución en la incidencia de ECN.

Lin H.³³ realizó un ensayo clínico controlado aleatorizado, para la evaluación de los efectos benéficos de los probióticos en la reducción de la incidencia y severidad de ECN en RN menores de 1500g. Se realiza en un Centro de tercer nivel neonatal en el centro de Taiwán, desde el 1 de julio de 1999 al 31 de diciembre de 2003 en la unidad de cuidados intensivos. Se incluyeron 367 recién nacidos de peso muy bajo al nacer (<1500g), pacientes que

sobrevivieron después de los 7 días de vida. El probiótico utilizado fue Infloran (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis*) con dosis de 125 mg/k, en la leche materna dos veces al día hasta el egreso, el grupo control se alimentó con leche materna solamente; 180 RN participaron en el grupo de estudio y 187 RN en el grupo control. Las variables demográficas y clínicas fueron similares en ambos grupos. La ECN se catalogó según la clasificación modificada de Bell, el diagnóstico y la clasificación de la ECN se llevan a cabo de forma independiente por 2 neonatólogos con experiencia, en forma cegada. Participaron en el estudio 367 niños; 180 en el grupo de estudio y 187 en el grupo control. La incidencia de muerte o de ECN fue significativamente menor en el grupo de estudio 9 de 180 (5%) Vs 24 de 187 (12.8%); P=0.009. La incidencia de ECN (> al estadio 2) también fue significativamente menor en el grupo de estudio comparado con el grupo control 2 de 180 (1.1%) vs 10 de 187 (5.3%); P=0.04, se observaron seis casos de ECN severa (estadio 3 de Bell) en el grupo control y ninguno en el grupo de estudio P=0.03. La incidencia de ECN o sepsis fue menor en el grupo probiótico (24/180 [13.3%] frente a 46 de 187 [24.6%], respectivamente; p<0.03). La incidencia de fallecimientos o ECN o sepsis fue significativamente más baja en el grupo probiótico (31 de 180 [17.2%] frente a 60 de 187 [32.1%], respectivamente; p< 0.009).

En ninguno de los cultivos positivos se encontró *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* especies, tampoco se observaron complicaciones debidas al uso de probióticos. El estudio mostró una reducción de la incidencia y severidad de ECN con leche materna y el uso del probiótico en RN de muy bajo peso al nacer, con un número necesario a tratar para prevenir 1 caso de ECN de 27, y para prevenir 1 fallecimiento por ECN de 31, con una reducción del riesgo relativo del 79%.

Dani³⁴ no encontró diferencias entre los que les administro el probiótico y a los que les dio placebo, el estudio fue aleatorizado, doble ciego, para evaluar la eficacia del *Lactobacillus GG* en la reducción de la incidencia de infección del tracto urinario (IVU), sepsis bacteriana y ECN en RN pretérmino. Participaron 585 RN menores de 33 SDG o peso menor de 1500g los cuales recibieron leche materna o sucedáneos de leche humana suplementada con *Lactobacillus GG* en una dosis con 6×10^9 UFC una vez al día hasta el alta. En el grupo de estudio la n= 295 y el grupo control n= 290, con similares características clínicas y demográficas. La duración de *Lactobacillus GG* y el placebo fue de 47.3 +26 y 48.2 +24.3 días respectivamente. Aunque la IVU (3.4 vs 5.8%) y ECN (1.4% vs 2.8%) se encontraron con menor frecuencia en el grupo de estudio comparada con el grupo control, no hubo diferencias significativas. La incidencia de sepsis bacteriana fue similar en ambos grupos, en el grupo de probióticos (4.7% n=14) que en el grupo placebo (4.1% n=12). La incidencia de ECN fue menor en el grupo de probiótico (1.4% n=4) que en el grupo placebo (2.8%, n=8) con una reducción del riesgo de 50%, sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa.

La edad de diagnóstico de ECN fue de 20 (+/-7.5) días en el grupo de estudio y de 15.5 (+/-9.7) días en el grupo control. Los pacientes quienes desarrollaron ECN se suplementaron con probiótico a la edad de 3.5 (+/-1.3; rango de 2-5) días y fueron suplementados por 16.5 (+/- 8.6; rango 10-29 días) antes del diagnóstico de ECN. Concluye que siete días de suplementación con

Lactobacillus GG no son efectivos en la reducción de la incidencia de IVU, ECN y sepsis en infantes pretérmino.

Kitajima³⁵ realizó un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado con 91 RN de muy bajo peso al nacer que fueron seguidos por 3 años. Investigó la colonización con *Bifidobacterium breve* (BBG) en el intestino de RN de muy bajo peso al nacer. La cuenta de bacterias viables fue examinada en las primeras 8 semanas. A los pacientes del grupo de estudio se les administro 1 ml agua destilada con 0.5×10^9 de *Bifidobacterium breve*, iniciando en las primeras 24hr de vida, una vez al día durante 28 días. La tasa de colonización bacteriana fue examinada usando inmunohistoquímica con anticuerpos específicos monoclonales específicos para *B. breve*. La inmunohistoquímica demostró que la colonización de bacterias administradas fue de 73% a las 2 semanas de edad pero solo 12% en el grupo control. La administración temprana de *B breve* disminuye significativamente el volumen de aire aspirado del estómago y mejora la ganancia de peso, *B breve* puede colonizar el intestino inmaduro de forma muy efectiva y se asocia con menos signos abdominales anormales y más ganancia de peso en infantes de muy bajo peso al nacer, probablemente como resultado de la estabilización de la flora intestinal. Este es uno de los más grandes estudios reportados que mejoran la ganancia de peso y la tolerancia a la vía enteral con la cepa *Bifidobacterium breve* en RN pretérmino, sin embargo la incidencia y severidad no se reportó.

En los últimos dos años, se han realizado tres revisiones sistemáticas sobre la prevención de la ECN con probióticos.

La primera de ellas por **Deshpand**³⁶, en la que se revisaron ensayos clínicos controlados que evalúan la seguridad y eficacia de la suplementación con probióticos, en la prevención de la ECN estadio II o mayor, en recién nacidos prematuros con peso menor de 1500 g al nacimiento. Se incluyeron 7 ensayos clínicos, dentro de los resultados se estimó un bajo riesgo de ECN en el grupo experimental en comparación con el grupo control (riesgo relativo de 0.36, IC 95% 0.20-0.65). El riesgo de muerte se redujo en el grupo con probióticos a diferencia del grupo control (RR 0.94, IC 95% 0.74-1.20). Concluyendo que la administración de probióticos reduce el riesgo de ECN en prematuros menores de 33 semanas de gestación, sin embargo permanecen sin respuesta los cuestionamientos sobre la dosis, la duración y el tipo de agente probiótico a utilizar.

Barclay³⁷, realizó una revisión sistemática de ensayos clínicos controlados realizados con la finalidad de medir la incidencia, severidad, la necesidad de cirugía y la mortalidad de la ECN en recién nacidos tratados con probióticos, con peso menor de 1500 g al nacimiento y menores de 33 semanas de gestación. Se incluyeron 5 estudios para el análisis, con un total de 640 pacientes tratados con probióticos y 627 como controles. Los resultados apoyan el uso de probióticos orales para la prevención de la ECN en recién nacidos prematuros. Los datos son insuficientes para comentar la seguridad a corto y largo plazo de la administración de probióticos.

La revisión mas reciente es la publicada por **Cochrane**³⁸, en enero del 2008, en la que se buscaron ensayos clínicos controlados realizados con recién nacidos prematuros menores de 37 semanas de edad gestacional y con peso al nacimiento menor a 2500 g, a los que se les administró algún tipo de suplemento probiótico. El objetivo principal fue el de comparar la eficacia y seguridad de la administración enteral profiláctica de probióticos contra placebo o ningún tratamiento en la prevención de ECN severa y o sepsis en recién nacidos prematuros. Se incluyeron 9 estudios con un total de 1425 recién nacidos acumulados. En los resultados se encontró que la suplementación enteral con probióticos en RN prematuros reduce significativamente la incidencia de ECN severa (estadio II o mayor), con un RR 0.32, IC 95% 0.17-0.60), así como la mortalidad (RR 0.43, IC 0.25-0.75). No se encontró evidencia significativa en cuando a modificación de la sepsis en este grupo de pacientes.

