

Yogures frescos frente a pasteurizados: estudio comparativo de sus efectos sobre los parámetros microbiológicos, inmunológicos y el bienestar gastrointestinal

Sofía Ballesta^a, Carmen Velasco^a, M.^a Victoria Borobio^a, Federico Argüelles^b y Evelio J. Perea^a

^aDepartamento de Microbiología de la Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. Sevilla. ^bGastroenterología y Nutrición Pediátrica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España.

OBJETIVO. Determinar si los efectos beneficiosos del yogur dependen de la viabilidad de las bacterias lácticas y son exclusivos de los yogures frescos, en comparación con los obtenidos de los yogures pasteurizados tras la fermentación.

MATERIAL Y MÉTODO. Mediante un ensayo enmascarado en una población adulta sana y durante 75 días, comparamos los efectos de la ingestión de yogures frescos y pasteurizados sobre los parámetros microbiológicos (presencia de bacterias vivas del yogur y detección de ADN en heces) e inmunológicos (mediante nefelometría, hematimetría y citometría de flujo). Con un cuestionario se evaluó el bienestar gastrointestinal y se utilizó una prueba de aliento para medir las diferencias en un ensayo de sobrecarga de lactosa tras el consumo de yogures.

RESULTADOS. No hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los parámetros inmunológicos, bienestar gastrointestinal y sobrecarga de lactosa de los voluntarios tras el consumo de yogures, con independencia del tipo de yogur ingerido. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) sólo se aisló en el 0,7% de las muestras de heces analizadas.

Streptococcus thermophilus no se aisló en ninguna de las muestras. EL ADN de las bacterias lácticas del yogur sólo fue detectado en el 12,5% de las muestras analizadas.

CONCLUSIÓN. El tránsito gástrico afectó a la supervivencia de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. No se encontraron diferencias respecto a los efectos que la ingestión de yogures frescos o pasteurizados pudieran tener sobre los parámetros inmunológicos, los valores de las pruebas de sobrecarga de lactosa, ni sobre el bienestar gastrointestinal.

Palabras clave: Yogures frescos. Yogures pasteurizados. Bacterias lácticas.

Fresh versus pasteurized yogurt: comparative study of the effects on microbiological and immunological parameters, and gastrointestinal comfort

OBJECTIVE. To determine whether the beneficial effects of yogurt are dependent on the viability of lactic bacteria and exclusive to fresh yogurt, by comparison with the effects of yogurt that is pasteurized after fermentation.

MATERIAL AND METHOD. Using a double-blind design in a healthy adult population over 75 days, we compared the effects of fresh and pasteurized yogurt on microbiological (presence of viable bacteria in yogurt and DNA detection in feces) and immunological (nephelometry, hematology, and flow cytometry) parameters. A questionnaire was used to assess gastrointestinal comfort. Differences in lactose absorption after ingestion of fresh or pasteurized yogurt were determined by breath hydrogen analysis. **RESULTS.** There were no significant differences in the results obtained for microbiological or immunological parameters, gastrointestinal comfort, or lactose test between the two types of yoghurt ingested. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) was isolated in 0.7% of the fecal samples analyzed. *Streptococcus thermophilus* was not found in any sample. DNA from lactic bacteria was detected in only 12.5% of the samples analyzed.

CONCLUSION. Transit through the gastrointestinal tract affects survival of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. No differences were found in the immunological parameters, gastrointestinal comfort, or lactose overload after intake of fresh or pasteurized yogurt.

Key words: Fresh yogurt. Pasteurized yogurt. Lactic bacteria.

Introducción

Ya en 1900, el inmunólogo Ilya Mechnikov trató de demostrar que el consumo de yogur era el responsable de la longevidad de los búlgaros. El interés que estos compuestos despertaron por su posible poder beneficioso se perdió con la aparición de los antibióticos. Paradójicamente, ha

Correspondencia: Dra. S. Ballesta.
Departamento de Microbiología.
Facultad de Medicina.
Universidad de Sevilla.
Avda. de Sánchez Pizjuán, s/n. 41009 Sevilla. España.
Correo electrónico: mudarra@us.es

Manuscrito recibido el 26-7-2007; aceptado el 24-1-2008.

