



# REVISTA DE GASTROENTEROLOGÍA DE MÉXICO

[www.elsevier.es/rgmx](http://www.elsevier.es/rgmx)



## ARTÍCULO ORIGINAL

# La microbiota bacteriana fecal en pacientes estreñidos previa y posterior a ocho semanas de administración diaria de *Bifidobacterium infantis* 35624



M. Amieva-Balmori<sup>a</sup>, J.F. García-Mazcorro<sup>a</sup>, A. Martínez-Conejo<sup>a</sup>,  
G.A. Hernández-Ramírez<sup>a</sup>, K.R. García-Zermeño<sup>a</sup>, O. Rodríguez-Aguilera<sup>a</sup>,  
M. Aja-Cadena<sup>a</sup>, M. Cortes-Barradas<sup>a</sup>, E.M.M. Quigley<sup>b</sup> y J.M. Remes-Troche<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Fisiología Digestiva y Motilidad Gastrointestinal, Instituto de Investigaciones Médico-Biológicas, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

<sup>b</sup> Lynda K and David M Underwood Center for Digestive Disorders, Houston Methodist Hospital and Weill Cornell Medical College, Houston, Tejas, Estados Unidos

Recibido el 17 de enero de 2022; aceptado el 4 de abril de 2022

Disponible en Internet el 21 de junio de 2022

### PALABRAS CLAVE

Estreñimiento;  
Probiótico;  
*Bifidobacterium infantis* 35624

### Resumen

**Introducción y objetivo:** En los últimos años, los probióticos se han utilizado en trastornos gastrointestinales funcionales, incluido el estreñimiento crónico (EC). El efecto de la cepa 35624 de *Bifidobacterium infantis* sobre la microbiota intestinal de pacientes con EC no se ha estudiado previamente.

Nuestro objetivo fue analizar la microbiota fecal de pacientes estreñidos antes y después de consumir un probiótico de una sola cepa (*B. infantis* cepa 35624).

**Material y métodos:** Usamos secuenciación de alto rendimiento del gen 16S ARNr para analizar la microbiota fecal de pacientes mujeres (n = 13) con EC. Se indicó a los pacientes que consumieran una cápsula de Alflorex® (con  $1 \times 10^9$  UFC/g de *B. infantis* 35624) al día durante 8 semanas. Se obtuvieron muestras fecales al inicio del estudio y al final de la administración de probióticos.

**Resultados:** Las métricas de diversidad alfa no fueron diferentes entre la línea de base y la final. El productor de butirato *Oscillospira* fue el taxón más fuertemente correlacionado con las variantes de secuencia de amplicones ( $R^2 = 0.55$ ,  $p < 0.0001$ ). Excepto por unos pocos taxones bacterianos, no hubo diferencias significativas en la abundancia relativa entre la línea de base y la final. Las medidas de diversidad beta también mostraron evidencia limitada de diferencias entre los dos periodos de tiempo.

\* Autor para correspondencia. Laboratorio de Fisiología Digestiva y Motilidad Gastrointestinal, Instituto de Investigaciones Médico-Biológicas, C. Agustín de Iturbide SN, Colonia Flores Magón. Universidad Veracruzana, Veracruz 91400, México. Teléfono: +52-229-931-8011. Correo electrónico: [jose.remes.troche@gmail.com](mailto:jose.remes.troche@gmail.com) (J.M. Remes-Troche).

<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2022.04.005>

0375-0906/© 2022 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Conclusiones:** Los resultados sugieren que la microbiota bacteriana fecal permanece estable en mujeres estreñidas que consumen un probiótico de una sola cepa. Estos hallazgos pueden ser útiles para comprender mejor el funcionamiento de los probióticos en pacientes con trastornos digestivos.

© 2022 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## KEYWORDS

Constipation;  
Probiotic;  
*Bifidobacterium infantis* 35624

## Fecal bacterial microbiota in constipated patients before and after eight weeks of daily *Bifidobacterium infantis* 35624 administration

### Abstract

**Introduction and aim:** In recent years, probiotics have been used in functional gastrointestinal disorders, including chronic constipation (CC). The effect of *Bifidobacterium infantis* strain 35624 on the gut microbiota of CC patients has not been previously studied.

Our aim was to analyze the fecal microbiota of constipated patients, before and after consuming a single-strain probiotic (*B. infantis* strain 35624).

**Material and methods:** We used 16S rRNA gene high-throughput sequencing to analyze the fecal microbiota of female patients (n = 13) with CC. Patients were instructed to ingest one capsule of Alflorex® (containing  $1 \times 10^9$  CFUs/g *B. infantis* strain 35624) daily for eight weeks. Fecal samples were obtained at the baseline and end (final) of probiotic administration.

**Results:** Alpha diversity metrics did not differ between the baseline and final periods. The butyrate producer, *Oscillospira*, was the taxon most strongly correlated with amplicon sequence variants ( $R^2 = 0.55$ ,  $p < 0.0001$ ). Except for a few bacterial taxa, there were no significant differences in relative abundance between the baseline and final periods. Beta-diversity measures also showed limited evidence for the differences between the two time periods.

**Conclusions:** The results suggest that the fecal bacterial microbiota remains stable in constipated women consuming a single-strain probiotic. Those findings may be helpful in better understanding probiotic functioning in patients with digestive disorders.

© 2022 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción y objetivos

El tubo digestivo humano es hogar de millones de microorganismos altamente competitivos (conocidos como la microbiota intestinal) que viven en íntima simbiosis con el anfitrión<sup>1</sup>. La microbiota intestinal juega un papel vital en la regulación y mantenimiento de la salud en el tubo digestivo y en órganos extraintestinales<sup>2</sup>. Es importante investigar las características de dicha simbiosis para comprender mejor la salud y el bienestar humanos.

Los primeros estudios que investigaron a los microbios en intestinos y en otros órganos mostraron que existía una gran variación entre individuos sanos, pero que permanecían relativamente estables durante periodos de tiempo cortos<sup>3</sup>. Sin embargo, otros estudios sugieren una variabilidad temporal pronunciada en el microbioma humano sano, incluso de un día a otro<sup>4</sup>. Esta variación es particularmente relevante en contextos clínicos, por ejemplo, en pacientes con trastornos gastrointestinales o en quienes reciben antibióticos<sup>5,6</sup>.

El estreñimiento crónico (EC) es un trastorno intestinal de alta prevalencia que se caracteriza por heces duras y/o una sensación de evacuación incompleta<sup>7</sup>. Se recomiendan diferentes tratamientos para aliviar dichos síntomas, incluido el uso de probióticos (es decir, microorganismos

vivos benéficos). Algunos mecanismos por medio de los que los probióticos pueden mejorar la salud en pacientes estreñidos incluyen la alteración de la microbiota intestinal y la regulación del medio ambiente intestinal, como la reducción del pH luminal. Varios ensayos aleatorizados han sido realizados con el uso de probióticos (principalmente con cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) en EC<sup>7</sup>, con éxito clínico variado. Un metaanálisis reciente de ensayos aleatorizados concluyó que el consumo de probióticos puede reducir el tiempo de tránsito intestinal, incrementar la frecuencia de heces y mejorar la consistencia de las heces en adultos con estreñimiento funcional<sup>8</sup>. Sin embargo, los autores también han reportado una amplia variación de desempeño entre los ensayos. La razón para dicha variación podría involucrar diferencias entre las poblaciones de pacientes, al igual que en el desempeño de los probióticos<sup>9</sup>.

