

Efecto de la ingesta de leche fermentada con *Lactobacillus casei* DN-114 001 sobre la flora intestinal

R. Tormo Carnicer^a, D. Infante Piña^a, E. Roselló Mayans^b y R. Bartolomé Comas^b

^aUnidad de Gastroenterología Infantil y Nutrición. Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona.

^bServicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona. España.

Objetivo

Estudiar las características de la flora microbiana intestinal de niños que recibieron en su dieta leche fermentada con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus* y su repercusión en los valores de inmunoglobulinas secretoras.

Material y métodos

Estudio experimental aleatorizado, prospectivo, con 2 grupos paralelos. Se incluyeron un total de 35 niños (18 en el grupo experimental y 17 en el grupo control), con una edad media de 2 años (DE: 0,6 años; rango: 1-3 años). El grupo experimental recibió en su dieta leche fermentada (500 ml/día) con *L. casei* y *S. thermophilus* durante 6 semanas y leche de vaca normal estándar durante 6 semanas más. El grupo control recibió leche de vaca normal estándar (500 ml/día) a lo largo de todo el estudio.

Se evaluaron los valores de IgA secretora en saliva del grupo experimental al inicio y a las 6 semanas del estudio. Se recogieron heces para el estudio de la flora intestinal a las 0, 6 y 12 semanas en ambos grupos.

Resultados

Se observó un aumento estadísticamente significativo ($p = 0,0063$) de un valor medio basal de 2,5 mg/dl al inicio hasta una media de 3,4 mg/dl a las 6 semanas. Así mismo, se observó un descenso de la flora aeróbica gramnegativa a la semana 6 en comparación con el grupo control ($p = 0,0203$). La proporción de niños en los que se les aisló *Lactobacillus* spp. en la flora intestinal fue superior en el grupo experimental a partir de la semana 6 y llegando a ser estadísticamente significativa ($p = 0,028$) a las 12 semanas.

Conclusión

El presente estudio aporta evidencia sobre la supervivencia de *L. casei* en el tracto intestinal y su efecto inmunoestimulante en un incremento significativo de la IgA secretora.

Palabras clave:

Lactobacillus casei. Probióticos. Inmunidad. Gastroenteritis.

INTAKE OF FERMENTED MILK CONTAINING *LACTOBACILLUS CASEI* DN-114 001 AND ITS EFFECT ON GUT FLORA

Objective

To study the gut flora in infants who received fermented milk containing *Lactobacillus casei* and *Streptococcus thermophilus* and its effect on secretory immunoglobulin levels.

Material and methods

An experimental, randomized, prospective, parallel group study was carried out. Thirty-five infants were included (18 in the treatment group and 17 in the control group) with a mean age of 2 years (SD: 0.6 years; range: 1-3 years). The experimental group received both fermented milk (0.5 l/day) containing *L. casei* and *S. thermophilus* for 6 weeks and standard cow's milk for the following 6 weeks. The control group received standard cow's milk (0.5 l/day) for 12 weeks.

Secretory IgA levels in saliva were evaluated in the experimental group at the start of the study (baseline levels) and 6 weeks later. In both groups, stools were collected to study gut flora at 0, 6 and 12 week.

Correspondencia: Dr. R. Tormo Carnicer.
Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron.
Unidad de Gastroenterología Infantil y Nutrición.
Pº Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. España.
Correo electrónico: tormo42@yahoo.es

Recibido en agosto de 2005.

Aceptado para su publicación en julio de 2006.

Results

Secretory IgA levels significantly increased ($p = 0.0063$) from a mean baseline value of 2.5 mg/dl to a mean of 3.4 mg/dl at 6 weeks. Gram-negative aerobic flora were decreased in the experimental group after 6 weeks compared with the control group ($p = 0.0203$). The number of infants with *Lactobacillus* spp in their gut flora was greater in the experimental group than in the control group at week 6 and this difference was statistically significant ($p = 0.028$) at week 12.

Conclusion

The present study provides evidence of *L. casei* survival in the gastrointestinal tract and of its effect of increasing secretory IgA.

Key words:

Lactobacillus casei. Probiotics. Immunity. Gastroenteritis.

