

Contribución de la microbiota intestinal y del género «Bifidobacterium» a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales

Y. Sanz¹, M.C. Collado¹, J. Dalmau²

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). ²Unidad de Nutrición y Metabolopatías. Hospital Infantil «La Fe». Valencia

Resumen

La microbiota intestinal constituye un complejo ecosistema que desempeña una importante función en el estado de salud del ser humano. Como consecuencia de ello, se ha producido una rápida incorporación de cepas bacterianas con funciones beneficiosas definidas (probióticos) al mercado. El efecto protector de las bacterias probióticas frente a patógenos gastrointestinales y sus mecanismos de acción ha sido una de las áreas que ha despertado mayor interés. Las cepas del género *Bifidobacterium* son integrantes mayoritarios de la microbiota intestinal de los niños y uno de los principales grupos de probióticos. Este género se considera esencial para el mantenimiento del equilibrio intestinal. Ciertas bifidobacterias son capaces de ejercer *in vitro* efectos antagónicos frente a importantes patógenos gastrointestinales pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia* y *Candida*. Datos clínicos también permiten atribuir una función protectora a ciertas bifidobacterias probióticas frente a las diarreas infecciosas agudas y la diarrea asociada a antibióticos en niños. Existe un número cada vez mayor de estudios que indican que algunas bifidobacterias pueden contribuir a fortalecer las defensas todavía inmaduras en edades tempranas de la vida mediante diversos mecanismos (exclusión competitiva, inmunomodulación, síntesis de compuestos antimicrobianos, etc.). No obstante, será necesario realizar un mayor número de ensayos clínicos rigurosos con cepas probióticas bien definidas para poder establecer recomendaciones consensuadas sobre el consumo de productos probióticos con fines específicos para la población infantil.

Palabras clave

Probióticos, *Bifidobacterium*, niños, infecciones gastrointestinales

Ecología intestinal

La microbiota intestinal constituye un complejo ecosistema integrado por más de 400 especies bacterianas. La microbiota comienza a adquirirse después del nacimiento, y tanto la velocidad de colonización como el tipo de microorganismos tienen gran repercusión en el desarrollo del sistema inmune, la regu-

Abstract

Title: Contribution of the intestinal microbiota and the genus *Bifidobacterium* to the host defense mechanisms against gastrointestinal pathogens

The human intestinal microbiota constitutes a complex ecosystem that plays an important role in human health. This has led to a rapid incorporation of bacterial strains that exhibited specific beneficial properties (probiotics) into the market. The protective role of probiotic bacteria against gastrointestinal pathogens and the underlying mechanisms has received special attention. *Bifidobacterium* strains are predominant inhabitants of the intestinal tract of infants and one of the main sources of probiotic strains. This genus is considered to be essential for maintaining the balance of the intestinal ecosystem. *Bifidobacterium* strains exert *in vitro* antagonistic activity against important gastrointestinal pathogens belonging to the genera *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia* and *Candida*. Clinical evidences also support a protective role of some probiotic bifidobacteria in acute infectious diarrhea and antibiotic-associated diarrhea in children. There is an increasing body of evidence about the multiple mechanisms (competitive exclusion, immunomodulation, synthesis of antimicrobials, etc.) by which bifidobacteria could promote the immature infant defenses. Moreover, a large number of rigorous clinical trials on well-identified probiotic strains will be required to find general recommendations of probiotic-containing products for specific purposes in the infant population.