Ahora sabemos que la suplementación enteral con probióticos reduce el riesgo de ECN severa y la mortalidad en recién nacidos prematuros, sin embargo aún nos falta conocer el grado de seguridad a largo plazo en este grupo de pacientes, a si como la dosis correcta, el tiempo de administración y el tipo de probiótico a utilizar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

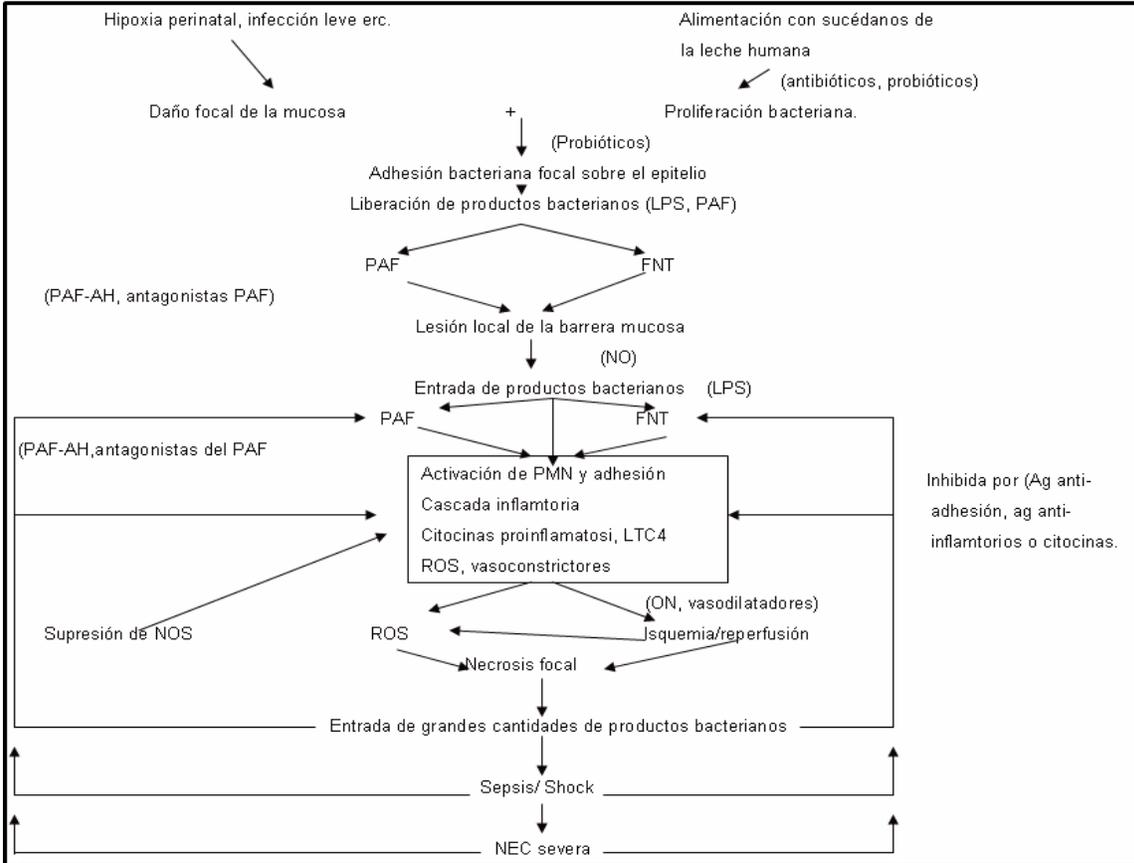
1. Kosloske AM. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. Acta Paediatr Suppl 1994;396: 2-7.
2. Bedrick A. Necrotizing Enterocolitis: Neurodevelopmental “Risky Business”. Journal of Perinatology 2004; 24: 531–533.
3. Noerr B. Part 1. Current controversies in the understanding of necrotizing enterocolitis. Adv Neonatal Care. 2003; 3: 107-20.
4. Lee JS, Pollin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. Semin Neonatol. 2003; 8: 449-59.
5. Reed A. Dimmitt. Clinical Management of Necrotizing Enterocolitis. NeoReviews Vol. 2 N° 5 Mayo 2001, Paginas 110-116.
6. Caplan MS, Jilling T. New concept in necrotizing enterocolitis. Curr Opin pediatr. 2001; 13: 111-15.
7. Caplan MS. Update on necrotizing enterocolitis:2003. Ital J Pediatr.2003; 29: 348-53.
8. Caplan M S, Jilling T. Neonatal Necrotizing Enterocolitis: Posible Role of Probiotic Supplementation. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000; 30 Suppl 2, 18-22.
9. Forero JG y Vera LM. Efectividad del uso de un prebiótico multiespecie en la prevención de enterocolitis necrosante en recién nacidos pretérmino: MedUNAB [series en Internet]. 2005 mayo: 5: 5-10. Disponible en: <http://editorial.unab.edu.co/revistas/medunab>.
10. Henry MC, Moss RL. Current in the management of necrotizing enterocolitis. Semin Perinatol. 2004; 28: 221-33.
11. Dimmitt RA, Moss L. Clinical management of necrotizing enterocolitis. NeoReviews. 2001; 2: 110-16.
12. Reber KM, Nankervis CA. Necrotizing enterocolitis: preventative strategies. Clin Perinatol. 2004; 31: 157-67.
13. Chung DH, Ethridge RT, Kim S, Owens-Stovall S, Hernandez A, Kelly D, et al. Molecular mechanisms contributing to necrotizing enterocolitis. Ann Surg. 2001; 233: 835-42.
14. Caplan MS, Jilling T. The pathophysiology of necrotizing enterocolitis. NeoReviews. 2001; 2: 103-08.
15. Horton KK. Pathophysiology and current management of necrotizing enterocolitis. Neonatal Radiology. 2005; 24: 37- 46.

16. Millar M, Wilks M, Costeloe K. Probiotics for preterm infants?. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2003; 88: 354-58.
17. Zhang L, Nan L, Neu J. Probiotics for preterm infants. NeoReviews 2005; 6: 227-32.
18. Hoy CM, Wood CM, Hawkey PM, y Puntis JW. Duodenal Microflora in Very-Low-Birth-Weight Neonatos and Relation to Necrotizing Enterocolitis. J Clin Microbiol. 2000; 68: 4539-47.
19. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. Pediatr Dev Pathol. 2002; 6: 6-23.
20. Kliegman RM. En Pollin RA, Fox WW. Editores Fetal and neonatal physiology. Segunda edición. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1998. p. 1425-32.
21. Acosta Rodríguez R, y Valencia Salazar G. En: Pediatría médica. Instituto Nacional de Pediatría. México: Trillas 2001. p. 51-4.
22. Macedo MG. Probióticos y recién nacido: una formula para el futuro. Nutrición clínica. 2003; 6: 419-33.
23. Tojo RS y Leis RT. Alimentos funcionales. Su papel en la nutrición preventiva y curativa. Bol. Pediatr. 2003; 43: 376-95.
24. Lorente BF y Serra JD. Alimentos funcionales: probiótico. Acta Pediátrica Española. 2001; 59: 150-55.
25. Martin C, Walker A. Probiotics: Role in Pathophysiology and Prevention in Necrotizing Enterocolitis. Seminars in Perinatology 2008;32:127-137.
26. Maldonado CG, Perdígón G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. J Appl Microbiol. 2004; 97: 673-81.
27. Rinne M, Kallomaki M, Arvilommi A, Salmen S, PHD, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus /Enterococcus* microbiota and humoral immune responses. J Pediatr. 2005; 3: 186-91.
28. Neu J. Probiotics: Protecting the intestinal ecosystema?. J Pediatr. 2005: 5: 143-46.
29. Hammerman C, Kaplan M. Probiotics and neonatal intestinal infection, Curr Opin Infect Dis. 2006; 19: 277-282.