El uso de la *Bifidobacterium* como probiótico está bien documentado en pacientes con trastornos gastrointestinales funcionales, pero también ha mostrado resultados diversos. Dimidi et al.<sup>10</sup> reportaron que una suplementación por 4 semanas de  $1.5 \times 10^{10}$  de unidades formadoras de colonias (UFC) de una cepa de *B. lactis* no fue efectiva para el manejo del EC, en un ensayo aleatorizado con 75 participantes. En ese estudio, los autores analizaron la microbiota intestinal,

pero solo utilizaron PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR), lo cual es útil para monitorear taxones individuales, pero no es capaz de caracterizar completamente a comunidades microbianas. Otro estudio investigó el efecto de la suplementación de 8 semanas de  $1 \times 10^9$  UFC de cepa 35624 de *B. infantis* en la microbiota fecal de pacientes con síndrome de intestino irritable (SII)<sup>11</sup>. El estudio mostró mayor excreción del probiótico administrado durante el tratamiento, desapareciendo poco después de la suspensión de la administración. Sin embargo, los autores también utilizaron qPCR solo para algunos taxones seleccionados, y concluyeron de manera correcta que dada la complejidad del espectro de la microbiota intestinal, los cambios o diferencias en los taxones seleccionados no fueron indicadores útiles de la función probiótica. El objetivo del presente estudio fue analizar la microbiota fecal de pacientes estreñidos, previo y posterior al consumo del probiótico de una sola cepa, *B. infantis* 35624.

## Materiales y métodos

### Reclutamiento de pacientes

Reclutamos a pacientes con EC del puerto de Veracruz, México, para el presente ensayo abierto. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: > 18 años de edad, autorreporte de frecuencia de heces de 3 movimientos intestinales por semana o menos, autorreporte de consistencia de heces de tipo 1-4 en la Escala de Heces de Bristol, y cumplir con los criterios de diagnóstico de Roma IV para estreñimiento funcional<sup>12,13</sup>.

A los pacientes que estaban recibiendo tratamiento farmacológico se les solicitó que interrumpieran el tratamiento por al menos una semana, para poder ser evaluados. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: trastornos gastrointestinales y otros que pudieran afectar la motilidad intestinal, cirugía abdominal previa, terapia activa con medicamentos conocidos por afectar la motilidad intestinal, causas secundarias de estreñimiento, defecación disinérgica, inercia colónica, problemas anorrectales, intolerancia a la lactosa, alergia a leche de vaca y soya, consumo regular de probióticos, prebióticos, suplementos de fibra y laxantes, uso de antibióticos hasta 4 semanas antes del inicio del ensayo, abuso activo de alcohol, drogas o medicamentos. La prevalencia del estreñimiento es casi dos veces más común en mujeres, por lo que decidimos incluir solo a mujeres, para evitar factores potencialmente confusos.

Se les indicó a los pacientes ingerir una cápsula diaria de Alflorex®, con  $1 \times 10^9$  de UFC/g de *B. infantis* cepa 35624, por un periodo consecutivo de 8 semanas, manteniendo sus hábitos alimenticios regulares. La *B. infantis* 35624 también es conocida como *B. longum* subespecie *infantis* (<https://www.precisionbiotics.com/es/>), pero además, ha sido catalogada (de manera más precisa) como *B. longum* subespecie *longum* (el error en asignación original fue resultado del uso único de la clasificación taxonómica basada en 16S ARNr parcial)<sup>14</sup>. El probiótico fue donado por la compañía Menarini México (Ciudad de México, México), la cual solo proporcionó el fármaco y no intervino en el diseño del estudio o en el análisis de los resultados.

Se les informó a los pacientes que estaban siendo invitado a participar en un estudio cuyo objetivo era investigar el efecto de un probiótico sobre sus síntomas y la composición de la microbiota intestinal, sin prometer de manera explícita un efecto benéfico. Considerando la cantidad de producto en cada cápsula (247 mg) y la concentración del probiótico ( $1 \times 10^9$  UFC/g), cada cápsula proporcionó  $2.47 \times 10^8$  UFC. Los pacientes respondieron un cuestionario respecto a parámetros clínicos como consistencia de heces, percepción de intensidad de sensación de distensión y días sin síntomas, en línea de base y al final de la administración de los probióticos. La consistencia de heces fue evaluada por los pacientes utilizando la Escala de Heces de Bristol<sup>15</sup>, en la cual el 1 representa trozos duros y el 7 representa heces aguadas. La percepción de la intensidad de sensación de distensión fue expresada utilizando una escala visual análoga de 0 a 100. Se evaluó la mejoría global, utilizando la pregunta general de síntomas: «En los últimos 7 días, ¿consideras que tuviste un alivio adecuado de tus síntomas de estreñimiento?» Se le dio instrucciones a los pacientes de usar 17 g diarios de polietilenglicol, de forma regular de ser necesario, si se requería terapia de rescate.

### Recolección de muestras fecales y extracción de ADN

Las muestras fecales fueron recolectadas por los pacientes en sus casas, en línea de base y al final de la administración de probióticos. Las muestras fueron colocadas en hieleras con paquetes de gel congelados y llevadas a nuestro laboratorio en el lapso de una hora, donde fueron colocadas a  $-20^\circ\text{C}$ , hasta ser procesadas. Debido a que la homogeneización de las heces evita una evaluación precisa de las comunidades microbianas<sup>16</sup>, descongelamos las muestras y obtuvimos las alícuotas para el análisis, principalmente de la parte media del material fecal disponible de cada muestra<sup>17</sup>. El ADN genómico total fue obtenido y purificado de una alícuota (100 mg) de cada muestra fecal, utilizando centrifugación para la disrupción celular, en conjunto con un kit comercial de extracción de ADN (Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Se procesaron dos alícuotas separadas de la muestra de línea de base del último paciente (ID de muestra: S19) para evaluar la replicabilidad del procedimiento. Las muestras de ADN ( $n = 27$ , 26 de 13 pacientes más un duplicado de S19) fueron ajustadas a  $150 \text{ ng}/\mu\text{l}$  y enviadas a Molecular Research LP (Shallowater, Tejas, EE.UU.). Se realizó una PCR para amplificar una región semiconservada del gen 16s ARNr utilizando los cebadores 515F (GTGY-CAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT). La secuenciación de alto rendimiento de ADN de los amplicones de PCR fue realizada en un instrumento MiSeq (Illumina, San Diego, California, EE.UU.), de la manera descrita en otra instancia<sup>18</sup>. A menos que se declare de otra manera, solo los resultados de los 13 pares de muestras ( $n = 26$ ), usando la primera réplica S19, se muestran y discuten.

### Bioinformática y estadísticas

Utilizamos diferentes herramientas en QIIME2<sup>19</sup> v.2020.2 para analizar los datos de secuenciación, usando los

**Tabla 1** Características de línea de base de las 13 pacientes que completaron el protocolo

ID de sujeto	Rango de edad	Índice de masa corporal	Porcentaje autopercebido de intensidad de distensión (línea de base/final)
S01 <sup>a</sup>	50-60	27.3	50/0
S02 <sup>a</sup>	50-60	25.5	100/25
S06 <sup>a</sup>	Más de 60	28.2	75/0
S07 <sup>a</sup>	Más de 60	25.2	75/50
S08 <sup>a</sup>	30-40	33.7	100/90
S09 <sup>a</sup>	30-40	25.9	75/50
S10	50-60	25.5	25/50
S11	40-50	25.5	65/75
S14	40-50	27.1	50/NR
S15	50-60	20.0	25/25
S16 <sup>a</sup>	50-60	25.2	75/25
S18 <sup>a</sup>	50-60	37.6	50/10
S19	40-50	29.7	100/100

NR: no registrado y en consecuencia no incluido en la comparación estadística.