sido la utilización de potentes antibióticos con su efecto colateral sobre la flora saprofita intestinal la que ha revitalizado el interés inicial que estos derivados de la leche suscitaron. A principios del siglo XX¹ comienzan los intentos por demostrar las consecuencias del consumo de los derivados de los lácteos. Desde la década de 1970 se estudia el posible efecto beneficioso tanto de las sustancias probióticas, ingredientes no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento de un limitado grupo de bacterias del colon², como de los probióticos, microorganismos vivos que, usados en forma de suplementos nutricionales, se considera que ejercen un efecto positivo en la salud más allá de los efectos nutricionales clásicos¹. Son muchos los beneficios que se han atribuido al consumo de probióticos en general y a sus productos alimenticios fermentados; modulan la función intestinal facilitando la evacuación gástrica, mejoran la digestión de la lactosa y estimulan el sistema inmune activando la producción de macrófagos y anticuerpos^{3,4}. El derivado lácteo más consumido entre la población es el yogur. Existen dos preparaciones diferentes del mismo: el clásico con bacterias vivas, cuyos efectos beneficiosos teóricamente se derivarían, por una parte, de la acción de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*Lactobacillus bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus* sobre la leche al transformarla en yogur (producción de lactasa y generación de ácido láctico principalmente) y, por otra, a la posible acción beneficiosa que producen estas bacterias vivas al establecerse en la microbiota intestinal. En el otro tipo de yogur, pasteurizado tras la fermentación, sus efectos beneficiosos teóricamente se derivarían de forma exclusiva de la ingestión de los productos de fermentación de las bacterias sobre la leche.

Teniendo en cuenta todo lo anterior y con objeto de determinar si los efectos beneficiosos del yogur son dependientes de la viabilidad de las bacterias lácticas, y por tanto, exclusivos de los yogures frescos o bien se deben sólo a la transformación bioquímica de la leche por las bacterias (en cuyo caso ambos tipos de preparados tendrían la misma acción), hemos planteado el siguiente estudio: evaluar en una población de individuos sanos, si tras el consumo de yogur fresco comparativamente con la ingestión de yogur pasteurizado, se producen diferencias en cuanto a:

Sobrecarga de lactosa

Las posibles diferencias obtenidas entre los grupos de voluntarios tras una prueba de sobrecarga de lactosa podrían relacionarse con el consumo de yogures frescos debido a la capacidad de *S. thermophilus* de producir lactasa, mejorando así la digestión de la lactosa y eliminando los síntomas en individuos con la condición de malabsorción de lactosa no diagnosticada.

Confort gastrointestinal

Si se producen diferencias entre el bienestar gastrointestinal de los consumidores de las dos presentaciones de yogur, podrían ser evidenciadas mediante una encuesta en la que se evalúa la ausencia de molestias gastrointestinales.

Parámetros del sistema inmunitario

Si el consumo de yogures frescos en comparación con el consumo de pasteurizados produjera una variación de los

parámetros estudiados para evaluar la inmunidad general, ésta podría ser evidenciada en el laboratorio mediante la cuantificación de anticuerpos (inmunoglobulinas), así como el número de leucocitos neutrófilos y linfocitos, y por las subpoblaciones linfocitarias de células T, CD3, CD4 y CD8.

Presencia de bacterias del yogur en heces

Si las bacterias acidolácticas propias del yogur (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*) fueran capaces de sobrevivir y establecerse en el intestino, éstas deberían ser detectadas en las heces de los voluntarios tras ingerir yogur fresco durante el período de este ensayo.

En otros estudios no se encontró que las bacterias sobrevivieran tras la ingestión de yogures frescos durante cortos períodos de tiempo. Por esta razón, planteamos un ensayo en el que los participantes ingieren yogures frescos y pasteurizados durante un período de tiempo más largo (75 días) y se aumenta el número de intervenciones en el ensayo con objeto de realizar una monitorización continua. Los resultados obtenidos los comparamos con los de un grupo de control que no consume yogures durante ese período de tiempo.

Material y método

Descripción del ensayo

Se realizó un ensayo enmascarado y controlado sobre una población de individuos sanos, que declararon no sufrir molestias intestinales en las encuestas realizadas ni presentaban alteraciones de los parámetros bioquímicos estudiados al inicio del ensayo, siguiendo las recomendaciones de la Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food⁵.

La muestra poblacional estuvo formada por 80 voluntarios previamente informados del ensayo e instruidos en cuanto a las pautas que debían seguir para las determinaciones de los parámetros de estudio y en cuanto al seguimiento de una dieta con ausencia de lácteos fermentados desde 15 días antes de comenzar el ensayo y durante los períodos de descanso.

Los 80 participantes fueron distribuidos en tres grupos. Durante 30 días el grupo 1, en adelante F-P, formado por 30 voluntarios, consumió diariamente tres yogures frescos, descansó un período de 15 días sin ingerir yogures (tiempo de lavado) y, de nuevo, durante 30 días consumió tres yogures pasteurizados diarios. En paralelo, el grupo 2 (P-F), formado también por 30 voluntarios, inició el ensayo ingiriendo yogures pasteurizados durante 30 días y, posteriormente, yogures frescos durante otros 30 tras un período de descanso de 15 días. El grupo de control, que incluía 20 voluntarios, no consumió ningún tipo de yogures durante los 75 días que duró el ensayo.