30. Argarwal R, Sharma N, Chaudhry R, Deorari A, Paul VK, Gewolb IH, Panigrahi P. Effects of oral *Lactobacillus GG* on enteric microflora in low-birth-weight neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003; 36: 397-402.
31. Hoyos AB. Reduced incidence 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.
32. Bin-Nun A, Bromker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky , Caplan M, Hammerman C. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr.* 2005; 147: 192-96 .
33. Lin H, Su B, Chen A, Lin TW, Tsai C, Yeh T. Williams Oh. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2005; 115: 1-4.
34. Dani C, Biadaoli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis preterm infants. *Biol Neonate.* 2002; 82: 103-08.
35. Kitajima H, SumidaY, Tanaka R, Auki N, Takayama H, Fujimura M. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomized controlled trial. *Arch Dis Child.* 1997; 76: 101-07.
36. Deshpande G, Roo S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2007;369:1614-1620.
37. Barclay AR, Stenson B, Simpson JH. Probiotics for Necrotizing Enterocolitis: A Systematic Review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 45:569-576.
38. AlFaleh K, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008.

ANEXOS

Figura 1. Diagrama de flujo de patogénesis de ECN. ¹⁹



LPS lipopolisacaridos, PAF factor activador de plaquetas, PAF-AH PAF acetilhidrolasa, FNT factor de necrosis tumoral, NO oxido nitrico, PMN polimormonucleares, LTC₄ leucotrieno C₄, ROS especies de oxigeno reactivo, NEC enterocolitis necrosante.

Tabla 1. Casos de ECN presentados en el período comprendido del 2000 al 2007. Instituto Nacional de Perinatología. Tomado de los archivos de bioestadística.

AÑO	UCIREN	UCIN	TOTAL
2000	7	9	16
2001	3	2	5
2002	1	0	1
2003	3	6	9
2004	14	3	17
2005	13	13	26
2006	14	4	18
2007	4	1	5
TOTAL	59	38	97

TABLA 2. CRITERIOS DE BELL MODIFICADOS PARA ECN.⁴
 ECN (enterocolitis necrosante).

Estadio	Signos sistémicos	Signos intestinales	Signos Radiológicos
I: Sospecha de ECN	Inestabilidad térmica, apnea, bradicardia.	Alteraciones intestinales leves (residuo gástrico elevado, leve distensión abdominal, vómito, sangre oculta en heces).	Placa normal distensión abdominal leve o íleo.
IIA: Leve ECN Establecida	Similar al estadio I	Prominente distensión abdominal con o sin dolor, ausencia de ruidos intestinales, evacuaciones con sangre fresca.	Íleo, neumatosis intestinal.
IIB: Moderada ECN Establecida con deterioro clínico.	Acidosis metabólica, plaquetopenia, hiponatremia, hipoproteinemia	Eritema de la pared abdominal, dolor intenso con o sin masa palpable	Pneumatosis porta, ascitis temprana o asa intestinal dilatada y fija.
IIIA: Avanzada ECN	Inestabilidad clínica, acidosis metabólica y respiratoria, ventilación mecánica, hipotensión, oliguria, CID.	Masa abdominal persistente o puede haber un plastrón en el cuadrante inferior derecho del abdomen.	Los signos consisten en asa intestinal dilatada, fija y persistente o incremento del líquido de ascitis.
IIIB: Avanzada ECN avanzada con perforación intestinal.	Deterioro progresivo de signos vitales, choque.	Evidencia de perforación.	Pneumoperitoneo.

Tabla 3. Manejo de la ECN de acuerdo a los criterios de Bell.¹⁵

Estadio de Bell	Manejo
Estadio I (Sospecha)	Ahno, drenaje con SOG, BHc, electrolitos, Controles Rx cada 6-8h x 48h, hemocultivo, Ampicilina y gentamicina por 48h.
Estadio II (Establecida)	Ahno, NPT, línea venosa central, drenaje con SOG, BHc, electrolitos, Controles de Rx cada 6-8h x 48 a 72h, hemocultivo, Ampicilina, gentamicina y clindamicina x 14 días. Valoración de cirugía
Estadio III (Avanzada)	Ahno, NPT, línea venosa central, drenaje con SOG, BHc, electrolitos, Controles de Rx cada 6-8h x 48 a 72h, hemocultivo, Ampicilina, gentamicina y clindamicina x 14 días. Valoración de cirugía, (intervención quirúrgica indicada: resección con enterotomía o anastomosis primaria.)

TIPOS DE PROBIÓTICOS.

- Probiótico multiespecie. (Lactipan).

Forma farmacéutica y formulación.

Principios activos	Cada sobre contiene:
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2.0 x 10 ⁸
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	2.0 x 10 ⁸
<i>Lactobacillus casei</i>	2.0 x 10 ¹⁰
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.6 x 10 ⁸
<i>Lactobacillus lactis</i>	5.0 x 10 ⁷
<i>Streptococcus lactis</i>	2.0 x 10 ³

- *Saccharomyces boulardii*. Probiótico no bacteriano, agente bioterapéutico intestinal. (Floratil pediátrico).

Forma farmacéutica y formulación.

Liofilizado de <i>Saccharomyces</i>. Cada sobre contiene:	
<i>boulardii</i> (Hansen CBS 5926)	226.00 mg
equivalente a de células vivas	200.00 mg
Excipiente, c.b.p. 1 sobre.	

- Esporas de *Bacillus clausii* (Sinuberase)

Forma farmacéutica y formulación.

Cada ampolleta de suspensión ingerible contiene:	Vehículo cbp 5ml contiene:
Esporas de <i>Bacillus clausii</i>	1 billón UFC y 2 billones UFC

- *Enterococcus faecium* (Neoflor).

Forma farmacéutica y formulación.

Cada CÁPSULA contiene:	Excipiente cbp 1 cápsula contiene:
Cultivo seco de <i>Enterococcus faecium</i> Cepa Cernelle 68 (SF68)	3.530 mg equivalente a 75 x 10 ⁶ UFC*
Cada sobre con GRANULADO contiene:	1 Sobre contiene:
Cultivo seco de <i>Enterococcus faecium</i> Cepa Cernelle 68 (SF68)	3.535 mg equivalente a 75 x 10 ⁶ UFC*

- Lactobacilos acidophilus y Bifidobacterium bifidum (Infloran)

Forma farmacéutica y formulación.

Cada cápsula contiene:	1 cápsula contiene:
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10 ⁹
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10 ⁹

De acuerdo al análisis previo sobre el uso de probióticos en recién nacidos prematuros, respecto a la disminución de la incidencia de Enterocolitis Necrosante así como la mortalidad y ante la falta de estudios de tipo ensayos clínicos controlados en nuestra población, en el Instituto Nacional de Perinatología se inició un protocolo de Investigación de tipo ensayo clínico aleatorizado, doble ciego en prematuros con peso ≤ 1500 g. Alimentados con leche materna o con sucedáneos de la leche humana.

Para evaluar la eficacia de los probióticos en la reducción de la frecuencia de la enterocolitis necrosante, en pacientes con riesgo a desarrollarla.

Se inició a partir del 12 de mayo del 2008, en recién nacidos prematuros con peso al nacimiento menor de 1500 g, a los que se les administra probióticos multiespecie al inicio de la alimentación.

Actualmente se encuentra el siguiente protocolo en curso.

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN**

FECHA DE RECEPCIÓN: _____

REGISTRO PROVISIONAL DEL INPer: _____
(No llenar)

REGISTRO DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

1. DATOS GENERALES.

1.1. TÍTULO DEL PROYECTO

“USO DE PROBIÓTICOS PARA LA PREVENCIÓN DE ENTEROCOLITIS NECROSANTE EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO CON PESO \leq 1500g.”

1.2. ÁREA DE INVESTIGACIÓN

Básico-Clínica

1.3. SUBÁREA DE INVESTIGACIÓN

Neonatología

1.4. LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

1.5. FECHA DE INICIO: 12 mayo 2008 **FECHA DE TERMINACIÓN:**

1.6. INVESTIGADOR PRINCIPAL.

NOMBRE:	APELLIDO PATERNO	FERNÁNDEZ
	APELLIDO MATERNO	CARROCERA
	NOMBRE(S)	LUIS ALBERTO

FIRMA _____

ADSCRIPCIÓN: Subdirección de Neonatología, Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales.