<sup>a</sup> Pacientes que experimentaron una menor intensidad de distensión (8 de 13).

parámetros por defecto, a menos que se especifique de otra manera. El laboratorio de secuenciación proporcionó asignación taxonómica libre, utilizando una base de datos curada, pero los resultados solo se mencionan en el contexto de nuestra asignación taxonómica en QIIME2, usando la base de datos *Greengenes* 13.8. El método filogenético UniFrac<sup>20</sup> fue utilizado para comparar comunidades microbianas, con distancias ponderadas y sin ponderar<sup>21</sup>.

Es práctica común analizar los diferentes taxones bacterianos por separado. Sin embargo, este abordaje no es necesariamente el mejor para comprender las fluctuaciones microbianas en ecosistemas complejos, donde existen diferentes tipos y cantidades de microbios. Por lo tanto, usamos el SAS<sup>®</sup> University Edition (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EE.UU.) para realizar el análisis multivariado para diferentes taxones al mismo tiempo. En los casos necesarios se usó la prueba de Wilcoxon de rango con signo para comparar variables (p.ej., abundancia relativa de bacterias) entre ambos periodos de tiempo (de línea de base y final). También realizamos análisis de correlación utilizando los valores de línea base y final para los taxones individuales, al igual que entre las diferentes combinaciones de los puntos de tiempo y taxones (p.ej., valores de línea base para taxón A vs. valores finales para taxón B), para investigar cualquier relación que pudiera impactar la variabilidad de microbios a lo largo del tiempo. Las gráficas fueron generadas utilizando SAS y PAST v.3.25.

### Consideraciones éticas

Se requirió de un consentimiento informado por escrito para la participación en el presente estudio. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con el código de ética de la OMS (Declaración de Helsinki) y aprobados por el comité de ética local del Instituto para la Investigación Biológica Médica (Universidad Veracruzana, 2018-013R). Los autores declaran que el presente artículo no contiene información que permita identificar a los pacientes.

## Resultados

### Pacientes

Se incluyó a 19 pacientes mujeres, pero solamente 13 pudieron completar el protocolo (tabla 1). Previo al estudio, 3 pacientes no estaban tomando medicamento o suplemento para tratar su estreñimiento, 6 tomaban suplementos de fibra y 11 usaban laxantes (6 polietilenglicol, 3 lactulosa).

De las 13 pacientes reclutadas, 6 (46%) reportaron una mejoría en la Escala de Heces de Bristol de más del 50%, en comparación con la línea de base, y 10 (77%) de las 13 participantes reportaron una mejoría de síntomas en general. La intensidad de la sensación de distensión fue significativamente más baja después de la administración de probióticos (67% vs. 42%,  $p=0.02$ ) (tabla 2) y el porcentaje de tiempo (en días) sin síntomas también fue más bajo posteriormente al probiótico (49% vs. 39%), pero la diferencia no fue significativa ( $p=0.48$ ). Solo 2 pacientes reportaron haber tomado el medicamento de rescate, de manera intermitente. Sin embargo, es probable que estos resultados tengan relevancia clínica limitada debido a un posible efecto placebo y a la falta de un grupo control.

### Resultados de secuenciación

Después de la demultiplexación, obtuvimos 2,069,625 secuencias 16S de 27 muestras fecales (media: 76,652 secuencias/muestra, mín.: 25,964, máx.: 170,946). La utilización de DADA2<sup>22</sup> para el filtrado de calidad resultó en 1,868,215 secuencias (~90% del original), utilizando 280 nucleótidos como longitud de truncado.

### Diversidad alfa

Usando una profundidad de rarefacción de 24,000 secuencias/muestra, DADA2 reveló la presencia de 1,123 variantes de secuencia de amplicones (VSA) que pertenecieron a 120

**Tabla 2** Proporciones relativas promedio de las secuencias del gen 16S ARNr para algunos de los taxones más abundantes

Taxón	Línea de base	Final	Valor de p	Pacientes que experimentaron aumento/disminución
<b>Firmicutes</b>	66.8%	54.2%	0.28	6 (16.4%)/7 (35.6%)*
<i>Blautia</i>	14.0%	7.2%	0.10	5 (5.8%)/8 (14.7%)
<i>Clostridium</i>	8.4%	8.9%	0.86	6 (10.8%)/7 (8.1%)
<i>Eubacterium</i>	6.9%	6.3%	0.51	4 (4.4%)/9 (2.8%)
<i>Ruminococcus</i>	6.6%	5.7%	0.46	4 (7.6%)/9 (4.7%)
<i>Turicibacter</i>	9.1%	3.3%	0.46	7 (4.2%)/6 (17.4%)
<b>Bacteroidetes</b>	12.2%	18.3%	0.38	8 (17.6%)/5 (12.3%)
<i>Bacteroides</i>	3.5%	6.1%	0.65	9 (6.9%)/4 (6.9%)
<i>Prevotella</i>	3.9%	5.2%	0.75	7 (5.9%)/6 (4.3%)
<b>Cyanobacteria</b>	10.9%	9.9%	0.92	7 (8.6%)/6 (11.9%)
<i>Halospirulina</i>	10.8%	9.9%	0.92	7 (8.6%)/6 (11.9%)
<b>Proteobacteria</b>	3.2%	10.1%	0.01	11 (8.5%)/2 (2.5%)
Alfaproteobacteria	0.5%	2.1%	0.70	7 (3.7%)/6 (0.8%)
Betaproteobacteria	0.9%	0.4%	0.70	8 (0.6%)/5 (2.3%)
Deltaproteobacteria	0.01%	1.3%	0.02	10 (1.6%)/3 (0.005%)
Epsilonbacteria	0.007%	0.6%	0.03	9 (0.8%)/4 (0.003%)
Gammaproteobacteria	1.8%	5.7%	0.03	10 (5.5%)/3 (1.6%)
<i>Stenotrophomonas</i>	1.4%	4.2%	0.60	7 (6.3%)/6 (1.1%)
<i>Kopriimonas</i>	0.2%	1.9%	0.92	6 (3.9%)/7 (0.3%)
<i>Pseudomonas</i>	0.02%	0.7%	0.02	10 (0.8%)/3 (0.02%)
<b>Actinobacteria</b>	6.1%	3.9%	0.42	6 (2.1%)/7 (5.8%)
<i>Bifidobacterium</i>	4.2%	2.7%	0.42	5 (1.3%)/8 (3.3%)
<b>Verrucomicrobia</b>	0.8%	3.4%	0.17	8 (4.7%)/5 (0.5%)
<i>Akkermansia</i>	0.7%	3.4%	0.10	8 (4.7%)/5 (0.5%)

Los taxones están organizados por filo (destacados en negrita para auxiliar la visualización). Los valores de p provienen de la prueba de Wilcoxon.