Keywords

Probiotics, *Bifidobacterium*, children, gastrointestinal infections

lación de la permeabilidad y el mantenimiento del equilibrio intestinal. Dicho proceso se considera determinante de la susceptibilidad a las infecciones microbianas y de la sensibilidad a los antígenos o alérgenos de la dieta, especialmente durante los primeros años de vida. Inicialmente, existe un predominio de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos (*Enterobacteriaceae* y *Lactobacillus*) que son desplazados posterior-

mente por bacterias anaerobias estrictas (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, etc.) hasta que se establece una flora prácticamente definitiva. La composición de la microbiota fecal depende, no obstante, de diversos factores y, entre ellos, especialmente del tipo de lactancia. La menor incidencia de infecciones gastrointestinales así como de otras enfermedades en niños alimentados con lactancia materna se ha relacionado con su influencia en la composición de la microbiota intestinal, dominada (hasta en un 91%) por el género *Bifidobacterium*. Por el contrario, el intestino de niños alimentados con fórmulas infantiles está colonizado por una microbiota más heterogénea (*Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, etc.). La microbiota intestinal contribuye al estado de salud del huésped, por sus funciones en nutrición, protección, desarrollo y proliferación celular e inmunomodulación^{1,2}. Como consecuencia de ello, existe un creciente interés en el diseño de alimentos o suplementos funcionales que favorezcan su predominio bien mediante la administración de cepas seleccionadas (probióticos) o de polisacáridos complejos (prebióticos) que favorezcan de forma selectiva el desarrollo de los grupos bacterianos deseables^{3,4}.

Contribución de la microbiota intestinal a los mecanismos de defensa del huésped

El tracto gastrointestinal constituye una de las principales zonas de contacto con agentes ambientales potencialmente nocivos (bacterias, virus, toxinas y alérgenos) y desempeña una función primordial en la defensa del organismo frente a éstos. Su función protectora depende de los componentes estructurales y funcionales de la mucosa intestinal, del sistema inmune asociado y de sus interacciones con la microbiota intestinal residente y en tránsito.

Las células del epitelio intestinal, el moco que cubre la mucosa, el flujo sanguíneo que la irriga y las secreciones (fosfolípidos, bilis, péptidos antimicrobianos, etc.) constituyen de forma conjunta una barrera física y química que contribuye a la defensa del huésped⁵. El moco está integrado por mucinas (glucoproteínas), que son potenciales sitios de adhesión para las bacterias. La síntesis y la composición de las mucinas están reguladas genéticamente en cada individuo; además, las bacterias intestinales pueden contribuir a la regulación del repertorio de mucinas mediante la modificación de la expresión génica de glucosiltransferasas del huésped y por acción de sus propias enzimas glucolíticas⁶. Los patógenos normalmente alteran la permeabilidad intestinal, mientras que las bacterias comensales beneficiosas y los probióticos pueden contribuir al restablecimiento de ésta y de las uniones intercelulares, y favorecer la proliferación celular⁷. La síntesis de péptidos antimicrobianos (defensinas) y proteasas implicadas en su activación en las células Paneth constituye un mecanismo adicional de defensa del huésped frente a agentes patógenos. Tanto la producción de las defensinas como de las enzimas que las activan puede ser modulada por la microbiota comensal y por bacterias

probióticas. Por el contrario, algunos patógenos están desarrollando mecanismos de resistencia a esta barrera mediante la reducción de la expresión de dichos péptidos⁸.

El sistema inmune asociado a la mucosa intestinal se considera el principal órgano inmunológico del organismo. Está constituido por tejido linfóide organizado, como los nódulos linfáticos mesentéricos y las placas de Peyer, y por linfocitos difusamente distribuidos a través de la lámina propia y el epitelio. El sistema inmune asociado al intestino es capaz de reconocer determinados agentes exógenos (p. ej., componentes estructurales o toxinas microbianas) y secretar mediadores celulares (p. ej., inmunoglobulinas, citocinas, etc.) responsables del desencadenamiento de la respuesta inmune. La secreción de inmunoglobulina A (IgA) es una de las primeras defensas de la mucosa frente a microorganismos patógenos y su inducción en las placas de Peyer y la lámina propia depende de su interacción con la microbiota comensal. Asimismo, el tejido linfóide asociado al intestino y las células epiteliales poseen receptores (*toll-like receptors*) capaces de reconocer ciertas moléculas bacterianas, entre las que se encuentran los polisacáridos, los ácidos teicoicos y secuencias de ADN CpG no metiladas. El mecanismo por el cual el huésped es capaz de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena se desconoce, pero se supone que existen distintas secuencias señal en los dos grupos de microorganismos cuyo reconocimiento por el huésped desencadena, a su vez, diversas respuestas (proinflamatorias o no). La microbiota comensal se considera implicada en el desarrollo de la estructura y la funcionalidad del epitelio intestinal y, especialmente, de la inmunidad celular y humoral durante el período neonatal. Los ensayos de colonización intestinal realizados con animales libres de gérmenes han demostrado la correlación entre dicho proceso y el desarrollo del sistema inmune. Además, recientes estudios han demostrado que la colonización intestinal está asociada a la maduración de la inmunidad humoral, particularmente a la producción de células secretoras de inmunoglobulina A y M en recién nacidos⁹.