CARGO: Médico especialista “A”

NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad en Pediatría, subespecialidad en Neonatología

PERTENECE AL INPer Sí (x) No ()

SUBDIRECCIÓN: Neonatología
Dr. Luis Alberto Fernández Carrocera

FIRMA _____

1.7. CO-INVESTIGADORES.

1.7.2 NOMBRE: APELLIDO PATERNO CABANILLAS
MATERNO AYON
NOMBRE(S) MARISOL

ADSCRIPCIÓN: Dirección de Enseñanza e Investigación
CARGO: Residente de 5° año de Neonatología
NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Pediatría Médica
PERTENECE AL INPer Sí (X) No ()

1.7.3 NOMBRE: APELLIDO PATERNO: SOLIS
MATERNO: HERRERA
NOMBRE(S): HAYDEÉ

ADSCRIPCIÓN: Dirección de Enseñanza e Investigación
CARGO: Residente de 6° año de Neonatología
NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad en Pediatría Médica y subespecialidad en Neonatología.
PERTENECE AL INPer Sí (X) No ()

1.7.4 NOMBRE: APELLIDO PATERNO: ROMERO
APELLIDO MATERNO: MALDONADO
NOMBRE(S): SILVIA

ADSCRIPCIÓN: Unidad de Cuidados Intermedios Neonatales.
CARGO: Jefe de Servicio
NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad en Pediatría Médica y subespecialidad en Neonatología.
PERTENECE AL INPer Sí (X) No ()

1.7.5 NOMBRE: APELLIDO PATERNO: SALINAS
APELLIDO MATERNO: RAMIREZ
NOMBRE(S): VICENTE

ADSCRIPCIÓN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales.
CARGO: Jefe de Servicio
NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad en Pediatría Médica y Subespecialidad en Pediatría.
PERTENECE AL INPer Sí (X) No ()

1.7.6 NOMBRE: **APELLIDO PATERNO:** DELGADILLO
APELLIDO MATERNO: AVENDAÑO
NOMBRE(S): JOSE MANUEL

ADSCRIPCIÓN: Subdirección de Neonatología, Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales.

CARGO: Jefe del departamento de Enseñanza

NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad en Pediatría, subespecialidad en Neonatología

PERTENECE AL INPer Sí (x) No ()

1.7.7 NOMBRE: **APELLIDO PATERNO:** BARRERA
APELLIDO MATERNO: REYES
NOMBRE(S): RENE HUMBERTO

ADSCRIPCIÓN: Departamento de Seguimiento Pediátrico

CARGO: Jefe de Servicio

NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad en Pediatría, subespecialidad en Neonatología

PERTENECE AL INPer Sí (x) No ()

1.8. DEPARTAMENTOS PARTICIPANTES

DEPARTAMENTO: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales

JEFE DEL DEPARTAMENTO: Dr. Vicente Salinas Ramírez

DEPARTAMENTO: Unidad de Cuidados Intermedios del Recién Nacido

JEFE DEL DEPARTAMENTO: Dra. Silvia Romero Maldonado

1.9. INSTITUCIONES PARTICIPANTES.

INSTITUCIÓN: Instituto Nacional de Perinatología

1.10. INTENCIÓN DIDÁCTICA

INTENCIÓN APLICATIVA:

TIPO DE TESIS: Licenciatura _____ Especialidad _____

CENTRO EDUCATIVO: Universidad Nacional Autónoma de México.

AUTORIZACIÓN:

DIRECCIÓN MÉDICA: Dr. Valentín Ibarra Chavarría.

DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA: Dr. José Jorge Espinoza Campos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. SÍNTESIS DEL PROYECTO

Se realizará un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego en prematuros con peso \leq 1500g. Alimentados con leche materna o con sucedáneos de la leche humana. Para evaluar la eficacia de los probióticos en la reducción de la frecuencia de la enterocolitis necrosante, en pacientes con riesgo a desarrollarla.

El objetivo de este estudio es determinar la frecuencia de la enterocolitis necrosante en los RN manejados con probióticos, por tal motivo nos planteamos la siguiente hipótesis. Con la administración de probióticos multiespecie se disminuirá la frecuencia de la enterocolitis necrosante en un 15% en RN prematuros con peso \leq 1500g.

Plan de análisis. Para las variables cuantitativas continuas y discretas se realizaran: promedio y desviación estándar. Para las variables cualitativas: porcentaje. Para evaluar el efecto se realizara: reducción del riesgo, riesgo relativo, riesgo absoluto y número de muestra necesario a tratar.

2.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enterocolitis necrosante (ECN) es el desorden gastrointestinal adquirido más común en recién nacidos (RN) pretérmino ocurre según diversos autores entre el 2.5 y 30%.¹

Los más comúnmente afectados son los RN con peso menor o igual a 1500g o \leq 32 SDG se incrementa en recién nacidos con peso menor a 1500g. Es más frecuente el diagnóstico durante la segunda semana de vida y ocurre más frecuentemente en recién nacidos previamente alimentados.

En donde el 25% de los sobrevivientes queda con secuelas.

La mortalidad de la ECN es de 10 a 50% de todos los casos de ECN.²

Por lo que la prevención es crucial en la disminución de la incidencia de ECN.

El uso de probióticos representa una prometedora opción para modificar, de manera positiva, el curso de la ECN.

2.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La enterocolitis necrosante es la emergencia intestinal más común en RN pretérmino ocurre según diversos autores entre el 2.5 y 30% de los RN ¹

Los más comúnmente afectados son los RN \leq 32 SDG, se incrementa en RN con peso menor a 1500g, de los cuales por lo menos el 25% mueren. El 25% de los sobrevivientes queda con secuelas de tipo del síndrome de intestino corto o de síndrome de mala absorción intestinal. Es más frecuente el diagnóstico durante la segunda semana de vida y ocurre más frecuentemente en RN previamente alimentados. ²

La ECN definida como una necrosis isquémica inflamatoria del intestino grueso o delgado, en cuyo desarrollo confluyen: Prematurez; la colonización bacteriana del tracto intestinal; la disponibilidad de un sustrato nutricional, en especial sucedáneos de leche humana, que favorecen el crecimiento bacteriano y el desarrollo de isquemia. Ello induce a una cascada inflamatoria con incremento en los niveles de citocinas como IL6, TNF alfa, complemento, prostaglandinas y leucotrienos, Factor activador de plaquetas (PAF), óxido nítrico, favoreciendo necrosis de las vellosidades intestinales. Niveles elevados de PAF y bajos de PAF acetilhidroxilasa, la enzima que degrada al PAF, induce necrosis intestinal. ^{1, 3-6}

Los sitios más comunes de ECN son el ileon terminal, ciego y colón ascendente. Las manifestaciones clínicas de la ECN pueden ser sutiles o catastróficas. Los signos usuales de los casos tempranos en RN pretérmino, pueden simular una sepsis generalizada incluyendo distensión abdominal, vómito biliar, prueba de guayaco positiva, periodos de apnea, letargo, inestabilidad de la temperatura, inestabilidad de la glucosa sanguínea, hipotensión y bradicardia. Otras manifestaciones de ECN tales como: Choque, perforación intestinal, peritonitis, eritema y sensibilidad de la pared abdominal se presentan en casos severos. Se clasifica de acuerdo a los criterios de Bell. ⁷⁻¹⁰

La colonización bacteriana del intestino de los RN pretérmino es diferente de la de los RN de término, ello depende de los diferentes cuidados neonatales, tales como tratamiento con antibiótico, humedad de la incubadora, lo que puede deteriorar los procesos de colonización.