\* Esto puede ser leído como «6 pacientes experimentaron un incremento de 16.4% en Firmicutes, en promedio, mientras que 7 pacientes experimentaron una disminución de 35.6% en Firmicutes, en promedio». Lo mismo aplica para todos los resultados dentro de esta columna.

géneros de 16 filos. No existieron diferencias significativas en el número de VSA, valores de diversidad Shannon, valores de uniformidad de Pielou y los valores de diversidad filogenética de Faith (fig. 1). Con la excepción de los valores de diversidad filogenética de Faith, existió una disimilitud notable en la dispersión de las muestras, entre la línea de base y los periodos finales (fig. 1).

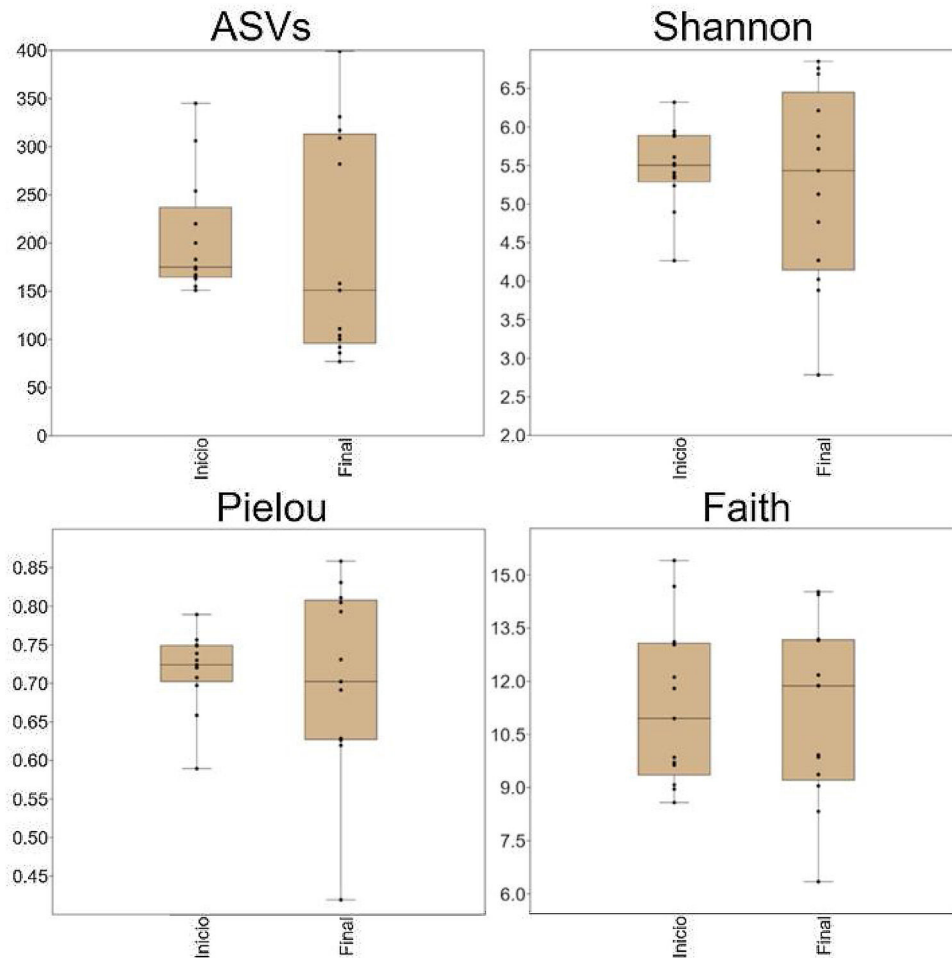
### Taxonomía

Un total de 99.3% de las lecturas del gen 16S podrían ser clasificadas en un filo dado, pero solo el 63% fueron asignadas a un género. Este porcentaje es común<sup>23</sup>, pero la mayoría de los artículos de investigación prefiere no declarar los porcentajes de lecturas asignados a los diferentes niveles taxonómicos. Siete filos sumaron el ~99% de todas las lecturas (Firmicutes: 55.8%, Bacteroidetes: 15.0%, Cyanobacteria: 10.2%, Tenericutes: 5.4%, Proteobacteria: 5.3%, Actinobacteria: 4.9% y Verrucomicrobia: 2.0%). Estos resultados concuerdan parcialmente con los resultados proporcionados por el laboratorio de secuenciación que utiliza una base de datos diferente para las asignaciones taxonómicas (Firmicutes: 60.6%, Bacteroidetes: 15.5%, Cyanobacteria: 10.3%, Proteobacteria: 6.5%, Actinobacteria: 4.9% y Verrucomicrobia: 2.0%), con la excepción de Tenericutes, que solo sumó el 0.003% de todas las lecturas. Con

pocas excepciones, la variación en abundancia relativa de taxones entre dos réplicas de la línea de base de la muestra S19 fue menor en comparación con la variación entre la línea de base y los valores finales de todos los pares de muestras.

La abundancia relativa de cada filo reveló una variación interindividual alta, al igual que una amplia diferencia en la variación a lo largo del tiempo para cada sujeto (fig. 2), como se muestra en otra instancia. Por ejemplo, 7 de las 13 pacientes (54%) experimentaron una disminución en la abundancia relativa de Firmicutes de 37% en promedio, mientras que 6 de las 13 pacientes (46%) mostraron un incremento en el taxón de 16%, en promedio (tabla 2). En otras palabras, el cambio en Firmicutes a lo largo del tiempo sucedió en una proporción similar de pacientes (54% vs. 46%), pero el cambio fue más pronunciado (disminución de 37% vs. aumento de 16%) en los pacientes que experimentaron una disminución en dicho taxón. Independientemente de esto, la diferencia en Firmicutes entre los dos periodos de tiempo no llegó a la significación estadística (p=0.28). En el caso de Bacteroidetes, 5 de las 14 pacientes (38%) mostraron una disminución de 12% en el taxón, en promedio, mientras que 8 de las 13 pacientes (62%) mostraron un incremento de 18%, en promedio (tabla 2). La diferencia en Bacteroidetes entre los dos puntos temporales no llegó tampoco a la significación estadística (p=0.38) (tabla 2). Dos pacientes mostraron una pequeña disminución en Proteobacteria (de 7.4% a 2.6%, y de 1.97% a 1.94%, respectivamente) posteriormente a la





**Figura 1** Diagramas de caja con jitter que muestran métricas de diversidad alfa. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre inicio y final, pero los valores de la mayoría de las métricas mostraron una mayor variación después del probiótico. Los diagramas se construyeron en PAST v.3.25. ASVs: variantes de secuencia de amplicón.

administración del probiótico, mientras que otras 11 pacientes mostraron un aumento promedio de 8.5% en el taxón (fig. 2). La diferencia en Proteobacteria entre los periodos de línea de base (3.2%) y final (10.1%) fue estadísticamente significativa ( $p=0.01$ ), aunque fue principalmente causada por dos participantes (fig. 2) y no estuvo claramente asociada con ningún taxón en particular (tabla 2).

### ***Bifidobacterium***

La abundancia relativa del género *Bifidobacterium* fue relativamente alta (el décimo género más abundante) en nuestro análisis en QIIME2 (promedio 3.4%, mín.: 0.07%, máx.: 31.5%) y en los resultados del laboratorio de secuenciación (promedio 3.3%, mín.: 0.05%, máx.: 30.8%).