Mecanismos de acción del género «Bifidobacterium» frente a patógenos gastrointestinales

Al género *Bifidobacterium* se le atribuye una importante función en el mantenimiento del equilibrio del ecosistema intestinal y el desplazamiento de microorganismos patógenos. Las cepas de este género constituyen el grupo predominante de la microbiota fecal de niños alimentados con leche materna y unos de los probióticos más importantes. El conocimiento de la contribución de este grupo bacteriano a la función barrera intestinal a través de las interacciones con el huésped es todavía muy limitado. Los mecanismos de acción de las bifidobacterias frente a los patógenos gastrointestinales mejor caracterizados incluyen actualmente la competición por los sitios de adhesión, la inmunomodulación y la síntesis de compuestos antimicrobianos.

Adhesión

La capacidad de adhesión de las bacterias probióticas está relacionada con su potencial para desplazar o inhibir patógenos mediante competición por los sitios de adhesión. Además, esta propiedad se relaciona con la capacidad para colonizar, al menos transitoriamente, el tracto intestinal e interactuar con el sistema inmune del huésped. Por ello, constituye uno de los criterios de selección de bacterias probióticas. La capacidad de adhesión se ha determinado fundamentalmente mediante el uso de diversos modelos *in vitro* basados en líneas celulares (Caco-2 y HT29-MTX) y moco intestinal. En general, las bifidobacterias parecen presentar menor capacidad de adhesión al moco de personas de edad avanzada que al de los niños, lo que podría explicar su menor grado de colonización en el primer grupo de población¹⁰. Además, las cepas de especies típicas de la microbiota fecal de niños (*B. breve* y *B. infantis*) poseen normalmente mayor capacidad de adhesión que las de adultos (*B. longum* y *B. adolescentis*)¹¹. Estos modelos se han utilizado también para demostrar la capacidad de diversas bifidobacterias para inhibir la adhesión y desplazar patógenos previamente adheridos, como *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Salmonella arizonae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii*, *Clostridium difficile* y *C. perfringens*¹²⁻¹⁵. Estudios similares han permitido demostrar la capacidad de algunas bifidobacterias para inhibir también la invasión de enterocitos por patógenos como *E. coli* O157:H7 y *S. enterica* serovar *Typhimurium*^{16,17}. La capacidad de adhesión varía entre especies y entre cepas de la misma especie. En general, se considera un fenómeno complejo en el que pueden estar implicadas fuerzas pasivas, electrostáticas e hidrofóbicas, ácidos teicoicos y estructuras más especializadas como las lectinas y los polisacáridos de superficie. Las moléculas que median la adhesión de bifidobacterias incluyen componentes celulares y productos metabólicos, al menos, de naturaleza proteica y glucídica^{15,18}.