Cada yogur contenía 125 g de producto. Los dos tipos de yogures tenían envases idénticos salvo en una diminuta codificación que diferenciaba los frescos de los pasteurizados. Los voluntarios no conocieron la clase de yogur que consumían. Todos los envases se mantuvieron en frío a lo largo del estudio para evitar desenmascarar el ensayo.

En todos los voluntarios participantes se realizó:

- Prueba de sobrecarga de la lactosa.
- Confort gastrointestinal mediante un cuestionario.
- Parámetros inmunológicos mediante el estudio de inmunoglobulinas y celularidad.
- Presencia de bacterias del yogur (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*) y de su ADN en las heces.

La tabla 1 recoge las determinaciones realizadas en los tres grupos a lo largo del ensayo.

TABLA 1. Determinaciones realizadas en los diferentes grupos a lo largo de los 75 días estudio

| Grupo de estudio | 15 días previos al ensayo | Día 1 | Día 30 | Del día 31 al día 45 | Día 46 | Día 75 |
|------------------|---------------------------|---------------|----------------|----------------------|----------------|---------------|
| Grupo 1 (F-P) | No ingesta | SL, CG, I, CD | SL*, CG, I, CD | Período | SL*, CG, I, CD | SL, CG, I, CD |
| Grupo 2 (P-F) | de lácteos | SL, CG, I, CD | SL*, CG, I, CD | de lavado | SL*, CG, I, CD | SL, CG, I, CD |
| Grupo de control | fermentados | SL, CG, I, CD | – | de 15 días | | SL, CG, I, CD |

*Sólo se realizó la prueba a los participantes que mostraron indicios de malabsorción de lactosa el primer día.

CD: cultivo de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* y detección de su ADN en las heces; CG: confort gastrointestinal; I: parámetros inmunológicos; SL: sobrecarga de lactosa.

Prueba de sobrecarga de lactosa

Para determinar la posible malabsorción de lactosa se utilizó una prueba de aliento que permitió determinar la cantidad de hidrógeno en el aire espirado. Se cuantificó con un equipo Bedfon EC60 Gastrolyzer, Breath H₂ Monitor.

A todos los voluntarios en ayunas, fuera del período de sueño y sin haber fumado ni realizado ejercicios bruscos, se les realizó la prueba basal de hidrógeno espirado. Posteriormente, se les administró un preparado con 25 g de lactosa disuelto en agua y se les realizaron mediciones cada 30 min durante 3 h. El ensayo se consideró positivo cuando se obtuvieron incrementos superiores a 20 partículas por millón (ppm) de H₂ espirado con relación al resultado basal.

Prueba de confort gastrointestinal

Mediante el cuestionario GIQLY[®] modificado se evaluó el bienestar gastrointestinal de los participantes. El cuestionario se resumió escogiendo sólo aquellas preguntas que evaluaban la influencia de la ingestión de lácteos sobre la calidad de vida gastrointestinal, entendiendo por calidad la ausencia de molestias gastrointestinales.

Parámetros del sistema inmunitario

Se cuantificaron los parámetros inmunológicos de todos los voluntarios en ayunas mediante la determinación de IgA, IgG, IgM, leucocitos, neutrófilos, linfocitos totales, linfocitos CD3+, CD4+ y CD8.

Las inmunoglobulinas (IgG, IgA, e IgM) se determinaron mediante nefelometría usando un equipo Beckman Coulter Immage (Immunochemistry system). Los leucocitos (linfocitos y neutrófilos) fueron cuantificados por un contador hematimétrico (Coulter). Las subpoblaciones linfocitarias fueron evaluadas por citometría de flujo (Fac-Scalibur, Becton Dickinson).

Análisis microbiológicos

Presencia de bacterias vivas en el yogur

Sistemáticamente en cada lote de yogures se comprobaba la carga bacteriana utilizando los medios MRS y M17^{7,8} (Biokar Diagnostics). Igualmente, se comprobaba que no se detectaban bacterias vivas en los yogures pasteurizados.

Presencia de bacterias vivas del yogur en las heces

Se resuspendió homogéneamente 1 g de heces en 10 ml de solución salina y se centrifugó a baja velocidad durante 5 min. A partir de 100 µl del sobrenadante se realizaron diluciones en base 10, cultivándose 100 µl de cada una de ellas en los medios MRS y M17 (Biokar Diagnostics) para el aislamiento de *lactobacillus* y estreptococos, respectivamente^{6,7}. Las placas con medios MRS fueron incubadas durante 48 h a 37 °C en anaerobiosis. A cada una de las colonias aisladas en MRS que presentaban morfología diferente se les realizó tinción de Gram. Los bacilos grampositivos (BGP) se sembraron en el medio LAMVAB⁹ para diferenciar los *lactobacillus* por su resistencia a vancomicina¹⁰ y su acidofilia^{6,7}. Posteriormente, para la determinación de la especie, se estudió su utilización de azúcares mediante el sistema api50 CH (Biomerieux) siguiendo normas del FIL¹¹. Las placas con M17 se incubaron 48 h a 42 °C en aerobiosis. A todos los aislamientos en cuya tinción de Gram se visualizaron estreptococos se le realizó una identificación bioquímica siguiendo normas del FIL¹⁰ y todos los que cumplían los criterios de *S. thermophilus* por ese método se identificaron posteriormente mediante el sistema api20 Strept (bioMérieux).