Observamos 9 VSA que estuvieron relacionadas con *Bifidobacterium*, pero la mayoría fueron bajas en abundancia y mostraron baja prevalencia (tabla 3).

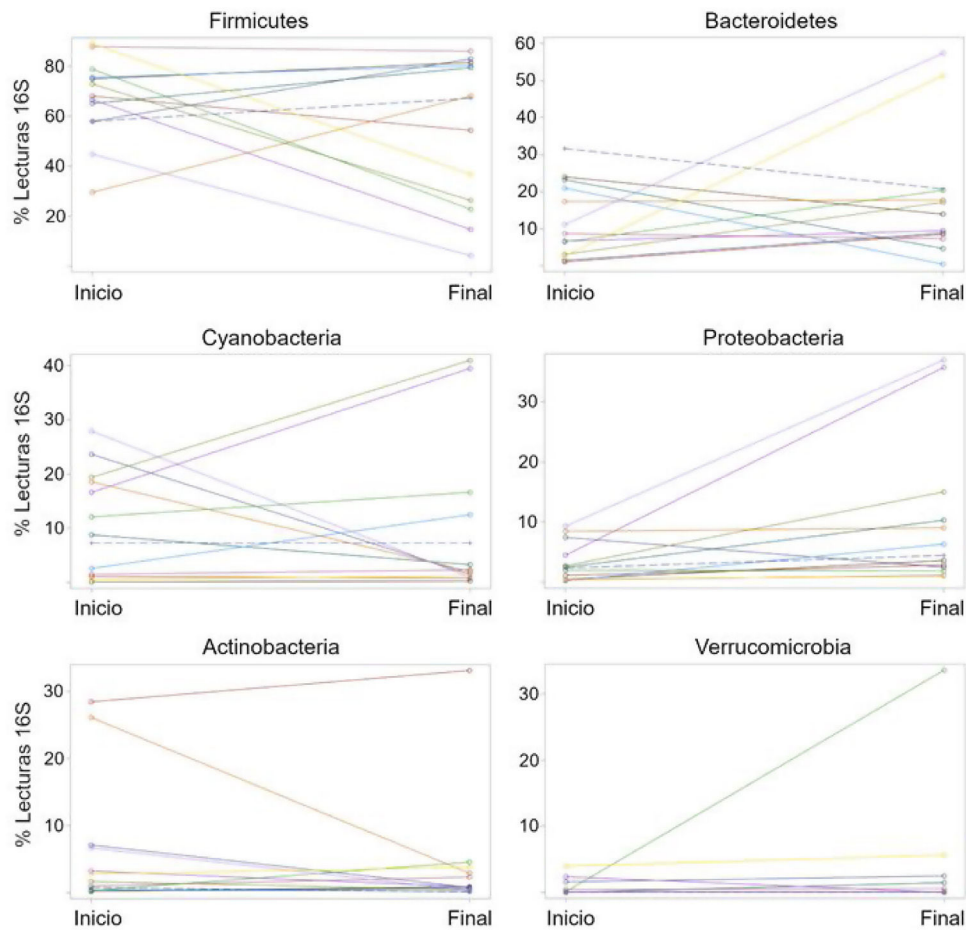
### **Análisis multivariado**

Utilizamos la abundancia relativa de las lecturas del 16S de 6 de los filos más abundantes, en diferentes combinaciones,

para encontrar el valor más bajo de la lambda de Wilks. En consecuencia, la combinación de 3 filos (Firmicutes, Proteobacteria y Verrucomicrobia) fue asociada con el valor más bajo (tabla suplementaria S1). Esto es interesante porque implica que la combinación de esos 3 taxones puede ser más precisa para analizar las diferencias entre los dos puntos temporales.

### **Análisis de correlación**

La abundancia relativa de Actinobacteria ( $R^2 = 0.5$ ,  $p = 0.007$ ) presentó la correlación más fuerte entre los periodos de línea de base y final, pero esto fue causado por los datos de un paciente (tabla suplementaria S2). El único otro filo que mostró una tendencia a la significación fue la Proteobacteria ( $R^2 = 0.3$ ,  $p = 0.046$ , tabla suplementaria S2). También examinamos las correlaciones entre los diferentes filos en los diferentes puntos temporales (tabla suplementaria S3). De manera interesante, existió una correlación inversa entre los valores de línea de base de Firmicutes y Proteobacteria ( $R^2 = 0.73$ ,  $p = 0.0002$ ), como se mostró recientemente en un estudio sobre la microbiota en leche<sup>24</sup>. Otro hallazgo interesante fue la correlación positiva entre la línea de base de Cyanobacteria y Proteobacteria



**Figura 2** Porcentajes de lecturas del gen 16S rRNA a nivel de filo para los 13 pacientes al inicio y al final de la administración del probiótico. El propósito de esta figura es ayudar a visualizar la alta variación interindividual (separación de puntos dentro de cada punto de tiempo), así como la gran diferencia en la variación a lo largo del tiempo (cambio en las lecturas de 16S del inicio al final) para cada sujeto. Las gráficas fueron construidas en SAS.

**Tabla 3** Abundancia relativa y prevalencia de las 9 VSA de *Bifidobacterium*

Taxonomía de VSA con similitud de porcentajes	Línea de base	Final	Valor de p
<i>B. adolescentis</i> (98.8%)	2.1% (13/13)	1.4% (13/13)	0.38
<i>B. adolescentis</i> (99.3%)	1.5% (13/13)	1.1% (13/13)	0.46
<i>B. longum</i> (100%)	0.6% (13/13)	0.2% (12/13)	0.08
<i>B. adolescentis</i> (99.2%)	0.07% (12/13)	0.05% (11/13)	0.81
<i>B. adolescentis</i> (99.2%)	0.01% (7/13)	0.008% (6/13)	NA
<i>B. breve</i> (69.6%)	0.0004% (2/13)	0.002% (1/13)	NA
<i>B. adolescentis</i> (95.7%)	0.0002% (2/13)	0.004% (1/13)	NA
<i>B. adolescentis</i> (94.5%)	0.0002% (2/13)	0.0002% (2/13)	NA
<i>B. breve</i> (69.6%)	0.003% (1/13)	0.003% (1/13)	NA