INTRODUCCIÓN

El interés científico por las bacterias lácticas como promotoras de la salud se inició en el año 1908 por Metchnikoff quien observó la longevidad y buena salud de los campesinos búlgaros que consumían grandes cantidades de yogur, un producto lácteo fermentado por lactobacilos¹. De aquí se deriva el término prebiótico, que define a un microorganismo vivo que al ser ingerido en cantidades suficientes ejerce un efecto positivo en la salud. De hecho, un alimento que contiene un probiótico es un caso particular de alimento funcional^{2,3}.

Sin embargo, los productos lácteos que contienen microorganismos muertos no pueden ser considerados como alimento funcional, pues éstos no pueden ejercer su efecto beneficioso en el huésped. Las bacterias utilizadas como probióticos llegan a colonizar el intestino del huésped, pero un factor esencial en la elección del probiótico es su habilidad para sobrevivir en el microambiente intestinal donde ejercen su actividad. Investigaciones recientes se han concentrado en los lactobacilos, tanto por ser un tipo de bacteria láctica (metaboliza la lactosa a ácido láctico) como por ser un género presente en el tracto gastrointestinal humano, siendo el íleon terminal y el colon sus nichos de colonización.

Uno de los problemas al que se enfrenta la industria es saber qué cepas de *Lactobacillus* spp. han de incluir en

sus productos como probióticos. Esto se debe a que en un mismo género y aún dentro de una misma especie, no todas las cepas son equivalentes en cuanto a sus actividades beneficiosas. En realidad las propiedades probióticas son privativas de una minoría de cepas. En la actualidad son pocos los productos que pueden reivindicar, con soporte científico, su contenido en cepas probióticas que muestren una ventaja competitiva en el ecosistema intestinal humano.

El objetivo de nuestro estudio ha sido analizar las características de la flora microbiana intestinal de niños que recibieron en su dieta leche fermentada con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus termophilus* y su repercusión en los niveles de inmunoglobulinas secretoras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio experimental aleatorizado, prospectivo, con dos grupos paralelos. Se incluyeron un total de 35 niños de los cuales 18 correspondían al grupo experimental (A) y 17 al grupo control (B). El grupo A estaba constituido por 10 niños (55,6%) y 8 niñas (44,4%) con una edad media de 2 años (desviación estándar [DE]: 0,6 años; rango: 1-3 años). Los 18 niños del grupo A recibieron en su dieta leche fermentada (500 ml/día) con *L. casei* y *S. termophilus* (Mi Primer Danone®) durante 6 semanas (tabla 1) y pasado este tiempo, los niños fueron alimentados durante 6 semanas más con la misma leche de vaca estándar que recibían antes de entrar en el estudio. Los 17 niños del grupo B fueron alimentados durante todo el período del estudio con leche de vaca normal estándar (500 ml/día).

Se evaluaron los niveles de inmunoglobulina A (IgA) secretora en saliva del grupo A al inicio del estudio y a las 6 semanas de iniciada la alimentación con la leche fermentada con *L. casei* y *S. termophilus*.

Recogida de muestras de heces

Se recogieron heces para el estudio de la flora intestinal a las 0, 6 y 12 semanas en ambos grupos. De cada niño se recogieron 2 muestras de heces, una que se trasladó al laboratorio de microbiología en un recipiente con atmósfera anaerobia (*Anaerocult* Merck) para el estudio de los microorganismos anaerobios y otra en atmósfera aerobia

TABLA 1. Composición por 100 g de producto lácteo fermentado con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus termophilus* elaborado con leche adaptada en proteínas, hierro, hidratos de carbono, grasa, minerales y vitaminas que el bebé puede tomar a partir de los 6 meses de edad

Proteínas (g)	3,4	Calcio (mg)	130	Vitamina A (µg)	60
Total grasas (g)	3,9	Potasio (mg)	100	Vitamina D (µg)	1,5
Ácido linoleico (mg)	380	Sodio (mg)	50	Vitamina E (µg)	0,60
Ácido linoléico (mg)	50	Magnesio (mg)	10	Vitamina C (µg)	8
Total hidratos de carbono (g)	16,4	Hierro (mg)	0,9	Vitamina B ₂ (µg)	0,16
Lactosa (g)	4,9	Cinc (mg)	0,6	Vitamina B ₁₂ (µg)	0,18

para la investigación de las bacterias aerobias. Este traslado se realizó dentro de las primeras 12 h después de haberse recogido las muestras.