Inmunomodulación

Los probióticos, así como otras bacterias intestinales, pueden interactuar con el sistema inmune asociado a la mucosa intestinal induciendo respuestas humorales y celulares proinflamatorias o antiinflamatorias. Las respuestas generadas por bacterias seleccionadas varían mucho dependiendo de la especie y la cepa, por lo que se debe llevar a cabo una evaluación individualizada. No obstante, actualmente existen evidencias sólidas sobre la capacidad de algunas cepas probióticas para estimular respuestas inmunes protectoras frente a patógenos microbianos¹⁹. Se ha realizado un amplio número de estudios preclínicos utilizando animales libres de gérmenes y modelos de infección de determinados patógenos (*E. coli*, *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *Candida albicans* y rotavirus) con el objetivo de demostrar el efecto protector de algunas bacterias probióticas mediante mecanismos de inmunomodulación. También se han efectuado ensayos clínicos en humanos en los que se demuestra que los probióticos pueden actuar estimulando la síntesis de IgA frente a patógenos, la capacidad fagocítica de las células polimorfonucleares y la

producción de distintas subpoblaciones linfocitarias. El conocimiento de las moléculas de las bacterias probióticas responsables de estas interacciones es todavía limitado. Hasta ahora se ha atribuido actividad inmunomoduladora tanto a bacterias viables como no viables y se ha demostrado que el ADN de cepas probióticas de las especies *B. breve* y *B. infantis* posee capacidad para estimular la producción de citocinas antiinflamatorias²⁰.

Producción de compuestos antimicrobianos

Los metabolitos antimicrobianos producidos por bacterias lácticas se pueden dividir en dos grandes grupos: 1. compuestos de baja masa molecular (<1.000 Da), entre los que se incluyen los ácidos orgánicos que poseen amplio espectro de acción, y 2. las proteínas antimicrobianas, llamadas bacteriocinas (>1.000 Da), con espectro de acción restringido a bacterias grampositivas.

Los ácidos orgánicos mayoritarios generados como consecuencia del metabolismo fermentativo de las hexosas (láctico y acético) se han considerado los principales responsables del efecto inhibitorio de cepas del género *Bifidobacterium* frente a patógenos gastrointestinales, como *Helicobacter pylori* y *S. enterica* serovar *Typhimurium*^{21,22}. Los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) generados a partir del metabolismo de polisacáridos no digeribles en la parte alta del tracto gastrointestinal (prebióticos) por este grupo bacteriano también contribuyen a la reducción del pH en el colon, inhibiendo así su colonización por bacterias patógenas²³. Además, el ácido butírico contribuye al efecto barrera, ya que supone un importante aporte de energía para los enterocitos (60-70%), estimula el flujo sanguíneo y modula la proliferación y diferenciación celular.

La producción de bacteriocinas se detectó en *B. bifidum* NCFB 1454 y, posteriormente, en otras cepas aisladas de heces de niños, aunque éstas resultaron ser activas exclusivamente frente a bacterias grampositivas^{24,25}. Los últimos estudios indican, no obstante, que ciertas cepas aisladas de heces de adultos y niños son capaces de sintetizar proteínas antimicrobianas de amplio espectro activas frente a bacterias grampositivas, gramnegativas y levaduras. Entre éstas se incluyen importantes patógenos gastrointestinales, como *C. difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *H. pylori*, *Campylobacter coli* y *Arcobacter butzleri*^{26,27}.

Evidencias clínicas de la efectividad de bifidobacterias probióticas en el tratamiento de infecciones gastrointestinales

El efecto protector de los probióticos frente a patógenos gastrointestinales detectado mediante ensayos *in vitro* debe demostrarse posteriormente mediante ensayos preclínicos y clínicos. El desarrollo de ensayos preclínicos requiere,

TABLA 1

Evidencias clínicas de los efectos beneficiosos de la administración de cepas del género «Bifidobacterium» frente a infecciones gastrointestinales en población infantil