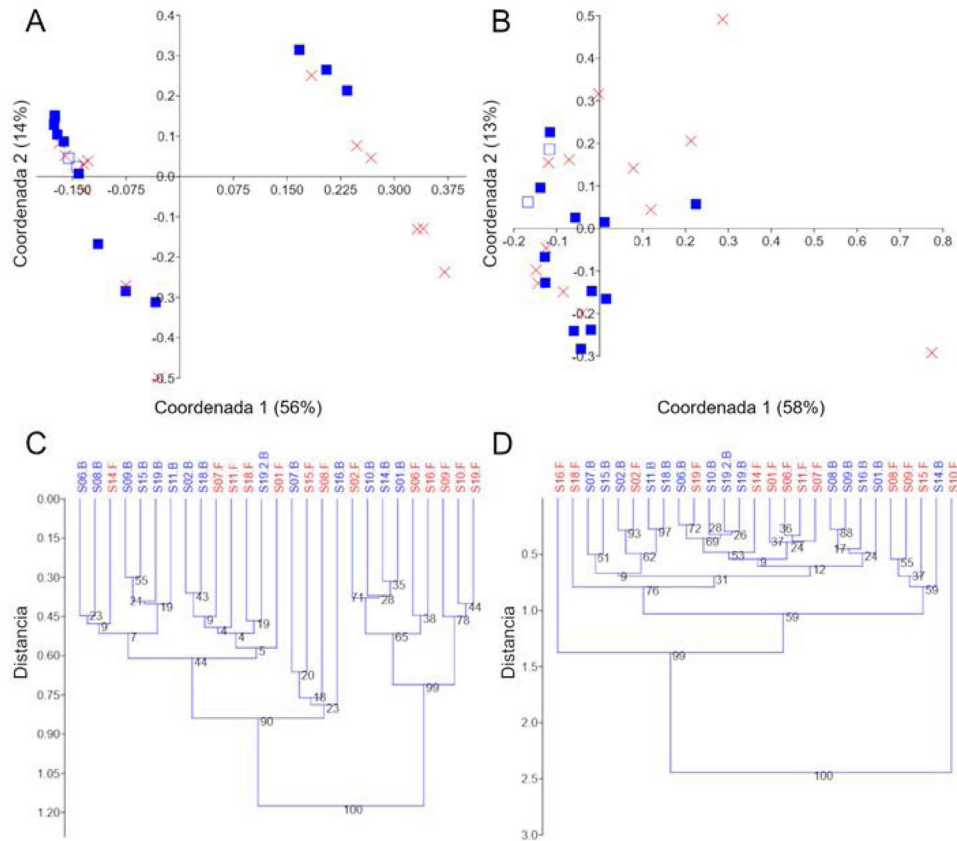
Los valores de p provienen de la prueba de Wilcoxon.

NA: la comparación no aplica; VSA: variantes de secuencia de amplicones.

( $R^2 = 0.82$ ,  $p = 2.4 \times 10^{-5}$ ). Las cianobacterias son frecuentemente consideradas contaminantes, pero Ley et al.<sup>25</sup> propusieron la interesante posibilidad de que las cianobacterias intestinales sean descendientes de cianobacterias no fotosintéticas ancestrales que se adaptaron a la vida dentro del tubo digestivo.

### Diversidad beta

La utilización de PCoA y agrupamiento UPGMA en distancias UniFrac no ponderadas sugirió poca variación en las dos réplicas del S19 y la presencia de dos grupos de muestras claros que se explicaron parcialmente por la administración



**Figura 3** Gráficos PCoA y árboles UPGMA utilizando distancias UniFrac no ponderadas y ponderadas. Gráficos PCoA usando distancias no ponderadas (A) y ponderadas (B), árboles UPGMA usando distancias no ponderadas (C) y ponderadas (D). En A y B, las muestras de línea de base están representadas por cuadrados azules llenos y las muestras finales por una X roja. La muestra que se procesó por duplicado (S19, línea de base) se muestra con un símbolo diferente (cuadrados azules vacíos) para una mejor visualización. Los árboles se construyeron utilizando 10,000 muestras de arranque. El índice de similitud Euclidiana se utilizó para todas las gráficas en PAST v. 3.25.

del probiótico (fig. 3A y C). Debido a la posible existencia de enterotipos (grupos de muestras identificables por la variación en la presencia de taxones específicos y sus niveles<sup>26</sup>), retiramos los diferentes taxones, uno por uno, para investigar si la ausencia de un taxón dado explicaría dicho agrupamiento. Sin embargo, no encontramos evidencia que sugiera que el agrupamiento fue debido a la presencia (o ausencia) de un taxón en particular. De manera interesante, los dos grupos de muestras desaparecieron al analizar los datos de grupos separados de taxones seleccionados (p.ej., Firmicutes, Proteobacteria y Verrucomicrobia), pero la significación de este hallazgo aún no es clara para nosotros. A diferencia de los resultados sobre las distancias UniFrac no ponderadas, el análisis de las distancias UniFrac ponderadas mostró una separación de réplicas de S19 más fuerte, pero no reveló un agrupamiento significativo de muestras (fig. 3B y D). Independientemente de cualquier agrupamiento visual, la prueba PERMANOVA no mostró diferencias significativas en las distancias UniFrac no ponderadas ( $p=0.12$ ) o ponderadas ( $p=0.81$ ).

### Relaciones entre los taxones y el número de VSA

El índice de masa corporal y la edad fueron las únicas variables continuas asociadas con los pacientes y no explicaron significativamente el número de VSA observado. Algunos de los taxones estuvieron relacionados con el número de VSA, en particular el productor de butirato, *Oscillospira* ( $R^2=0.55$ ,  $p<0.0001$ ), un miembro enigmático de Firmicutes (familia *Ruminococcaceae*) de la microbiota intestinal humana que ha sido demostrado que tiene una asociación positiva con delgadez y salud<sup>27</sup> (tabla suplementaria S4).

### Microbioma central

El concepto de microbioma central se refiere a las especies (p.ej., VSA) que están presentes en la mayoría de las muestras en un medio ambiente dado, por ejemplo, las heces humanas. Pocas unidades taxonómicas operacionales (UTO) fueron compartidas por el 50% de las muestras (122 de 1,123, o 10.9% de todas las VSA), de línea de base (153, 19.1%) o



del final (105, 12.3%), lo que implica que la mayoría de las VSA fueron singulares para cada individuo.

## Discusión

La microbiota intestinal es relevante en la patogénesis y manejo de trastornos gastrointestinales, incluido el estreñimiento<sup>28</sup>. En México, el EC tiene una prevalencia de entre 2.4% y 22.3%<sup>29</sup>, lo cual representa aproximadamente 3-27 millones de personas. Aunque algunos estudios han reportado resultados favorables para los probióticos en el estreñimiento, su eficacia clínica para aliviar los síntomas es aún controvertida, ya que existen diferencias en los abordajes metodológicos, como las poblaciones de estudio (niños, adultos, adultos mayores) y productos probióticos (probióticos de una sola especie o de múltiples especies). Además, solo pocos estudios han explorado el impacto de los probióticos sobre la composición y estabilidad de la microbiota intestinal en pacientes estreñidos. El presente estudio investigó la microbiota fecal de pacientes mujeres con EC, después de la administración de un probiótico comercial de una sola cepa.

Las heces de pacientes estreñidos a menudo parecen diferir respecto al contenido de agua, en comparación con las heces de individuos sanos, y el cambio físico en la consistencia de las heces puede en sí mismo tener un impacto en la composición y funcionamiento de la microbiota intestinal<sup>30</sup>. Sin embargo, la consistencia de las heces es difícil de contextualizar con la efectividad del probiótico debido a variaciones en el tamaño de las células y el volumen de la microbiota intestinal, lo cual es un tema que no se ha discutido adecuadamente en la literatura. Levin y Angert<sup>31</sup> reportaron que el volumen común de bacterias tiene un rango de 0.4 a 3  $\mu\text{m}^3$  (o 0.4 a 3 femtolitros o fl; 1 ml =  $1 \times 10^{12}$  fl). Considerando que 1 ml de heces húmedas pesa aproximadamente 1 g, entonces cada mg de heces húmedas equivale a  $1 \times 10^9$  fl. Si consideramos que las células bacterianas constituyen aproximadamente 150 mg de cada gramo de heces<sup>32</sup>, y consideramos los rangos de volumen mencionados antes, implica que cada gramo de heces húmedas en individuos sanos puede contener de  $5 \times 10^{10}$  (considerando un volumen de 3 fl por cada célula bacteriana) a  $3.8 \times 10^{11}$  (considerando un volumen de 0.4 fl) células bacterianas. En caso del 100% de supervivencia de todos los probióticos en estómago e intestino delgado, la microbiota intestinal colónica de cada paciente del presente estudio recibiría una dosis diaria de  $2.47 \times 10^8$  UFC, o aproximadamente 100 veces menos células bacterianas que en 1 g de heces. En caso de cambio de consistencia en heces (p.ej., utilizando la Escala de Heces de Bristol), es entonces plausible asumir que el número total de células bacterianas autóctonas por gramo de contenido cambiaría, lo cual podría afectar la bioquímica de la microbiota intestinal. En general, el estreñimiento es una condición clínica que puede afectar la densidad microbiana, y el cambio resultante podría tener otras implicaciones importantes sobre la salud. Este es un tema importante que no se ha explorado y amerita más investigaciones.