Los niños sanos desarrollan una colonización de microflora en la que dominan en el intestino flora no patogénica especies tales como bifidobacterias, los RN pretérmino adquieren menor cantidad de bifidobacterias, por lo que son más susceptibles de colonización patógena. ^{11,12}

El predominio de bacterias facultativas en la flora fecal de RN pretérmino que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos son estafilococos (coagulasa negativo *estafilococos spp* y *estafilococos aureus*), enterobacterias (*Klebsiella spp* y *enterococos*), siendo los anaerobios más comunes los clostridios. Varios tipos de bacterias han sido asociados con ECN como *Clostridium species* unas de las más importantes que producen exotoxinas lo que puede causar daño a la mucosa intestinal y se asocian con neumatosis intestinal. Se ha reportado una alta incidencia de enterobacterias como: E coli, Proteus, Pseudomonas y Enterobacter en el intestino de recién nacidos con riesgo de ECN. ¹¹⁻¹³

Reportes de Santulli describen en animales de experimentación tres factores que intervienen en el desarrollo de ECN. 1) Lesión de la mucosa (por asfixia o catéteres), 2) alimentación con sucedáneos de leche huma (provee el sustrato para la fermentación de bacterias) y 3) la presencia de bacterias. ¹⁴

La administración de bacterias probióticos ha sido propuesta como una vía de colonización intestinal de flora deseable que cubre y cambia la permeabilidad de la mucosa intestinal, aumenta la respuesta de la IgA, incrementa la producción antiinflamatoria de citocinas y normalización de la microflora intestinal. ^{2,15}

Por ello una alternativa preventiva, terapéutica de la ECN sería evitar el crecimiento de patógenos, administrando probióticos para colonizar el intestino con flora no patógena. ^{16,17}

Los probióticos más conocidos son los lactobacilos utilizados para la fermentación de alimentos y las bifidobacterias, gérmenes predominantes en la flora intestinal de los niños alimentados con leche materna. ¹⁸

Se piensa que los probióticos deben de permanecer viables para ejercer un efecto positivo en el huésped; sin embargo se ha demostrado que son los metabolitos producidos y liberados por estos microorganismos los que interactúan con otras moléculas del intestino. Gracias a la capacidad de modificar la estructura de los receptores en la superficie de la mucosa o sus características de adhesión, los probióticos pueden funcionar como competidores o inhibidores de ciertas bacterias patógenas. ¹⁶

Los probióticos producen otros compuestos como: Ácido láctico, peróxido de hidrogeno, piroglutamato, ácidos grasos de cadena corta o bacteriocinas que entre otros efectos disminuyen el pH del medio y actúan como agentes bactericidas o bacteriostáticos. ¹⁶

Agentes probióticos

“Lactobacilos”

1. *L. acidophilus*
2. *L. caseí: GG, rhamosum*
3. *L. bulgaricus*
4. *L. plantarum*

“Bifidobacterias”

4. *B. bifidum*
5. *B. longum*
6. *B. breve*
 - *B. infantis*
 - *B. animalis*
 - *B. spp*

“*Streptococcus thermophilus*”

“*Scharinyces boulardii*”

Efectos de los probióticos.

- Normalizan la microflora
- Reducen la permeabilidad intestinal.
- Incrementan la función de la barrera mucosa
- Protegen en contra la colonización de patógenos.
- Disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias e incrementan la de las citocinas antiinflamatorias
- Mejoran la nutrición enteral
- Reducen la traslocación bacteriana, reduciendo la sepsis

Estudios realizados con probióticos.

Diversos estudios en animales de experimentación han demostrado algunos beneficios de los probióticos, como mediadores de la respuesta inflamatoria, estimuladores del sistema inmune de la mucosa intestinal.

Un estudio realizado por Sprague-Dawley¹⁶ con ratas neonatales, a las cuales les provoco ECN y las trato con una solución enriquecida con 1×10^9 ufc/d de *Bifidobacterium infantis*, demostró colonización del microorganismo en el intestino entre las 24 y 48hr de haber iniciado el tratamiento, en el grupo control, no hubo cambios en la población intestinal, además observo que la colonización por bífidos reduce la incidencia y muerte de ECN comparada con el grupo placebo (murieron en el grupo control 18 de 26 ratas, en el grupo con probiótico 5/22) con $p < 0.01$, con una disminución significativa en la producción de endotoxinas y en la expresión del gen que codifica para el factor activador de plaquetas, por lo que parece que la colonización con bifidobacterias disminuye el riesgo para ECN y modula la cascada inflamatoria. Se desconoce el mecanismo por el cual los bífidos pueden detener la cascada inflamatoria, aunque se piensa que la modulación de la flora intestinal y la permeabilidad del intestino pueden influir.¹⁶

Akisu¹⁹ produce a ratones prematuros hipoxia y reoxigenación induciendo ECN y los suplementa con *S. burlardii* probiótico oral; observando una elevación significativamente alta de FAP y FNT alfa en el grupo control ($p < 0.001$) con una reducción significativa en la generación de PAF en el grupo de probiótico que en el control ($p < 0.05$), no hubo diferencias significativas con el TNF alfa entre los dos grupos ($p > 0.05$).¹⁸

Se ha demostrado que el consumo oral de lactobacilos tiene influencia en la proporción de citocinas TH1 y TH2. Perdígón y su equipo observaron un marcado efecto en la producción de TNF alfa e IFN gama en un estudio realizado a ratones alimentados con varias especies de probióticos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* y *Sreptococcus thermophilus*. En presencia de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii spp*

bulgaricus se observó un incremento importante en las concentraciones de citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10, mientras que *Lactobacillus acidophilus* indujo la producción de IL-2 e IL-12.²⁰

Se ha informado un incremento de la producción de inmunoglobulinas en infantes alimentados con leche materna de madres que consumen probióticos en el embarazo, sugiriendo que los probióticos y el seno materno influyen de forma positiva en la inmunidad intestinal.^{21,22}

Recientes estudios han demostrado que la administración de probióticos en recién nacido pretérmino disminuye la incidencia y severidad de la enterocolitis necrosante.²³

Agarwal²⁴ realizó un estudio prospectivo, aleatorizado con 71 pacientes RN pretérmino con peso menor de 2000g al nacer, en el cual demostró la capacidad que tienen los *Lactobacilos GG* (*Lactobacillus rhamnosus*) de colonizar el intestino neonatal y modificar la flora bacteriana, observó que la respuesta del intestino de los neonatos a la preparación del probiótico depende de la edad gestacional, la edad postnatal y el uso de antibióticos. En el grupo de RN menores de 1500g (24 estudio y 15 control) recibieron 10⁹ ufc de lactobacilos LGG, dos veces al día de forma oral por 21 días, en donde la colonización ocurrió en 5 de 24 (21%), (de los 24 pacientes del grupo de estudio 14 RN fueron tratados 7 días previos con antibiótico y ninguno de ellos fue colonizado por LGG, los 10 RN restantes no recibieron antibiótico, en 5 de ellos hubo colonización por LGG $p < 0.01$).

En el grupo de RN con peso de 1500 a 1990g (23 estudio y 9 control) fueron tratados por 8 días, en donde la colonización ocurrió en 11 de 23 (47%) (10 de los 11 RN colonizados no recibieron terapia con antibiótico). Encontrando colonización en 16/47 los pacientes que fueron tratados con probióticos vs 0 de 24 en el grupo control $P=0.005$. LGG fue bien tolerado en todos los RN.²⁴

En varios ensayos clínicos aleatorizados, prospectivos se ha visto que el usar probióticos en prematuros parece que reduce el reservorio intestinal de especies patógenas, mejoran la tolerancia de la nutrición enteral, y así reducen la utilización de soporte parenteral, incrementa la barrera mucosa intestinal a bacterias y a los productos bacterianos.^{1,23-30}

Forero¹ realizó un ensayo clínico controlado y aleatorizado en prematuros <1500g alimentados con sucedáneos de leche humana desde el primer día de vida.

Se administró una dosis diaria de 1gr de probiótico multiespecie, previo al inicio de la alimentación con sucedáneos de leche humana hasta el egreso del cuidado intensivo, el grupo control recibió con la misma frecuencia una dosis de placebo. La variable de salida fue la presencia de enterocolitis necrosante (estadio II o mayor). Resultados en 15 meses se atendieron 378 recién nacido, 79 con peso menor a 1500gr, en 39 sin leche humana, los cuales se asignaron al azar a uno y

otro grupo. La incidencia de ECN fue menor en el grupo del probiótico que en el control (1 de 19 vs 7 de 20).