TABLA 2. Resumen de los valores de las variables estudiadas a lo largo del ensayo. Las muestras han sido comparadas mediante análisis estadístico, utilizando los tests de Kruskal-Wallis, la U de Mann-Whitney, ANOVA y la t de Student

| Variables | Día 1 | | |
|---|-------------|-------------|-------------|
| | G0 | G1 | G2 |
| Individuos con síntomas de malabsorción de lactosa no diagnosticada | 2 | 1 | 0 |
| Índice de confort gastrointestinal | 41,8 ± 3,9 | 41,9 ± 4,0 | 40,3 ± 3,4 |
| Parámetros inmunológicos | | | |
| CD3 | 70,2 ± 6,3 | 73,1 ± 7,4 | 74,8 ± 6,4 |
| CD4 | 42,0 ± 7,4 | 42,0 ± 8,6 | 45,2 ± 6,5 |
| CD8 | 23,0 ± 6,9 | 24,7 ± 7,6 | 24,3 ± 5,9 |
| IgA | 229 ± 77 | 241 ± 88 | 262 ± 77 |
| IgG | 1.122 ± 123 | 1.076 ± 188 | 1.132 ± 167 |
| IgM | 138 ± 53 | 137,5 ± 64 | 140 ± 71 |
| Leucocitos | 6,3 ± 1,4 | 6,7 ± 1,7 | 6,3 ± 1,6 |
| Neutrófilos | 4,3 ± 0,8 | 3,5 ± 1,0 | 3,4 ± 1,2 |
| Monocitos | 3,1 ± 0,9 | 2,4 ± 0,9 | 2,2 ± 0,6 |
| Nº de individuos en los que se cultiva <i>S. thermophilus</i> de heces | ND | ND | ND |
| Nº de individuos en los que se cultiva <i>L. bulgaricus</i> de sus heces | ND | ND | ND |
| Nº de individuos en los que se detecta ADN de <i>S. thermophilus</i> en sus heces | ND | ND | ND |
| Nº de individuos en los que se detecta <i>L. bulgaricus</i> en sus heces | ND | ND | ND |

G0: grupo de control; G1: grupo 1 (F-P); G2: grupo 2 (P-F); ND: no se detecta; (–): no se realiza su determinación.

Métodos microbiológicos moleculares

Para el análisis molecular del ADN extraído de las heces, 0,5 g de heces frescas de cada voluntario se resuspendieron en solución salina y se centrifugaron a baja velocidad. 200 µl de la fase superior fueron procesados utilizando el *kit* QIAamp DNA Stool Minikit de QiaGen. Se transfirieron cantidades idénticas de todas las muestras a membranas de Nylon Hybond N+, de Pharmacia Biotech, para ser hibridadas con sondas específicas que permiten la detección de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. Se incluyeron tres controles positivos: ADN extraído de cultivos puros de ambas bacterias, directamente de yogur y de mezclas de bacterias/heces y de yogur/heces.

Como sondas se utilizaron fragmentos de proteína C reactiva (PCR) marcados con digoxigenina. Para la detección de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* se usó un fragmento de 715 pares de bases (pb) del gen *add* y un fragmento de 968 pb del gen *lacZ*, respectivamente. La amplificación y el marcaje de las sondas se realizó con cebadores y condiciones de PCR descritas con anterioridad¹².

Los cebadores utilizados para *Lactobacillus bulgaricus* fueron F: 5'-AATTCCGTCACCTCCTCATC-3' y R: 5'-TGATCCGCTGCTTCATTTCA-3' en las condiciones de PCR: 10 ciclos: 20 s a 94 °C, 75 s a 65 °C y 40 s a 72 °C seguidos de 35 ciclos de 20 s a 94 °C, 50 s a 55 °C y 30 s a 72 °C y 3 min a 72 °C de elongación final. Para *S. thermophilus* se usaron F: 5'-CACTATGCTCAGAATACA-3' y R: 5'-CGAACAGCATTGATGTTA-3' con 35 ciclos a 20 s a 94 °C, 60 s a 58 °C y 30 s a 72 °C y elongación final a 72 °C durante 3 min.