Estudio microbiológico

Se realizó un estudio bacteriológico cuantitativo. A partir de 1 g de heces disueltas en 1 ml de agua peptonada, se realizaron 9 diluciones seriadas 1/10 que se sembraron cada una de ellas, mediante asa calibrada 1/100, en los siguientes medios de cultivo: Agar infusión cerebro corazón –para el estudio de la flora anaerobia total–, agar NBGT –para *Bacteroides* spp.–, agar Beerens –para *Bifidobacterium* spp.–, agar MRS y Rogosa –para *Lactobacillus* spp.–; todos ellos incubados durante 3 a 5 días en atmósfera anaerobia a 37 °C.

El estudio cuantitativo de enterobacterias se efectuó mediante la siembra de las nueve diluciones en agar MacConkey incubado 24 h a 37 °C en atmósfera aerobia y la siembra en agar columbia con 5% de sangre y ácido nalidíxico incubado a 37 °C durante 48 h en atmósfera aerobia con un 5% de CO₂ para la detección de flora grampositiva.

Análisis bacteriológico

Los resultados de los estudios cuantitativos se expresaron en número de unidades formadoras de colonias por gramo de heces (UFC/g). Esta información referente al número de colonias se presenta en dos modalidades diferentes: una, la media del número de colonias en tres diluciones sucesivas; y la otra la media de la última dilución con crecimiento. Las comparaciones efectuadas sobre la base de la primera variable se han realizado en escala logarítmica en base 10 y para la última dilución con crecimiento se ha tenido en cuenta directamente el exponente. En este caso, no se puede considerar que la variable tenga una distribución normal, por lo que a la hora de realizar comparaciones se ha recurrido a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. En el caso de *Lactobacillus* spp. se ha realizado un enfoque cualitativo y se ha valorado la frecuencia de niños que presentaron crecimiento de dicha bacteria.

Estudio estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la información disponible que incluía tablas de frecuencias para las variables categóricas y el cálculo de medidas de tendencia central y dispersión para variables continuas. Para comparar variables cuantitativas entre los grupos del estudio se utilizó la prueba de la t de Student de muestras independientes, tras haber realizado una transformación logarítmica de los datos. En el caso del recuento de *Lactobacillus* spp. en heces, se utilizó el test de la chi cuadrado para la comparación de los grupos.

Para analizar la evolución de los pacientes en cuanto a variables categóricas (frecuencia de *Lactobacillus* spp.) se ha utilizado el test de McNemar.

Este trabajo fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Infantil Vall d'Hebron de Barcelona. Además, los procedimientos utilizados en los pacientes y controles han sido realizados tras la obtención de un consentimiento informado de los padres.

RESULTADOS

Estudio bacteriológico

Bacilos gramnegativos aerobios

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos con relación a los bacilos gramnegativos aerobios. Teniendo en cuenta la media del número de colonias en tres diluciones sucesivas, sólo se observan diferencias estadísticamente significativas en los datos correspondientes a las primeras 6 semanas después de iniciado el estudio, observándose que en dicho momento las unidades formadoras de colonias (UFC)/g de heces es mayor en el grupo B que en el A ($p = 0,0203$) y lo mismo ocurre cuando se analizan estos microorganismos teniendo en cuenta la última dilución de heces con crecimiento bacteriano ($p = 0,0444$).

Flora grampositiva aerobia

No se han observado diferencias significativas en la composición de la flora grampositiva aerobia total entre grupos en ningún momento del estudio (tabla 3).

Flora anaerobia total, Bifidobacterium spp. y Bacteroides spp.

Al analizar la última dilución de heces con crecimiento bacteriano y comparar el crecimiento de *Bacteroides* spp. en los grupos A y B durante las primeras 6 semanas después de iniciado el estudio se observan valores más bajos en el grupo A que en el B, con cifras muy próximas a la significación estadística ($p = 0,0662$) (tabla 4).

En el total de la flora anaerobia y en la cantidad de *Bifidobacterium* spp. no se observaron diferencias significativas entre los 2 grupos de niños en ningún momento del estudio (tablas 5 y 6).