Entre los 20 RN del grupo control se documentaron 7 casos de ECN (incidencia: 35.0% IC 95% 15.4 - 59.2. Entre los 19 RN que recibieron probiótico se presentó un caso de ECN en un prematuro de 632g (incidencia: 5.3%, IC 95% 0.1 - 26.0). El riesgo de ECN en el grupo del probiótico fue de 0.15 (IC 95% 0.02 - 1.11) el grupo control (P=0.044). La reducción absoluta del riesgo dada por el uso de probiótico fue de 29.7% con un número de pacientes necesarios a tratar para prevenir un caso de ECN de 4.¹

Hoyos^{23,25} examinó la hipótesis con la administración profiláctica de lactobacilos orales *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis* en los neonatos en la unidad de cuidados intensivos neonatales, en la que se plantea disminuir la incidencia de enterocolitis necrosante, utilizó una dosis diaria de 250 millones de lactobacilos vivos *L. acidophilus* y 250 millones de *B. infantis*. Los probióticos se administraron en 1237 recién nacidos admitidos en la unidad de cuidados intensivos durante un año, con un grupo control de 1282 pacientes los cuales fueron hospitalizados un año antes. Resultados: No hubo complicaciones atribuidas a la administración diaria de *L. acidophilus* y *B. infantis*. Los grupos de estudio fueron comparados para el mismo lugar de origen, clínica y variables demográficas, no hubo diferencias estadísticamente significativas en estas variables. En el grupo control hubo 85 casos de enterocolitis necrosante comparado con 34 casos en el grupo que recibió profilaxis con probióticos (P<0.0002). En el grupo control hubo 35 casos de ECN asociada a complicaciones fatales comparada con 14 complicaciones fatales en el grupo que recibió profilaxis con probióticos (P<0.005). Sin embargo la comparación fue hecha con controles históricos, el tratamiento no fue ciego y los RN de estudio generalmente tienen un peso más alto y además de mayor edad gestacional 37 SDG, el 10% de los RN tenían un peso de 1500g.²⁵ Por lo que en base a la metodología los resultados son cuestionables.

Bin-Nun^{23,26} realizó un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, con la hipótesis de si al normalizar la flora intestinal con la administración profiláctica de probióticos se podrían mejorar las defensas naturales, reduciendo la incidencia y severidad de enterocolitis necrosante en neonatos pretérmino. Se designaron al estudio neonatos con peso al nacer menor de 1500g quienes fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos del Centro Médico de Shaare Zedek entre Septiembre del 2001 y Septiembre del 2004. Los pacientes fueron asignados al azar a cada grupo.

El grupo de estudio recibió suplementos de probióticos diariamente de ABC Dophilus probióticos mixtos (*bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium bifidus*) de 10⁹ UFC por día, diluido en 3 ml de leche materna ó en 3ml de sucedáneos de leche humana (Similar Special Care). El grupo control recibió leche materna o sucedáneos de leche humana. Los suplementos fueron continuados hasta las 36 semanas de edad gestacional postconcepcional, 72 RN fueron del grupo de estudio, con 73 controles; el peso al nacer fue de 1152

+/-262g vs 1111 +/- 278g, la edad gestacional de 30 +/- 3 semanas vs 29 +/- 4 semanas y el estudio duro 14.6 +/- 8.7días vs 17.5 +/- 13.6 días.

La incidencia de ECN se redujo en el grupo de estudio (3/72 (4%) vs 12/73 (16.4%) p= 0.03; riesgo relativo de 0.25; IC 95%: 0.075-0.86. Reduciendo la incidencia de ECN de 17% a un 4% con un riesgo de reducción de 12%, lo que podría significar que 8 RN necesitarán tratamiento para prevenir un caso de ECN. La incidencia de ECN (Criterios de Bell estadio 2 o 3) fue 1 de 72 (1%) Vs 10 de 73 (14%) p=0.013 en el grupo de estudio y control respectivamente. Los 3 casos más severos ocurrieron en el grupo control, aunque no hubo diferencias significativas en el inicio de la presentación de ECN en los dos grupos. Tres de los 15 RN con ECN murieron todos del grupo control.²⁵ Este ensayo clínico no indica el tamaño de la muestra.

Lin H.^{23,27} Realiza un ensayo clínico controlado aleatorizado, en donde evalúa los efectos benéficos de los probióticos en la reducción de la incidencia y severidad de ECN en RN menores de 1500g. Se realiza en un Centro de tercer nivel neonatal en el centro de Taiwán. En donde participaron 367 recién nacidos de peso muy bajo al nacer (<1500g), pacientes que sobrevivieron después de los 7 días de vida. El probiótico que se utilizó en el grupo de estudio fue Infloran (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis*) adicionándolo a la leche materna dos veces al día hasta el egreso, el grupo control se alimentó con leche materna solamente; 180 RN participaron en el grupo de estudio y 187 RN en el grupo control. La incidencia de muerte o de ECN (>al estadio 2) fue significativamente menor en el grupo de estudio 9 de 180 (5%) vs 24 de 187 (12.8%); P=0.009. La incidencia de ECN (> al estadio 2) también fue significativamente menor en el grupo de estudio comparado con el grupo control 2 de 180 (1.1%) vs 10 de 187 (5.3%); P=0.04 se observaron seis casos de ECN severa en el grupo control y ninguno en el grupo de estudio P=0.03. La incidencia de muerte, ECN o sepsis fue significativamente menor en el grupo de estudio 31 de 180 (17.2%) vs 60 de 187 (32.1%) respectivamente con P<0.009.

En ninguno de los cultivos positivos se cultivaron Lactobacilos o Bifidobacterium especies. El estudio mostró una reducción de la incidencia y severidad de ECN con leche materna y el uso del probiótico en RN de muy bajo peso al nacer con una reducción del riesgo relativo del 79%.^{23,27-28}

Sin embargo Dani^{23,29} no encontró diferencias entre los que les administró el probiótico y a los que les dio placebo, el estudio fue aleatorizado, doble ciego, para evaluar la eficacia del *Lactobacillus GG* en la reducción de la incidencia de infección del tracto urinario (IVU), sepsis bacteriana y ECN en RN pretérmino. En donde participan 585 RN menores de 33 SDG o peso menor de 1500g los cuales recibieron leche materna o sucedáneos de leche humana suplementada con *Lactobacillus GG* en una dosis con 6×10^9 ufc una vez al día hasta el alta. En el grupo de estudio la n=295 y el grupo control 290, con similares características clínicas. La duración de *Lactobacillus GG* y el placebo fue de 47.3 +/- 26 y 48.2 +/-24.3 días respectivamente. Aunque la IVU (3.4 vs 5.8%) y ECN (1.4% vs

2.7%) se encontraron con menor frecuencia en el grupo de estudio comparada con el grupo control, no hubo diferencias significativas. La sepsis bacteriana fue más frecuente en el grupo de probióticos (4.4% n=11) que en el grupo placebo (3.8% n=9) pero no hubo diferencias significativas.

La incidencia de ECN fue menor en el grupo de probiótico (1.4% n=4) que en el grupo placebo (2.8%, n=8) con una reducción del riesgo de 50%, sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa.

La edad de diagnóstico de ECN fue de 20 (+/-7.5) días en el grupo de estudio y de 15.5 (+/-9.7) días en el grupo control. Los pacientes quienes desarrollaron ECN se suplementaron con probiótico a la edad de 3.5 (+/-1.3; rango de 2-5) días y fueron suplementados por 16.5 (+/- 8.6; rango 10-29 días) antes del diagnóstico de ECN, concluye que siete días de suplementación con *Lactobacillus GG* no son efectivos en la reducción de la incidencia de IVU, ECN y sepsis en infantes pretérmino.^{28,29}

Kitajima^{23,30} Investigó la colonización con *Bifidobacterium breve* (BBG) en el intestino de RN de muy bajo peso al nacer. Fue un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado con 91 RN de muy bajo peso al nacer que fueron seguidos por 3 años.

La cuenta de bacterias viables fue examinada en las primeras 8 semanas. A los pacientes del grupo de estudio se les administro 1ml agua destilada con 0.5×10^9 de *Bifidobacterium breve*, iniciando en las primeras 24hr de vida, una vez al día durante 28 días. La tasa de colonización bacteriana fue examinada usando inmunohistoquímica con anticuerpos específicos monoclonales específicos para B breve. La inmunohistoquímica demostró que la colonización de bacterias administradas fue de 73% a las 2 semanas de edad pero solo 12% en el grupo control. La administración temprana de B breve disminuye significativamente el volumen de aire aspirado del estómago y mejora la ganancia de peso, según el autor. B breve puede colonizar el intestino inmaduro de forma muy efectiva y se asocia con menos signos abdominales anormales y más ganancia de peso en infantes de muy bajo peso al nacer, probablemente como resultado de la estabilización de la flora intestinal.