Para la hibridación se utilizó el *kit* Dig Easy HybGranules de Roche. Se realizaron dos lavados de 5 min con 2 × SSC (citratato sódico) y 0,1% dodecil sulfato sódico (SDS) a temperatura ambiente y dos lavados de 15 min con 0,5 × SSC y 0,1% SDS a 68 °C. La detección de la hibridación se realizó usando anticuerpos antidigoxigenina y el sustrato quimioluminiscente CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]Decan]-4-yl) Phenylphosphat), ambos de Roche.

Análisis estadístico

Se utilizaron los tests de Kruskal-Wallis, la U de Mann-Whitney, ANOVA y la t de Student^{13,14}. Para comparar las muestras de los distintos grupos en los días 0, 30, 46 y 75 se utilizó el ANOVA de un factor cuya aplicación requiere normalidad en los datos de la muestra (contrastada mediante Shapiro-Wilks) e igualdad de varianzas (comprobada mediante el test de Levene). La comparación de muestras sin normalidad en los datos se realizó aplicando el test de Kruskal-Wallis. Para comparar sólo dos muestras cuyos datos cumplen la normalidad,

se utilizó la t de Student. En el caso de que las dos muestras comparadas no cumplieran la hipótesis de normalidad se recurrió a una prueba no paramétrica, la U de Mann-Whitney.

Resultados

Los resultados obtenidos de este estudio están resumidos en la tabla 2.

Sobrecarga de lactosa

Tras la ingesta continuada de ambos tipos de yogures no hubo diferencias significativas entre los resultados de la pruebas de malabsorción de lactosa, obtenidos en los grupos de voluntarios F-P y P-F tanto en condiciones basales como tras el consumo de yogures, con independencia del tipo de yogur ingerido. Tampoco se apreciaron diferencias al compararse éstos con el grupo de control. Sólo tres voluntarios participantes en el estudio se identificaron inicialmente como malabsorbedores de lactosa, dos en el grupo de control y uno en el grupo de consumidores de yogures F-P (grupo 1). Este último participante no mostró variaciones en los resultados de la prueba de malabsorción de lactosa durante el estudio ni manifestó molestias intestinales según se desprende de su encuesta de confort gastrointestinal.

Confort gastrointestinal

No se detectaron variaciones en el bienestar gastrointestinal de los voluntarios después de la ingestión de yogures con independencia del tipo de yogur consumido. Tampoco se encontraron diferencias al compararse con el grupo de control.

Parámetros del sistema inmunitario

Los parámetros inmunológicos valorados, inmunoglobulinas, linfocitos y sus poblaciones, no registraron variaciones tras el consumo de yogures frescos o pasteurizados en ninguno de los dos grupos. No se encontraron diferencias

| Día 30 | | | Día 46 | | | Día 75 | | |
|--------|-------------|-------------|--------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| G0 | G1 | G2 | G0 | G1 | G2 | G0 | G1 | G2 |
| – | 1 | 0 | – | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| – | 40,9 ± 4,7 | 40,6 ± 3,3 | – | 42,2 ± 4,3 | 42,7 ± 4,2 | 42,2 ± 4,3 | 42,2 ± 4,6 | 40,2 ± 3,7 |
| – | 72,2 ± 6,5 | 72,8 ± 8,6 | – | 72,6 ± 6,8 | 74,3 ± 6,6 | 71,6 ± 6,1 | 73,0 ± 6,2 | 73,2 ± 6,7 |
| – | 41,8 ± 8,2 | 44,6 ± 5,6 | – | 42,3 ± 7,7 | 45,0 ± 6,8 | 43,1 ± 7,3 | 42,3 ± 7,7 | 44,0 ± 6,6 |
| – | 24,4 ± 7,4 | 23,7 ± 5,6 | – | 24,5 ± 6,9 | 24,0 ± 6,1 | 22,9 ± 8,3 | 25,2 ± 8,0 | 24,7 ± 7,2 |
| – | 231 ± 83 | 267,4 ± 87 | – | 251 ± 98 | 281,2 ± 109 | 213 ± 77 | 254 ± 87 | 280 ± 88 |
| – | 1.131 ± 201 | 1.209 ± 187 | – | 1.098 ± 160 | 1.154 ± 166 | 1.080 ± 144 | 1.077 ± 188 | 1.253 ± 180 |
| – | 134,8 ± 60 | 133,8 ± 73 | – | 153 ± 71 | 145,9 ± 71,4 | 151 ± 71 | 145 ± 71 | 153 ± 74 |
| – | 6,5 ± 1,3 | 5,9 ± 1,6 | – | 6,4 ± 1,7 | 6,1 ± 1,8 | 7,1 ± 2,1 | 6,6 ± 2,3 | 7,9 ± 2,2 |
| – | 3,5 ± 0,7 | 3,2 ± 1,2 | – | 3,4 ± 1,1 | 3,5 ± 1,2 | 5,6 ± 0,9 | 4,3 ± 0,9 | 3,8 ± 1,3 |
| – | 2,2 ± 0,8 | 2,0 ± 0,4 | – | 2,2 ± 0,7 | 2,0 ± 0,5 | 3,7 ± 1,5 | 2,2 ± 0,6 | 1,9 ± 0,5 |
| ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1 | 1 |
| ND | ND | ND | ND | 1 | ND | ND | ND | ND |
| ND | 6 | ND | ND | 4 | ND | ND | ND | ND |