Lactobacillus spp.

En la tabla 7 se observa que en el grupo A existe una mayor proporción de niños en los que se les aisló *Lactobacillus* spp. en la flora intestinal que en el grupo B, siendo estas diferencias más evidentes a partir de la sexta semana del estudio y llegando a ser estadísticamente significativas ($p = 0,028$) a las 12 semanas.

Estudio inmunológico

La IgA secretora en el grupo A, se evaluó en dos momentos, al inicio y a las 6 semanas de ingesta de la leche fermentada. Se observó un aumento estadísticamente significativo ($p = 0,0063$) de un valor medio basal de

TABLA 2. Bacilos gramnegativos aerobios en heces

Media de 3 diluciones	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	$3,77 \times 10^6$ g/h	$2,33 \times 10^6$ g/h	p = 0,3551
Semana 6	$1,00 \times 10^6$ g/h	$1,85 \times 10^7$ g/h	p = 0,0203
Semana 12	$9,80 \times 10^6$ g/h	$1,55 \times 10^7$ g/h	p = 0,7611
Media última dilución	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	-4,69	-4,35	p = 0,4139
Semana 6	-4,07	-5,27	p = 0,0444
Semana 12	-5,07	-4,60	p = 0,2632

g/h: gramo/heces.

TABLA 3 Flora grampositiva aerobia en heces

Media de 3 diluciones	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	$1,34 \times 10^7$ g/h	$1,45 \times 10^7$ g/h	p = 0,6766
Semana 6	$1,52 \times 10^7$ g/h	$7,80 \times 10^6$ g/h	p = 0,9289
Semana 12	$4,76 \times 10^6$ g/h	$9,92 \times 10^7$ g/h	p = 0,1113
Media última dilución	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	-5,41	-4,94	p = 0,6313
Semana 6	-4,83	-4,88	p = 0,8640
Semana 12	-4,72	-5,31	p = 0,1690

g/h: gramo/heces.

TABLA 4. *Bacteroides* spp. en heces

Media de 3 diluciones	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	$9,98 \times 10^8$ g/h	$1,78 \times 10^8$ g/h	p = 0,3288
Semana 6	$1,65 \times 10^9$ g/h	$1,19 \times 10^9$ g/h	p = 0,9979
Semana 12	$6,19 \times 10^8$ g/h	$2,36 \times 10^8$ g/h	p = 0,5119
Media última dilución	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	-7,18	-6,60	p = 0,4848
Semana 6	-6,47	-7,06	p = 0,0662
Semana 12	-6,50	-6,87	p = 0,9477

g/h: gramo/heces.

2,5 mg/dl al inicio hasta una media de 3,4 mg/dl a las 6 semanas. El valor medio basal de IgA para el grupo control fue de 2,47 mg/dl.

DISCUSIÓN

La microflora intestinal es un complejo ecosistema compuesto por una amplia variedad de bacterias. La capacidad metabólica de la flora es extremadamente variada y puede producir tanto efectos beneficiosos como perjudiciales en la fisiología intestinal. Alterar la composición

TABLA 5. Flora total anaerobia en heces

Media de 3 diluciones	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	$3,20 \times 10^9$ g/h	$1,53 \times 10^9$ g/h	p = 0,4174
Semana 6	$3,51 \times 10^9$ g/h	$2,28 \times 10^9$ g/h	p = 0,8833
Semana 12	$1,89 \times 10^9$ g/h	$1,61 \times 10^9$ g/h	p = 0,2481
Media última dilución	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	-7,47	-7,00	p = 0,4278
Semana 6	-7,00	-7,12	p = 0,6695
Semana 12	-6,50	-7,06	p = 0,0845

g/h: gramo/heces.

TABLA 6. *Bifidobacterium* spp. en heces

Media de 3 diluciones	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	$1,13 \times 10^8$ g/h	$7,77 \times 10^7$ g/h	p = 0,4718
Semana 6	$1,52 \times 10^8$ g/h	$5,48 \times 10^8$ g/h	p = 0,6934
Semana 12	$8,13 \times 10^7$ g/h	$3,63 \times 10^8$ g/h	p = 0,1933
Media última dilución	Grupo A	Grupo B	
Semana 0	-5,94	-5,64	p = 0,4422
Semana 6	-5,88	-6,44	p = 0,2274
Semana 12	-5,47	-5,93	p = 0,2906

g/h: gramo/heces.