Además de las preocupaciones sobre la consistencia de heces discutidas anteriormente, existen otros aspectos desconocidos respecto al efecto de los probióticos *in vivo*, por ejemplo, la interacción con el microbioma comensal residente<sup>9</sup> y otras condiciones específicas que se encuentran cada día de consumo de probióticos. Por ejemplo, Vitali et al.<sup>33</sup> sugirieron que la colonización intestinal por bacterias probióticas podría ser más alta en sujetos que tienen menor concentración de esas bacterias, previamente a la ingesta de probióticos, mientras que otros han sugerido lo opuesto<sup>34</sup>. En el presente estudio, no encontramos relaciones significativas en la abundancia relativa microbiana entre los periodos de línea de base y final, aunque esto podría ser debido al largo periodo (clínicamente indicado) de tiempo de administración del probiótico. Sin embargo, la diferente distribución de los valores de uniformidad de Pielou y otras métricas de diversidad alfa, posterior a la administración de probiótico, es interesante porque otros estudios han mostrado una distribución similar de dichos valores, incluso en medios ambientes drásticamente diferentes, como los intestinos y la lengua (tutorial de QIIME2 «imágenes en movimiento» de los datos publicados por Caporaso et al.)<sup>4</sup>.

El término especies es evidentemente impreciso para clasificar a las bacterias en grupos, y se han realizado varios esfuerzos por llegar a un consenso sobre nombres y clasificaciones de bacterias<sup>35</sup>. Esta búsqueda de una identificación precisa de las especies, subespecies y cepas bacterianas es particularmente relevante con relación al etiquetado de productos comerciales que contienen probióticos, por ejemplo, miembros de las *Bifidobacterium*<sup>36,37</sup>. Esto es importante ya que los efectos benéficos de los probióticos son específicos a las cepas, por lo tanto, no todos los miembros de una misma especie comparten las mismas propiedades. *Bifidobacterium* es un taxón bacteriano que llamó la atención en las últimas décadas del siglo XX<sup>38</sup>. Varios estudios han utilizado diferentes especies y cepas de *Bifidobacterium* como probióticos<sup>39,40</sup>, pero los contenidos descritos en las etiquetas de productos comerciales frecuentemente son imprecisos respecto a los tipos y cantidades de microorganismos<sup>41</sup>. Para superar algunas de estas inconsistencias, decidimos usar un producto comercial que ha sido sometido a un riguroso control de calidad y que contiene una cepa bien estudiada de *Bifidobacterium*, que ha demostrado ejercer efectos inmunorreguladores<sup>42,43</sup>.

El mecanismo de acción de los probióticos en pacientes con enfermedades gastrointestinales es un fenómeno complejo de investigar. Varios ensayos aleatorizados, controlados con placebo, han demostrado mejoría en síntomas de SII, incluido el estreñimiento, después de la ingesta de *B. infantis* 35624 y otros probióticos, pero pocos estudios han explorado la estabilidad a lo largo del tiempo, o discutido los posibles modos de acción<sup>44,45</sup>. Falony et al.<sup>46</sup> mostraron una alimentación cruzada *in vitro* entre una cepa de *B. longum* y bacterias del colon productoras de butirato y conversoras de acetato, durante el crecimiento en oligofruktosa. Fukuda et al.<sup>47</sup> expandieron esos resultados y demostraron que algunas cepas de *Bifidobacterium* pueden

proteger contra infecciones enteropatógenas por medio de la producción de acetato, lo cual puede contribuir a la formación de butirato<sup>48</sup>. Este cambio en la bioquímica intestinal se relaciona finalmente con una modulación de la composición de la microbiota intestinal, lo cual puede ser evidenciado por cambios en las proporciones relativas de microorganismos fecales, posteriores a la suplementación de probióticos. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el consumo de *B. infantis* 35624 no está relacionado con cambios en las proporciones generales de bacterias, al menos en muestras fecales. El caso de la Proteobacteria es de particular interés porque ese taxón mostró una abundancia relativa significativamente diferente entre los periodos de línea de base y final. Aunque la Proteobacteria se asocia frecuentemente con efectos negativos sobre la salud, nosotros y otros autores hemos demostrado que algunos taxones dentro de la Proteobacteria podrían ser benéficos, como la *Pseudomonas*<sup>18</sup>. Estos resultados agregan información valiosa a la literatura sobre probióticos, en particular en el contexto de interacciones microbianas en los intestinos de pacientes estreñidos, y enfatiza que el beneficio potencial de los probióticos es más complejo que un simple cambio en las cantidades y proporciones de bacterias.

Las limitaciones de nuestro estudio incluyen la falta de un grupo placebo y la posibilidad de que algunos de los pacientes no hayan sido regulares con la ingesta del producto. Se registró la respuesta clínica autopercibida de la administración del probiótico, pero el hecho de que el efecto placebo sea notoriamente amplio, particularmente en ensayos abiertos que involucran a pacientes con trastornos intestinales funcionales, debe ser considerado. Adicionalmente, cada persona no solo lleva una dieta diferente, sino que también un patrón alimentario que obedece a preferencias personales (p.ej., comida casera vs. comida comercial) y otros factores (p. ej., compromisos laborales), y la adherencia al tratamiento no fue evaluada rigurosamente. Finalmente, en el presente ensayo utilizamos muestras fecales que no necesariamente reflejan cambios biológicamente significativos en la microbiota asociada a la mucosa, y solo utilizamos secuenciación de alto rendimiento para estudiar la microbiota. Otras técnicas moleculares, como la PCRc, podrían haber confirmado la falta de cambios significativos para taxones específicos.

## Conclusiones

El presente estudio mostró pequeñas diferencias en la microbiota fecal y varios parámetros de diversidad, previa y posteriormente a la administración de un probiótico de una sola cepa en pacientes estreñidas femeninas. Aunque se pueden extraer conclusiones limitadas de este estudio, los resultados contribuyen a la mejor comprensión del funcionamiento de los probióticos en pacientes estreñidos que consumen fórmulas de probióticos de una sola cepa.

## Financiación

No se recibió patrocinio de ningún tipo para llevar a cabo este artículo.

## Conflicto de intereses

J.M.R.-T. ha recibido honorarios como conferencista, viáticos, y participado en reuniones médicas de mesa directiva con Takeda México, Asofarma y Menarini. EMMQ ha recibido honorarios por consultoría de Novo-zymes, honorarios como conferencista de Biocodex y apoyo para investigación de 4D pharma. El resto de los autores declara no tener conflicto de intereses.

## Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.rgm.2022.04.005](https://doi.org/10.1016/j.rgm.2022.04.005).