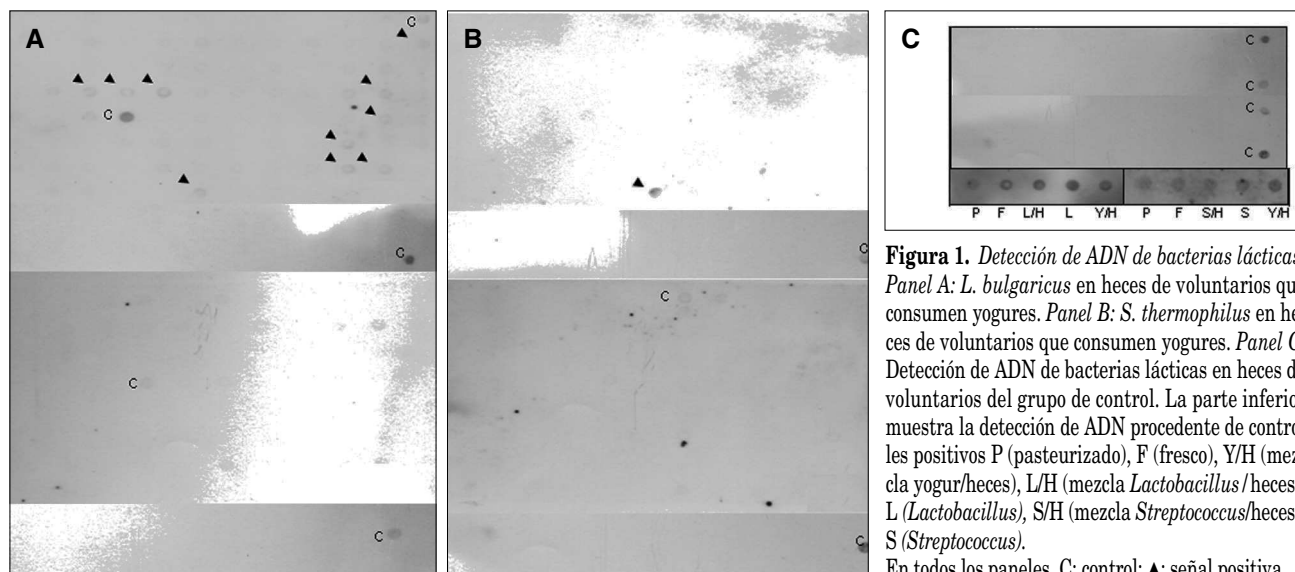


Figura 1. Detección de ADN de bacterias lácticas. Panel A: *L. bulgaricus* en heces de voluntarios que consumen yogures. Panel B: *S. thermophilus* en heces de voluntarios que consumen yogures. Panel C: Detección de ADN de bacterias lácticas en heces de voluntarios del grupo de control. La parte inferior muestra la detección de ADN procedente de controles positivos P (pasteurizado), F (fresco), Y/H (mezcla yogur/heces), L/H (mezcla *Lactobacillus*/heces), L (*Lactobacillus*), S/H (mezcla *Streptococcus*/heces), S (*Streptococcus*). En todos los paneles, C: control; ▲: señal positiva.

estadísticamente significativas entre las muestras obtenidas de los días 0, 30, 46 y 75 para ninguna de las variables inmunológicas ni dentro de cada grupo ni cuando se comparaban entre ellos.

Presencia de bacterias vivas en el yogur

El número aproximado *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en los yogures frescos era de 10^7 ufc/g de yogur de cada uno de los dos tipos de bacterias, lo que hace un total de 1.250 millones de bacterias de cada especie en cada yogur fresco. No se detectaron bacterias vivas en los yogures pasteurizados.

Presencia de bacterias del yogur en las heces

En las 280 muestras de heces estudiadas en los tres grupos se aislaron un total de 222 BGP en el medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), de los cuales 111 se identificaron genéricamente como *Lactobacillus* spp. por su crecimiento en LAMVAB. Al finalizar el período de estudio se observó un incremento de los bacilos grampositivos y *Lactobacillus* spp. en general en los tres grupos de voluntarios, siendo ligeramente mayor este incremento en el grupo 1 (F-P).