TABLA 7. *Lactobacillus* spp. en heces

Porcentaje de niños con <i>Lactobacillus</i> spp.	Grupo A (%)	Grupo B (%)	
Semana 0	7/18 (38,9)	4/17 (23,5)	p = 0,328
Semana 6	9/18 (50)	4/17 (23,5)	p = 0,105
Semana 12	10/18 (55,6)	3/16 (18,7)	p = 0,028

g/h: gramo/heces.

de dicha flora para potenciar sus efectos beneficiosos es el objeto de los probióticos con el fin de mejorar el estado de salud del huésped. Se distinguen tres acciones beneficiosas: nutrición y metabolismo, como resultado de la actividad bioquímica de la flora; protección y prevención de la colonización por microorganismos patógenos (efecto barrera); y funciones tróficas sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal y sobre el desarrollo y modulación del sistema inmunológico³. Estas funciones han sido fundamentalmente atribuidas a la población microbiana estrictamente anaerobia, la cual mantiene a especies aerotolerantes como son *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp. como una flora subdominante mediante un efecto de barrera permisiva⁴. Las bacterias lácticas como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. que

representan un 25% del total del recuento de la flora fecal en el adulto son los géneros considerados potencialmente útiles con relación a dichos efectos beneficiosos⁵.

Durante la última década se han llevado a cabo diversos estudios con el objeto de evaluar los efectos que sobre la salud pueden tener el consumo de lácteos fermentados (el yogur) suplementados con bacterias vivas. Un obstáculo importante que pueden encontrar las bacterias lácticas tras ser ingeridas es la secreción ácida del tracto gastrointestinal, que constituye el mecanismo de defensa más importante del organismo frente a la mayoría de los microorganismos patógenos que se ingieren.

En un estudio realizado por Djouzi et al⁶ se demuestra que la supervivencia de las bacterias durante el tránsito gastrointestinal depende de las especies bacterianas y de la combinación de las bacterias lácticas en el producto. También ponen de manifiesto que *L. casei* sobrevive a su paso por la barrera gástrica cuando es ingerido en dietas con leche fermentada, encontrándose un gran número de células viables en las heces. Esta bacteria es resistente al ácido gástrico y a la bilis y permanece viable en un rango de pH de 3,0-7,0⁷. Diferentes cepas de este microorganismo sobreviven durante el tránsito gastrointestinal y alcanzan el íleo terminal en cantidades suficientes para desarrollar su acción fisiológica.

Recientes estudios demuestran también que la ingesta regular de leche fermentada con *L. casei* protege contra la diarrea por rotavirus en niños. En el intestino, esta bacteria restablece la integridad de la mucosa y reduce la infección a nivel del *microvilli* de la mucosa intestinal⁸.

Los datos microbiológicos obtenidos en este estudio evidencian que entre las 6-12 semanas después de la ingesta de una leche fermentada con *L. casei* y *S. thermophilus* en el grupo A existe una mayor proporción de niños en los que se aísla *L. casei* en la flora intestinal, que en el grupo de niños control. Por ello podemos constatar la supervivencia de esta bacteria láctea a lo largo del tracto digestivo y su colonización intestinal. Otros estudios también detectan un aumento significativo en el aislamiento de *L. casei* en las heces de niños alimentados con leche fermentada con este microorganismo⁹⁻¹². Además otros autores ponen de manifiesto que *L. casei* puede localizarse en las heces hasta pasadas 2 y hasta 4 semanas después de la interrupción de la ingesta de leche suplementada con dicha bacteria, tal y como también ocurre en nuestro estudio^{9,12,13}. Otros autores, por el contrario, detectan una disminución de *Lactobacillus* en las heces después de la ingesta de la fórmula láctea suplementada^{14,15}.

En las heces de los niños pertenecientes al grupo experimental de este estudio hemos detectado una disminución de la cantidad de bacilos gramnegativos aerobios y de *Bacteroides* spp., efecto que podría deberse al bloqueo de los lugares de adhesión de estos microorganismos a la mucosa intestinal por parte de *L. casei*.