Condición	Efecto	Especie/cepa probiótica	Vehículo	Referencia
Diarrea por rotavirus	Reducción de la incidencia y de la excreción en heces	<i>B. lactis</i> y <i>S. thermophilus</i>	Leche	Saavedra, et al. ³⁰
	Reducción de la incidencia y aumento de síntesis de IgA	<i>B. breve</i> YIT4064 (Yakult)	No se indica	Araki, et al. ³¹
	Reducción de la incidencia	<i>B. bifidum</i>	Leche	Phuapradit, et al. ³²
Diarrea infecciosa aguda	Reducción de la frecuencia y la duración	<i>B. infantis</i> y <i>L. acidophilus</i>	Cápsulas	Lee, et al. ³³
	Reducción de la incidencia	<i>B. lactis</i> Bb 12	Leche	Chouraqui, et al. ³⁴
Colonización tras tratamiento con antibióticos	Mejora de la velocidad de colonización	<i>B. bifidum</i> y <i>L. acidophilus</i> (Infloran)	Cápsulas	Black, et al. ³⁵
Diarrea asociada al consumo de antibióticos	Reducción de la incidencia	<i>B. lactis</i> y <i>S. thermophilus</i>	Fórmula infantil	Correa, et al. ³⁶

no obstante, el uso de modelos animales de infección adecuados, lo que no siempre es posible debido a que una parte importante de virus y bacterias patógenas son específicas de cada especie. El número de ensayos clínicos realizados hasta ahora para validar el uso de bifidobacterias probióticas en la prevención y el tratamiento de infecciones gastrointestinales es todavía muy limitado y, especialmente, los llevados a cabo en población infantil^{28,29}. Hasta ahora, se han efectuado estudios de intervención en humanos con el objetivo de validar la efectividad de ciertas cepas del género *Bifidobacterium* para reducir el riesgo de diarrea aguda en niños, diarrea del viajero y la asociada al consumo de antibióticos. Los efectos concretos de la administración de bifidobacterias y otros probióticos en la prevención y el tratamiento de infecciones gastrointestinales en la población infantil se resumen en la tabla 1. De todos ellos, los establecidos con mayor rigurosidad son los relacionados con las gastroenteritis agudas (diarreas acuosas y causadas por rotavirus y otros tipos de virus). Sin embargo, no se ha demostrado la efectividad de los probióticos en gastroenteritis causadas por bacterias invasivas. Los efectos dependen de la dosis y de la cepa, lo que demuestra la necesidad de realizar evaluaciones exhaustivas e individualizadas de cada una de ellas previamente a su comercialización. La administración de los probióticos en fases previas o tempranas de la infección incrementa su eficacia frente a estas enfermedades, destacando el carácter preventivo de estos microorganismos así como el de los alimentos funcionales que los contienen. Finalmente, considerando las evidencias existentes sobre los efectos beneficiosos que los probióticos pueden ejercer sobre la salud y, especialmente, sobre el fortalecimiento de las defensas de la población infantil, se deberían intensificar los esfuerzos orientados a la validación de su potencial terapéutico mediante un mayor número de ensayos clínicos rigurosos. ■

Bibliografía

- Guarner F, Malagelada JR. Role of bacteria in experimental colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17(5): 793-804.
- Sanz Y, Collado MC, Haros M, Dalmau J. Funciones metabólicas nutritivas de la flora intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediatr Esp.* 2004; 62(11): 520-526.
- Ferrer B, Dalmau J. Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediatr Esp.* 2001; 59: 150-155.
- Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, Edwards CA, Goulet O, Hernell O, et al.; ESPGHAN Committee on Nutrition. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003; 36(3): 329-337.
- Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine", held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(4): 675-683.
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001; 292: 1.115-1.118.
- Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, De Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16: 204-211.
- Salzman NH, Chou MM, De Jong H, Liu L, Porter EM, Paterson Y. Enteric Salmonella infection inhibits Paneth cell antimicrobial peptide expression. *Infect Immun.* 2003; 71: 1.109-1.115.
- Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000; 83: 186F-1292F.
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Tolkkio S, Salminen S. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects of different age groups. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 172: 61-64.
- He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Comparison of mucosal adhesion and species identification of

- bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. FEMS Immunol Med Microbiol. 2001; 30: 43-47.
12. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. Appl Environ Microbiol. 1993; 59: 4.121-4.128.
 13. Bibiloni R, Pérez FP, De Antoni GL. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia? Anaerobe. 1999; 5: 519-524.
 14. Matsumoto M, Tani H, Ono H, Ohishi H, Benno Y. Adhesive property of *Bifidobacterium lactis* LKM512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin. Curr Microbiol. 2002; 44: 212-215.
 15. Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and its role in enteropathogen exclusion. J Food Prot. 2005 (en prensa).
 16. Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int J Food Microbiol. 2001; 67: 207-216.
 17. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, et al. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. Gut. 2000; 47: 646-652.
 18. Zhong SS, Zhang ZS, Wang JD, Lai ZS, Wang QY, Pan LJ, et al. Competitive inhibition of adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli*, enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* to intestinal epithelial cell line Lovo by purified adhesin of *Bifidobacterium adolescentis* 1027. World J Gastroenterol. 2004; 10(11): 1.630-1.633.
 19. Cross M. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunol Medical Microbiol. 2002; 34: 245-253.
 20. Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, et al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 38: 165-172.
 21. Midolo PD, Lambert JR, Hull R, Luo F, Grayson ML. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. J Appl Bacteriol. 1995; 79: 475-479.
 22. Henriksson A, Conway PL. Isolation of human faecal bifidobacteria which reduce the signs of *Salmonella* infection when orogastrically dose mice. J Appl Microbiol. 2001; 90: 223-228.
 23. Asahara T, Nomoto K, Shimizu K, Watanuki M, Tanaka R. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection by synbiotic administration of *Bifidobacteria* and transgalactosylated oligosaccharides. J Appl Microbiol. 2001; 91: 985-996.
 24. Yildirim Z, Johnson MG. Characterization and antimicrobial spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J Food Prot. 1998; 61: 47-51.
 25. Touré R, Kheardr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. J Appl Microbiol. 2003; 95: 1.058-1.069.
 26. Collado MC, Hernández M, Sanz Y. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by potentially probiotic bifidobacteria. J Food Prot. 2005; 68(5): 1.034-1.040.
 27. Collado MC, González A, González R, Hernández M, Ferrus MA, Sanz Y. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents. 2005; 25(5): 385-391.
 28. Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Puntis JW, et al. ESPGHAN Committee on Nutrition. Prebiotic oligosaccharides in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004; 39(5): 465-473.
 29. Montrose DC, Floch MH. Probiotics used in human studies. J Clin Gastroenterol. 2005; 39(6): 469-484.
 30. Saavedra JM, Bauman NA. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. Lancet. 1994; 344: 1.046-1.049.
 31. Araki T, Shinozaki T, Irie Y, Miyazawa Y. Trial of oral administration of *Bifidobacterium breve* for the prevention of rotavirus infection. J Jp Assoc Infect Dis. 1999; 73: 305-310.
 32. Phuapradit P, Varavithya W, Vathanophas K, Sangchai R, Podhipak A, Suthutvoravut U, et al. Reduction of rotavirus infection in children receiving bifidobacteria-supplemented formula. J Med Assoc Thai. 1999; 82(1): S43-S48.
 33. Lee MC, Lin LH, Hung KL, et al. Oral bacterial therapy promotes recovery from acute diarrhea in children. Acta Paediatr Taiwan. 2001; 42: 301-305.
 34. Chouraqui JP, Van Egrood LD, Fichot MC. Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004; 38: 288-292.
 35. Black F, Einarsson K, Lidbeck A, et al. Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment. Scand J Infect Dis. 1991; 23: 247-254.
 36. Correa NB, Peret Filho LA, Penna FJ, Lima FM, Nicoli JR. A randomised formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. J Clin Gastroenterol. 2005; 39: 385-389.