## Referencias

1. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability. *Science*. 2015;350:663–6, [http://dx.doi.org/10.1126/science.aad2602](https://doi.org/10.1126/science.aad2602).
2. Clemente JC, Ursell LK, Wehner-Parfrey L, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148:1258–70, [http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035).
3. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009;326:1694–7, [http://dx.doi.org/10.1126/science.1177486](https://doi.org/10.1126/science.1177486).
4. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, et al. Moving picture of the human microbiome. *Genome Biol*. 2011;12:R50, [http://dx.doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50](https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50).
5. Galloway-Peña JR, Smith DP, Sahasrabhojane P, et al. Characterization of oral and gut microbiome temporal variability in hospitalized cancer patients. *Genome Med*. 2017;9:21, [http://dx.doi.org/10.1186/s13073-017-0409-1](https://doi.org/10.1186/s13073-017-0409-1).
6. Clooney AG, Eckenberger J, Laserna-Mendieta E, et al. Ranking microbiome variance in inflammatory bowel disease: a large longitudinal intercontinental study. *Gut*. 2021;70:499–510, [http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321106](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321106).
7. Zhao Y, Yu Y-B. *Intestinal microbiota and chronic constipation*. SpringerPlus. 2016;5:1130, [http://dx.doi.org/10.1186/s40064-016-2821-1](https://doi.org/10.1186/s40064-016-2821-1).
8. Zhang C, Jiang J, Tian F, et al. Meta-analysis of randomized controlled trials of the effects of probiotics on functional constipation in adults. *Clin Nutr*. 2020;39:2960–9, [http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2020.01.005](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.01.005).
9. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, et al. Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell*. 2018;174:1388–405, [http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041).
10. Dimidi E, Zdanaviciene A, Christodoulides S, et al. Randomised clinical trial: Bifidobacterium lactis NCC2818 probiotic vs placebo, and impact on gut transit time, symptoms, and gut microbiology in chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;49:251–64, [http://dx.doi.org/10.1111/apt.15073](https://doi.org/10.1111/apt.15073).
11. Charbonneau D, Gibb RD, Quigley EMM. Fecal excretion of *Bifidobacterium infantis* 35624 and changes in fecal microbiota after eight weeks of oral supplementation with encapsulated probiotic. *Gut Microbes*. 2013;4:201–11, [http://dx.doi.org/10.4161/gmic.24196](https://doi.org/10.4161/gmic.24196).
12. Lacy BE, Mearin F, Chang L, et al. Bowel disorders. *Gastroenterol*. 2016;150:1393–407, [http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.031](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.031).

13. Simren M, Palsson OS, Whitehead WE. Update on Rome IV criteria for colorectal disorders: implications for clinical practice. *Curr Gastroenterol Rep.* 2017;19:15, <http://dx.doi.org/10.1007/s11894-017-0554-0>.
14. Altmann F, Kosma P, O'Callaghan A, et al. Genome analysis and characterization of the exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 35624TM. *PLoS One.* 2016;11:e0162983, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0162983>.
15. Blake MR, Raker JM, Whelan K. Validity and reliability of the Bristol stool form scale in healthy adults and patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;44:693–703, <http://dx.doi.org/10.1111/apt.13746>.
16. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vanechoutte M, et al. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:147–61, <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20330>.
17. Allaway D, Haydock R, Lonsdale ZN, et al. Rapid reconstitution of the fecal microbiome after extended diet-induced changes indicate a stable gut microbiome in healthy adult dogs. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86:e562–620, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00562-20>.
18. García-Mazcorro JF, Rivera-Gutiérrez X, Cobos-Quevedo OJ, et al. First insights into the gut microbiota of Mexican patients with celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients.* 2018;10:1641, <http://dx.doi.org/10.3390/nu10111641>.
19. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnol.* 2019;37:852–7, <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
20. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8228–35, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>.
21. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, et al. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:1576–85, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01996-06>.
22. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13:581–3, <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
23. Winand R, Bogaerts B, Hoffman S, et al. Targeting the 16S rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: comparative evaluation of second (Illumina) and third (Oxford nanopore technologies) generation sequencing technologies. *Int J Mol Sci.* 2019;21:298, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21010298>.
24. Moossavi S, Sepehri S, Robertson B, et al. Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors. *Cell Host Microbe.* 2019;25:324–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.011>.
25. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:11070–5, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504978102>.
26. Arumugan M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473:174–80, <http://dx.doi.org/10.1038/nature09944>.
27. Konikoff T, Gophna U. Oscillospira: a central, enigmatic component of the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* 2016;24:523–4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.015>.
28. Quigley EMM. The enteric microbiota in the pathogenesis and management of constipation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25:119–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2011.01.003>.
29. Remes-Troche JM, Coss-Adame E, López-Colombo A, et al. The Mexican consensus on chronic constipation. *Rev Gastroenterol Mex.* 2018;83:168–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgm.2017.12.005>.
30. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science.* 2016;352:560–4, <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad3503>.
31. Levin PA, Angert ER. Small but mighty: cell size and Bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7:a019216, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a019216>.
32. Stephen AM, Cummings JH. The microbial contribution to human faecal mass. *J Med Microbiol.* 1980;13:45–56, <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-13-1-45>.
33. Vitali B, Ndagijimana M, Cruciani F, et al. Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. *BMC Microbiol.* 2009;10:4, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-4>.
34. Stecher B, Chaffron S, Kämpfli R, et al. Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal Bacteria. *PLoS Path.* 2010;6:e1000711, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000711>.
35. Cohan FM. What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:457–87, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160634>.
36. Lewis ZT, Shani G, Masarweh CF, et al. Validating bifidobacterial species and subspecies identify in commercial probiotic products. *Pediatr Res.* 2016;79:445–52.
37. Mills DA. Probiotic nomenclature matters redux: confusion on *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* taxonomy persists. *Curr Med Res Opin.* 2017;33:2097, <http://dx.doi.org/10.1080/03007995.2017.1359153>.
38. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125:1401–12, <http://dx.doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>.
39. Yuan F, Ni H, Asche CV, et al. Efficacy of *Bifidobacterium infantis* 35624 in patients with irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin.* 2017;33:1191–7, <http://dx.doi.org/10.1080/03007995.2017.1292230>.
40. Zhang J, Ma S, Wu S, et al. Effects of probiotic supplement in pregnant women with gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Diabetes Res.* 2019;2019:5364730, <http://dx.doi.org/10.1155/2019/5364730>.
41. Lin W-H, Hwang C-F, Chen L-W, et al. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.* 2006;23:74–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.013>.
42. Groeger D, O'Mahony L, Murphy EF, et al. *Bifidobacterium infantis* 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes.* 2013;4:325–39, <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.25487>.
43. Konieczna P, Akdis CA, Quigley EMM, et al. Portrait of an immunoregulatory *Bifidobacterium*. *Gut Microbes.* 2012;3:261–6, <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.20358>.
44. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology.* 2005;128:541–51, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.050>.
45. Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut.* 2010;59:325–32, <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.167270>.

46. Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, et al. Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:7835–41, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01296-06>.
47. Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 2011;469:543–9, <http://dx.doi.org/10.1038/nature09646>.
48. Duncan SH, Holtrop G, Lobley GE, et al. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr.* 2004;91:915–23, <http://dx.doi.org/10.1079/BJN20041150>.