Se identificaron 12 especies diferentes de *Lactobacillus*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. pentosum*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus*, *L. curvatus*, *L. lactis* y *L. collinoides*, y fue *L. rhamnosus* el más frecuente con 28 aislamientos. Esto supone el 10% de las muestras de heces procesadas. Un total de 22 de estos aislamientos (el 80% del total) se obtuvieron en la cuarta muestra, tanto en las heces de los voluntarios del grupo 1 (F-P) como en las del grupo 2 (P-F). *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) sólo se aisló en la cuarta y última muestra (día 75) de dos voluntarios que correspondían cada uno a los grupos 1 y 2, lo que supone la presencia de este bacilo en el 0,7% de las muestras de heces analizadas.

De un total de 296 aislamientos de estreptococos identificados en las 280 muestras de heces obtenidas antes, durante y al final del estudio, ninguno se identificó como

S. thermophilus. El número de estreptococos aislados se mantuvo constante a lo largo del estudio en los dos grupos de voluntarios y en el control.

Presencia de ADN de bacterias del yogur en heces

Del total de 280 muestras de heces estudiadas, se obtuvieron 10 con hibridación positiva para *L. bulgaricus* y una de ellas también con hibridación positiva para *S. thermophilus* (tabla 2). Todas las señales positivas correspondieron a heces de voluntarios del grupo 1 (F-P), tras finalizar el período de ingestión de yogures frescos (día 30) y tras el período de lavado (día 46). No hubo señales positivas en ninguna de las muestras de heces de individuos de los grupos 2 (P-F) y control (fig. 1).

Discusión

De acuerdo con las normas de la FAO y de la OMS para la evaluación de probióticos en los alimentos⁵, los microorganismos probióticos deben ser capaces de sobrevivir el paso del intestino. Sin embargo, y aunque los yogures frescos se sitúan a la cabeza de la lista de alimentos probióticos, expertos en este campo han encontrado que *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* son sensibles a las condiciones existentes en el tracto digestivo y no alcanzan una alta concentración en el intestino¹⁵. Bajo la premisa de que estas bacterias acidolácticas no forman parte de la microbiota intestinal, si fueran capaces de sobrevivir y establecerse en el intestino, deberían ser detectadas en las heces de los voluntarios tras ingerir yogur fresco durante un período prolongado. Mediante métodos tradicionales de cultivos, encontramos que no se aisló *S. thermophilus* en las heces de ningún voluntario y que *L. bulgaricus* sólo se aisló al final del estudio, en la cuarta y última muestra (día 75) de dos individuos, uno del grupo 1 (F-P) y el otro del grupo 2 (P-F), lo que supone su presencia sólo en el 0,7% de las muestras de heces analizadas. Estudios similares realizados por otros investigadores^{16,17} no consiguieron aislar ninguna bacteria viva del yogur ingerido en las heces de sus voluntarios. Los escasos aislamientos obteni-

dos en las heces de los voluntarios de nuestro estudio pueden justificarse por el prolongado período de ingesta que hemos utilizado y el número de intervenciones para su monitorización. El hecho de que el 80% de los aislamientos de *L. rhamnosus* procedan de la cuarta muestra (día 75) en los dos grupos (grupo 1: F-P y grupo 2: P-F), parece relacionar el incremento de esta especie con el consumo de lácteos fermentados, independientemente de su presentación, frescos o pasteurizados.

Las técnicas moleculares permiten la detección de los ADN de bacterias, pero sus resultados positivos no pueden ser interpretados como viabilidad celular o como el establecimiento de estos microorganismos en el colon. Los resultados obtenidos utilizando métodos moleculares apoyan nuestras sospechas de que las bacterias ingeridas con el yogur no sobreviven al tránsito gástrico, ya que no se detectan restos de ADN en las heces del 87,5% de los voluntarios. Este porcentaje podría ser aún más elevado en la población general, ya que la ingesta de yogures en ésta se hace con menor regularidad y en menor cantidad que en los participantes del estudio. Los restos de ADN detectados en el 12,5% de voluntarios restantes no se correspondían probablemente con bacterias vivas, pues no se correlacionaron con el aislamiento de las cepas en los cultivos bacterianos llevados a cabo en paralelo en estas mismas muestras.

La mayoría de los estudios sugieren un efecto beneficioso de los probióticos como tratamiento y prevención de determinadas enfermedades (diarrea en niños, diarrea asociada al uso de antibióticos, síndrome del intestino irritable y enfermedad inflamatoria intestinal)^{4,18}. También es conocido que los productos de la leche fermentada mejoran la digestión de la lactosa y los síntomas de intolerancia en los malabsorbedores de lactosa. Se calcula que en el proceso de fermentación, ocurrido en yogures frescos y pasteurizados, disminuye la lactosa en el 25-50%, aproximadamente. Además, las bacterias vivas de los yogures frescos podrían seguir liberando betagalactosidasa, aunque para que esta liberación sea efectiva en el intestino, se requiere una pared celular intacta como mecanismo de protección de las bacterias para sobrevivir el paso del tracto digestivo y la acción de la bilis¹⁹. Consecuentemente, la posible muerte de las bacterias al atravesar el tracto gastrointestinal explica que no encontráramos diferencias en el resultado de la prueba del hidrógeno utilizada para medir la malabsorción de lactosa en los voluntarios tras la ingesta continuada de tres yogures diarios con y sin bacterias vivas y que esta ingesta no se asociara con diferencias en el confort gastrointestinal de los voluntarios de los dos grupos.