La posibilidad de inducir una respuesta inmunitaria por vía digestiva es conocida desde hace aproximadamente un siglo. Existen millones de interacciones entre las bacterias, el epitelio y el tejido inmunológico subyacente, que poco a poco van programando y modulando un sistema de defensa muy potente y complejo^{16,17}. De hecho, la microflora intestinal normal es el estímulo endógeno de mayor importancia para el desarrollo y maduración del sistema inmunitario normal tanto en su respuesta sistémica como a nivel local (mucosas)¹⁸.

En el presente estudio, en el grupo de niños alimentados con leche fermentada con *L. casei* se demuestra un incremento significativo ($p = 0,0063$) de los valores de IgA secretora a las 6 semanas de la ingesta, que pondría en evidencia el efecto inmunológico beneficioso provocado por la bacteria a partir de su colonización intestinal. Vitiñi et al¹⁹ demuestran que *L. casei* es capaz de producir un aumento del número de células productoras de IgA en la lámina propia del intestino delgado, siendo este efecto dosis dependiente. También ponen en evidencia estos autores que esta capacidad inmunoestimulante no puede generalizarse a todos los géneros o especies de las bacterias lácticas sino que esta propiedad queda restringida a ciertas cepas y por tanto no todas las bacterias lácticas pueden utilizarse para estimular el sistema inmunológico intestinal.

En conclusión, este estudio aporta evidencia sobre la supervivencia de *L. casei* en el tracto intestinal y su efecto inmunoestimulante en un incremento significativo de la IgA secretora.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr.* 2000;130:S384-S90.
2. Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr.* 2002;88 Suppl 1:39-49.
3. Guarner F, Malagelada JR. La flora bacteriana del tracto digestivo. *Gastroenterol Hepatol.* 2003;26 Supl 1:1-5.
4. Tancredi C. Role of human microflora in health and disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992;11:1012-5.
5. Onderdonk AB. The intestinal microflora and intra-abdominal sepsis. En: Tannock GW, editor. Medical importance of the normal microflora. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 164-76.
6. Djouzi Z, Andrieux C, Degivry MC, Bouley C, Szylit O. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *J Nutr.* 1997;127:2260-6.
7. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* spp. (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci.* 1992;37:121-8.
8. Guérin-Danan C, Meslin JC, Chambard A, Charpilienne A, Relano P, Bouley C, et al. Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114001 protects suckling rats from rotavirus associated diarrhea. *J Nutr.* 2001;131:111-7.

9. Guérin-Danan C, Chabanet C, Pedone C, Popot F, Vaissade P, Bouley C, et al. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: Influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr*. 1998;67:111-7.
10. Millar MR, Bacon C, Smith SL, Walker V, Hall MA. Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus* GG. *Arch Dis Child*. 1993;69:483-7.
11. Sepp E, Mikelsaar M, Salminen S. Effect of administration of *Lactobacillus casei* strain GG on the gastrointestinal microbiota of new-borns. *Microb Ecol Health Dis*. 1993;6:309-14.
12. Sheen P, Oberhelman RA, Gilman RH, Cabrera L, Verasategui M, Madico G. Short report: A placebo-controlled study of *Lactobacillus* GG colonization in one to three year old Peruvian children. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;52:389-92.
13. Patel JR, Dave JM, Dave RI, Sannabhadti SS. Effect of feeding milk fermented with mixed culture of human strains of lactobacilli on faecal lactobacilli and coliform counts in human test subjects. *Indian J Dairy Sci*. 1992;45:379-82.
14. Gilliland SE, Speck ML, Nauyook GF, Giesbrecht FG. Influence of consuming non fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of healthy males. *J Dairy Sci*. 1978;61:1-10.
15. Pedrosa MC, Golner BB, Goldin BR, Barakat S, Dallal GE, Russell RM. Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:353-9.
16. Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut associated lymphoid tissue (GALT): The roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol*. 1998;6:13-8.
17. Gordon JI, Hooper LV, McNevin MS, Wong M, Bry L. Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: Conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol*. 1997;273:G565-G70.
18. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361:512-9.
19. Vitiñi E, Álvarez S, Medina M, Medici M, Budeguer MV, Perdigon G. Gut Mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell*. 2000;24:223-32.