Es uno de los más grandes estudios reportados que mejoran la ganancia de peso y la tolerancia a la vía enteral con la cepa *Bifidobacterium breve* en RN pretérmino, sin embargo la incidencia y severidad no fue reportada.³⁰

2.4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la incidencia de ECN se incrementa en RN prematuros cuyos sobrevivientes pueden presentar severas complicaciones, con una elevada mortalidad que va de un 10 a un 50% en todos los casos de enterocolitis. Lo que representa un elevado costo a la institución y desde luego un desgaste económico y moral a las familias afectadas.

Por lo que la prevención es crucial, proponemos el uso de probióticos para la disminución de ECN, en reportes previos no se han reportado efectos adversos con la administración de probióticos, sin embargo, existen pocos ensayos clínicos controlados para la prevención de ECN con probióticos en pretérminos.

2.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de probióticos multiespecie en la reducción de la incidencia de ECN en RN pretérmino con peso menor o igual de 1500 gr, ingresados a las unidades de cuidado intermedio e intensivos neonatales.

2.5.2. HIPÓTESIS

H1: “La administración de probióticos multiespecie, en RN prematuros con peso menor o igual de 1500 gr disminuye la frecuencia de enterocolitis necrosante en un 15%”.

H0: “La ECN se presenta en la misma frecuencia en RN prematuros tratados con probióticos que en los RN no tratados”.

3. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se realizará un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego en prematuros con peso menor o igual a 1500 gr. Alimentados con leche humana o sucedáneos de leche humana para evaluar la eficacia de probióticos en la reducción de la incidencia de enterocolitis necrosante.

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

EXPERIMENTAL	<u> X </u>
CUASI-EXPERIMENTAL	___
OBSERVACIONAL	___

3.2 TIPOS DE DISEÑOS.

EXPERIMENTO O ENSAYO CLINICO	<u> X </u>
ESTUDIO DE COHORTE	___

ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES
ESTUDIO TRANSVERSAL

3.3. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

ANALÍTICO	<input checked="" type="checkbox"/>	DESCRIPTIVO	<input type="checkbox"/>
LONGITUDINAL	<input checked="" type="checkbox"/>	TRANSVERSAL	<input type="checkbox"/>
PROSPECTIVO	<input checked="" type="checkbox"/>	RETROSPECTIVO	<input type="checkbox"/>

4. METODOLOGÍA.

4.1. LUGAR Y DURACIÓN

El estudio se realizará en el Instituto Nacional de Perinatología, en la Unidad de Cuidados intensivos e intermedios neonatales en un periodo de 16 meses a partir de la aprobación del presente protocolo.

4.2. UNIVERSO, UNIDADES DE OBSERVACIÓN, MÉTODOS DE MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Universo:

Todos los recién nacidos pretérmino nacidos en el Instituto Nacional de Perinatología. Durante el periodo de estudio que ingresen a las unidades de cuidado intensivo e intermedio neonatal

Unidades de Observación:

Recién nacidos pretérmino con peso \leq de 1500g a los que se les inicie la vía enteral en la primer semana de vida.

Tamaño de la muestra:

Mediante el estadígrafo para diferencia de proporciones se determinó un número de 65 pacientes para cada grupo más 7 pacientes por cada grupo por posibles perdidas durante el estudio. Utilizando una frecuencia en el grupo sin probiótico $P_1 = 20\%$ y una frecuencia en el grupo con probiótico $P_2 = 5\%$, un delta del 15% , un beta de 0.20 poder 80% y un alfa ≤ 0.05 .

4.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- RN pretérmino con peso menor o igual a 1500g
- Con signos vitales normales.
- En condiciones de iniciar alimentación

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Apgar menor de 6 a los 5 minutos.
- Malformaciones de tubo digestivo.
- Síndromes genéticos.
- Antecedentes de hipoxia (parocardiorrespiratorio o asfixia)
- Hemorragia intraventricular grado III y IV.
- Presencia de conducto arterioso con repercusión hemodinámica.
- Malformaciones mayores.
- Hijos de madre con VIH.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes cuyo familiar responsable no desee continuar en el estudio.
- Pacientes que se trasladen a otra institución.

4.4. VARIABLES EN ESTUDIO

VARIABLE DEPENDIENTE

- Desarrollo de ECN grado II o mas

VARIABLE INDEPENDIENTE

- Uso de probióticos.

PROCEDIMIENTO:

1. Iniciar tratamiento con probióticos multiespecie en leche materna o sucedáneos de leche humana en todo recién nacido pretérmino con peso $\leq 1500g$.
El tratamiento se comenzará durante la primera semana de vida siempre y cuando se le indique iniciar alimentación.

2. Los pacientes serán asignados aleatoriamente a cada grupo.
 - a) Probiótico multiespecie
 - b) Leche que tenga indicada
3. Para el grupo de probiótico se administrará Probiótico multiespecie un g/día diluido en leche materna o sucedáneos de leche humana, al iniciar la vía enteral hasta su egreso.
4. Este probiótico al ser agregado a la leche humana o sucedáneo de leche no cambia las características de estas ni el color, por lo tanto no necesita enmascaramiento.
5. Para el grupo control se administrará leche materna ó formula láctea sin probiótico.
6. Durante la duración del tratamiento se vigilará desarrollo de ECN. o cuadro séptico asociado.

7.- El cegamiento se realizará en el departamento de dietología por una dietóloga asignada que de acuerdo a la hoja de aleatorización indicara el grupo al cual será asignado el paciente de acuerdo a como este sea captado y firmada su hoja de consentimiento informado.

FORMULA DE PROBIÓTICO MULTIESPECIE.

Principios activos	Cada sobre contiene:
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2.0 x 10 ⁸
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	2.0 x 10 ⁸
<i>Lactobacillus casei</i>	2.0 x 10 ¹⁰
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.6 x 10 ⁸
<i>Lactobacillus lactis</i>	5.0 x 10 ⁷
<i>Streptococcus lactis</i>	2.0 x 10 ³

7. El diagnóstico de ECN se realizará de acuerdo a los criterios de Bell (datos clínicos y radiológicos). Variable nominal dicotómica (presencia o ausencia).
8. Se clasificara de acuerdo a la severidad a partir del estadio II de quedando 4 estadios, los pacientes serán estratificados al final del proyecto en éstos estadios.

CRITERIOS DE BELL.

Estadio	Signos sistémicos	Signos intestinales	Signos Radiológicos
I: Sospecha de ECN	Inestabilidad térmica, apnea, bradicardia.	Alteraciones intestinales leves (residuo gástrico elevado, leve distensión abdominal, vómito, sangre oculta en heces).	Placa normal distensión abdominal leve o íleo.
IIA: Leve ECN Establecida	Similar al estadio I	Prominente distensión abdominal con o sin dolor, ausencia de ruidos intestinales, evacuaciones con sangre fresca.	Íleo, neumatosis intestinal.
IIB: Moderada ECN Establecida con deterioro clínico.	Acidosis metabólica, plaquetopenia, hiponatremia, hipoproteínemia	Eritema de la pared abdominal, dolor intenso con o sin masa palpable	Pneumatosis porta, ascitis temprana o asa intestinal dilatada y fija.
IIIA: Avanzada ECN	Inestabilidad clínica, acidosis metabólica y respiratoria, ventilación mecánica, hipotensión, oliguria, CID.	Masa abdominal persistente o puede haber un plastrón en el cuadrante inferior derecho del abdomen.	Los signos consisten en asa intestinal dilatada, fija y persistente o incremento del líquido de ascitis.
IIIB: Avanzada ECN avanzada con perforación intestinal.	deterioro progresivo de signos vitales, choque.	Evidencia de perforación.	Pneumoperitoneo.

4.5 RECOLECCION DE DATOS

Ver Anexo 1.

4.6 PLAN DE ANÁLISIS

Medidas de tendencia central, Riesgo relativo, T de Student y Chi2

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

- I. Investigación sin riesgo.
- II. Investigación con riesgo mínimo.
- III. Investigación con riesgo mayor al mínimo.