Algunos estudios demuestran que las bacterias probióticas pueden modificar determinados parámetros del sistema inmunitario^{15,20}, incluyendo la inmunidad humoral, celular y la inmunidad no específica. Sin embargo, existe un debate abierto sobre si estos efectos inmunomoduladores dependen del estado del sistema inmunitario del huésped y de si se requiere viabilidad y colonización de las bacterias probióticas para que los efectos moduladores sobre el sistema inmunitario sean detectados. Como otros grupos de investigadores^{15,16}, nosotros no observamos una influencia del consumo de yogures con y sin bacterias vivas en los parámetros inmunológicos estudiados de voluntarios sanos al no encontrar diferencias en los parámetros inmunológicos que lo cuantifican en este estudio (IgA,

IgG, IgM, linfocitos CD3, CD4, CD8, linfocitos totales y neutrófilos).

Conclusión

Tras una ingestión de tres yogures frescos diarios durante 30 días las bacterias vivas presentes en los yogures ingeridos sólo se aislaron en el 0,7% de las muestras de heces estudiadas, con lo que podemos afirmar que éstas no sobreviven al tránsito gástrico. No se encontraron diferencias en los efectos que la ingestión de yogures frescos o pasteurizados pudieran tener sobre los parámetros inmunológicos ni sobre el bienestar gastrointestinal, ya que no se registraron variaciones en ellos.

En resumen, no encontramos efectos adversos ni beneficiosos sobre los parámetros estudiados relacionados con la ingestión de yogures frescos o pasteurizados. Tampoco nuestros resultados cuestionan que el yogur sea un producto sano y saludable, pero no corroboran el supuesto efecto salutífero atribuido al yogur fresco y a las bacterias vivas presentes en el mismo.

Bibliografía

- Amores R, Calvo A, Maestre JR, Martínez-Hernández D. Probióticos. Rev Esp Quimioter. 2004;17:131-9.
- Macfarlane GT, Cummings HJ. Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? BMJ. 1999;318:999-1003.
- Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt. Am J Clin Nutr. 2000;71:861-72.
- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol. 2006;100:1171-85.
- Guidelines for the evaluation of probiotics in Food. London, Ontario, Canada. April, 30 and May 1; 2002.
- Eypasch E, Williams JI, Wood Dauphinee S, Ure BM, Neugebauer C, Troidl H. Gastrointestinal quality of life index: development, validation, and application of a new instrument. Br J Surg. 1986;82:216-22.
- Hartemink R, Rombouts FM. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. J Microbiol Methods. 1999;36:181-92.
- Terzaghi BE, Sandine WE. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl Microbiol. 1975;29:807-13.
- Hartemink R, Domenech VR, Rombouts FM. LAMVAB. A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. J Microbiol Meth. 1997;29:77-84.
- Holliman RE, Bone GP. Vancomycin resistance of clinical isolates of lactobacilli. J Infect. 1988;16:279-83.
- Norme FIL 146A:1998-Yaourt-Identification des microorganismes caractéristiques. (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*).
- Lick S, Drescher K, Heller KJ. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Gottingen minipigs. Appl Environ Microbiol. 2001;67:4137-43.
- Casas-Sánchez JM. Inferencia estadística para economía y administración de empresas. Madrid: Centro de Estudio Ramón Areces, S. A., 1996.
- Martín-Pliego J, Ruiz-Maya L. Fundamentos de inferencia estadística. Madrid: Paraninfo; 2005.
- Senok AC, Ismael AY, Botta GA. Probiotics: facts and myths. Clin Microbiol Infect. 2005;11:958-66.
- Del Campo R, Bravo D, Cantón R, Ruiz-Garbajosa P, García-Albiach R, Montesi-Libois A, et al. Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. Appl Environ Microbiol. 2005;71:547-9.
- Yuste FJ, Vázquez C, Alfredo Köning M, Bootello A, Coll J, González P, et al. Efecto de dos presentaciones comerciales de yogur sobre la salud de algunos colectivos de población sana. Medicina Preventiva. 2003;11:13-9.
- Sullivan A, Nord CE. Probiotics and gastrointestinal diseases. J Intern Med. 2005;257:78-92.
- Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R, et al. Management and treatment of lactose malabsorption. World J Gastroenterol. 2006;12:187-91.
- Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. J Nutr. 2000;130:403S-9S.