5. ORGANIZACIÓN

5.1. RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES

5.2 CAPACITACIÓN DE PERSONAL

5.2.1. CAPACITACIÓN DEL PERSONAL: No se requiere

5.2.2. ADIESTRAMIENTO DEL PERSONAL: No se requiere

5.3 FINANCIAMIENTO:

INTERNO EXTERNO
Llenar formato de Presupuesto (anexo 3)

En caso de Financiamiento Externo, indicar fuente y monto

FUENTE _____

MONTO _____

5.4. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

FECHA DE INICIO: 12 mayo 2008

FECHA DE TERMINACIÓN:

Nº	ACTIVIDAD	MES DEL CALENDARIO PROGRAMADO																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	DISEÑO Y DESARROLLO TÉCNICO	X	X	X															
2	VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS				X														
3	RECOLECCIÓN DE DATOS					X	X	X	X	X	X	X							
4	PROCESAMIENTO DE DATOS									X	X	X	X	X					
5	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN											X	X	X					
6	REDACCIÓN DEL INFORME FINAL														X	X			
7	ELABORACIÓN DE ARTÍCULO															X	X		

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Forero JG y Vera LM. Efectividad del uso de un prebiótico multiespecie en la prevención de enterocolitis necrosante en recién nacidos pretérmino: MedUNAB

[series en Internet].2005;5:5-10.Disponible en:
<http://editorial.unab.edu.co/revistas/medunab>.

2. Henry MC, Moss RL. Current in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol*. 2004;28:221-33.

3. Kliegman RM. En Pollin RA. Fox WW. Editores Fetal and neonatal physiology. Segunda edición. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1998. p. 1425-32.

4. Tojo RS y Leis RT. Alimentos funcionales. Su papel en la nutrición preventiva y curativa. *Bol. Pediatr*. 2003;43:376-95.

5. Caplan MS. Jilling T. The pathophysiology of necrotizing enterocolitis. *NeoReviews*. 2001;2:103-08.

6. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol*. 2002;6: 6-23.

7. Dimmitt RA, Moss L. Clinical management of necrotizing enterocolitis. *NeoReviews*. 2001;2:110-16.

8. Reber KM, Nankervis CA. Necrotizing enterocolitis: preventative strategies. *Clin Perinatol*. 2004;31:157-67.

9. Horton KK. Pathophysiology and current management of necrotizing enterocolitis. *Neonatal Radiology*. 2005;24:37- 46.

10. Acosta Rodríguez R, y Valencia Salazar G. En: En: *Pediatría médica*. Instituto Nacional de Pediatría. México: Trillas 2001. p. 51-4.

11. Millar M, Wilks M, Costeloe K. Probiotics for preterm infants?. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88:354-58.

12. Zhang L, Nan L, Neu J. Probiotics for preterm infants. *NeoReviews* 2005;6: 227-32.

13 Hoy CM, Wood CM, Hawkey PM, y Puntis JW. Duodenal Microflora in Very-Low-Birth-Weight Neonatos and Relation to Necrotizing Enterocolitis. *J Clin Microbiol.* 2000;68:4539-47.

14. Lee JS, Pollin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol.* 2003;8:449-59.

15. Kliegman RM, Willoughby RE. Prevención de enterocolitis necrosante con probióticos. *Pediatr Rev.* 2005;15:171-2.

16. Macedo MG. Probióticos y recién nacido: una formula para el futuro. *Nutrición clínica.* 2003;6:419-33.

17. Caplan M S, Jilling T. Neonatal Necrotizing Enterocolitis: Posible Role of Probiotic Supplementation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30 Suppl 2: 18-22.

18. Lorente BF y Serra JD. Alimentos funcionales: probiótico. *Acta Pediátrica Española.* 2001;59:150-55.

19. Akisu M, Baka M, Yalaz M, Huseyinov A, Kultursay N. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* Ameliorates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Necrotizing Enterocolitis in Young Mice. *Eur J Pediatrics Surg.* 2003;13:319-23.

20. Maldonado CG, Perdigón G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol.* 2004; 97:673-81.

21. Rinne M, Kallomaki M, Arvilommi A, Salmen S, PHD, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus /Enterococcus* microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr.* 2005;3:186-91.

22. Neu J. Probiotics: Protecting the intestinal ecosystema?. J Pediatr. 2005;5: 143-46
23. Hammerman C, Kaplan M. Prodiotics and neonatal intestinal infection, Curr Opin Infect Dis. 2006;19:277-282.
24. Argarwal R, Sharma N, Chaudhry R, Deorari A, Paul VK, Gewolb IH, Panigrahi P. Effects of oral *Lactobacillus* GG on enteric microflora in low-birth-weight neonates. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2003;36:397-402.
25. Hoyos AB. Reduced incidente necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophillus* and *Bifidobacterium infantis* to neonatos in an intensive care unit. Int J infect Dis. 1999;3:197-202.
26. Bin-Nun A, Bromker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky , Caplan M, Hammerman C. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. J Pediatr. 2005;147:192-96 .
27. Lin H, Su B, Chen A, Lin TW, Tsai C, Yeh T. Williams Oh. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necroziting enterocolitis in very low birth weight infants. Pediatrics. 2005;115:1-4.
28. Bell EF. Previniendo enterocolitis necrosante: lo que trabaja y ¿qué seguro?. Pediatrics. 2005;115:173-2.
29. Dani C, Biadaoli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrozoting enterocolitis preterm infants. Biol Neonate. 2002;82:103-08.
30. Kitajima H, SumidaY, Tanaka R, Auki N, Takayama H, Fujimura M. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomized controlled trial. Arch Dis Child. 1997;76:101-07.

CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES

NOMBRE:				
Registro:				
Número de aleatorización:				
Fecha de registro:				
SERVICIO:		UCIN ()	UCIREN ()	CUNA:
Fecha de nacimiento:				
Edad gestacional:				
Sexo:				
Peso al inicio:				
Peso al final:				
Días de vida extrauterina al inicio:				
RCIU				
Preeclampsia				
Hemorragia antenatal				
Amnioititis				
RPM > 12 hr				
Antibióticos maternos				
Esteroides antenatales				
Cesárea				
Apgar				
Enterocolitis	IIA	IIB	IIIA	IIIB
SDR				
Días con antibióticos:			Tipo:	
Aplicación de Indometacina:				
Catéter umbilical (días)		Arterial ()	Venoso ()	
Aplicación de Surfactante:				
Alimentación parenteral (días)				
Aplicación de aminos (Tipo/días)				
Muerte				
Otras patologías:				

Con estos resultados se podrá conocer el beneficio del uso de los probióticos para reducir la frecuencia de esta enfermedad.

De no aceptar, tenga la seguridad de que su paciente recibirá el tratamiento oportuno y apropiado que sea necesario para su mejoría clínica así como todos los recursos necesarios para su tratamiento.

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda información que se otorgue sobre mi identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Después de haber leído, y después que se me explicaron los riesgos y beneficios, acepto que mi hijo participe en este estudio. Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que esto signifique que la atención médica que se me proporciona se vea afectada por este hecho.

Para los fines que se estime conveniente firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos conservando una copia del documento.

**NOMBRE Y FIRMA DEL PADRE O
TUTOR QUE AUTORIZA**
Dirección y teléfono

TESTIGO
Relación con el paciente
Dirección y teléfono

TESTIGO
Relación con el paciente
Dirección y teléfono

PRESUPUESTO

Protocolo Núm.

Investigador responsable: Luis Alberto Fernández Carrocera

Sub-cuenta	CONCEPTO	NÚMERO	COSTO UNITARIO (paciente, caso, muestra, encuesta, etc.)	COSTO SUBTOTAL
01	Unidad de Investigación 01.1. Pacientes	133		
02	Personal auxiliar 02.1. Médico Residente	1	147.680.00 pesos por 16	147.680.00

	Medico adscrito	1	meses 236.670.72 pesos por 16 meses	236.670.72
03	Exámenes de laboratorio		Los habituales	
04	Estudio de gabinete		Los habituales	
05	Estudios especiales (describir)			
06	Materiales y equipo Sobres de probióticos multiespecie	399 cajas	141.00 pesos por caja	56.259.00
07	Otros (especificar) Autor del trabajo para presentación en dos congresos	2	20.000.00 pesos	20.000.00
08	Honorarios de investigadores			
			COSTO DIRECTO	
09	Instituto Nacional de Perinatología (20% del costo directo) para proyectos con financiamiento externo			
			COSTO TOTAL	460.609.72