

Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas

Bacteriología de la leche humana

La leche humana ha sido sistemáticamente marginada de los análisis microbiológicos, en contraste con la procedente de vacas, ovejas o cabras, cuyo precio está condicionado a su calidad bacteriológica. Ocasionalmente, se ha procedido a la detección e identificación de bacterias potencialmente patógenas en leche almacenada en bancos, en casos de mastitis o en infecciones neonatales humanas; sin embargo, todavía son muy escasos los estudios sobre la microbiología de la leche humana obtenida de mujeres sanas, lo cual no es de extrañar ya que, hasta hace muy pocos años, se consideraba que este fluido era estéril.

Los datos disponibles hasta la fecha indican que, entre las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia, destacan diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc*¹⁻³. Al nivel de especie, destaca *Staphylococcus epidermidis*, tanto en distribución (se encuentra en prácticamente el 100% de las mujeres lactantes sanas) como en lo que respecta a su concentración en dicho fluido ($>10^3$ ufc/ml). Por lo tanto, no es casualidad que en los últimos años se esté poniendo de manifiesto que la presencia de esta especie sea una característica diferencial de las heces de lactantes⁴. Por otra parte, recientemente se ha confirmado que la concentración de lactobacilos y enterococos es significativamente más elevada en la microbiota de lactantes que en la de niños alimentados con fórmulas^{5, 6}. El hecho de que bacterias pertenecientes a los citados géneros se puedan aislar fácilmente de leche obtenida en países muy diferentes (en términos geofísicos, socio-económicos y/o culturales) sugiere que su presencia no es un fenómeno aislado sino que, al contrario, se trata de un evento común. Por lo tanto, sería más justo considerar que tales bacterias no son el resultado de una mera contaminación de la leche sino que realmente constituyen la microbiota natural de este fluido biológico.

La aplicación de métodos moleculares que no requieren el cultivo de los microorganismos ha confirmado que la leche materna es una buena fuente de estafilococos, estreptococos y bacterias lácticas pero, además, ha mostrado que algunas bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, también están ampliamente difundidas en la leche humana⁷. Esta última observación no es anómala ya que la microbiota del intestino del lactante suele ser un fiel reflejo de la existente en la leche materna^{1, 2} y estudios recientes han revelado que *E. coli* puede encontrarse entre las primeras especies que colonizan el intestino neonatal⁸.

Papel de las bacterias de la leche materna en la colonización del intestino neonatal

La leche humana es uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato ya que este fluido garantiza un aporte continuo de bacterias durante todo el periodo de lactancia. De hecho, posiblemente se trate de la principal fuente de bacterias para el recién nacido ya que se estima que un lactante que ingiera aproximadamente 800 ml de leche al día recibe entre 10^5 y 10^7 bacterias^{1, 2}. Por lo tanto, no es de extrañar que la microbiota intestinal del lactante refleje la existente en la leche materna.

El número de especies bacterianas existentes en la leche de mujeres sanas parece ser bajo⁷. A pesar de ello, existe una gran variabilidad interindividual, de tal manera que la leche de cada mujer tiene una composición bacteriana única, de forma análoga a lo que sucede con la microbiota intestinal de niños y adultos. El predominio de un pequeño número de especies en este fluido podría explicar porqué la microbiota intestinal de lactantes sanos está compuesta por un reducido espectro de especies y cepas. Un estudio entre 112 lactantes suecos ha revelado que, durante los primeros seis meses de vida, el 26% no portaba lactobacilos en su contenido fecal, el 37% portaba una única cepa, otro 26% portaba dos cepas y, finalmente, el 11% restante portaba tres o más cepas⁵.

La presencia de un espectro bacteriano reducido también podría explicar porqué el desarrollo de una microbiota mucho más diversa coincide precisamente con el inicio del destete^{8, 9}. La microbiota intestinal infantil está profundamente influenciada por la dieta y, en este sentido, la introducción de alimentos sólidos, junto con la retirada progresiva de la leche, provoca cambios drásticos en su composición¹⁰. Es probable que este hecho sea el principal responsable de las diferencias observadas entre la microbiota intestinal de los niños que reciben lactancia materna y la de aquellos alimentados con fórmulas infantiles^{10, 11}. Aunque resulta indudable que en los últimos años se han producido grandes avances en el campo de la nutrición infantil, todavía existen diferencias cuantitativa y cualitativamente importantes entre la leche humana y las fórmulas infantiles.

Origen de las bacterias aisladas de leche materna

El origen de las bacterias presentes en la leche humana es objeto de controversia. Tradicionalmente se ha considerado que la colonización del intestino del neonato empezaba durante el parto debido a la contaminación de su cavidad oral con bacterias procedentes de las microbiotas vaginal y/o intestinal de la madre; posteriormente, las bacterias pasarían de la boca del niño al pecho de la madre y, en consecuencia, contaminarían la leche al ser eyectada. Esta hipótesis, ha sido ampliamente aceptada desde los trabajos de Tissier¹² a pesar de que, sorprendentemente, no existen evidencias científicas que la respalden. De hecho, en los últimos años, se ha puesto en evidencia que las bacterias lácticas que colonizan inicialmente el intestino neonatal se pueden transmitir de forma vertical entre la madre y el niño mediante la leche materna incluso en aquellos nacidos por cesárea^{2,5,8,13-16}. Todos estos estudios sugieren que la piel de la madre y/o el tránsito por el canal del parto representan, en el mejor

de los casos, fuentes minoritarias o insignificantes de bacterias para el intestino del recién nacido.

Globalmente, los estudios recientes sugieren que al menos una parte sustancial de las bacterias comensales existentes en leche materna podrían proceder de la microbiota intestinal de la madre y accederían al epitelio de la glándula mamaria a través de una ruta interna. Todavía no se conocen con exactitud los mecanismos por el que ciertas bacterias no patógenas podrían atravesar el epitelio intestinal de personas sanas aunque algunos trabajos han abierto perspectivas realmente interesantes¹⁷⁻¹⁹. Tradicionalmente se pensaba que las bacterias sólo podían atravesar el epitelio intestinal intacto a través de las células M, unas células epiteliales especializadas que se localizan en las placas de Peyer, pero actualmente se sabe que las células dendríticas existentes en la lámina propia pueden penetrar el epitelio intestinal intacto y captar bacterias directamente de la luz intestinal^{17, 18}. Más concretamente, las células dendríticas son capaces de abrir las zonas de oclusión entre enterocitos adyacentes, proyectar dendritas al exterior del epitelio y captar células viables, preservando la integridad de la barrera intestinal mediante la expresión de las proteínas que integran las zonas de oclusión (Fig. 1). Empleando este mecanismo, una bacteria no invasiva fue capaz de llegar viable al bazo de ratones inoculados por vía oral¹⁷. En este sentido, se ha puesto de manifiesto la capacidad de translocación de ciertos lactobacilos y enterococos sin causar efectos perjudiciales para el hospedador. Es más, la translocación de lactobacilos en el aparato digestivo de mujeres embarazadas con una placenta completamente normal deriva en la presencia de estas bacterias en el líquido amniótico, un proceso que tiene una clara influencia beneficiosa en el proceso de gestación ya que se ha asociado a una menor tasa de prematuridad²⁰.

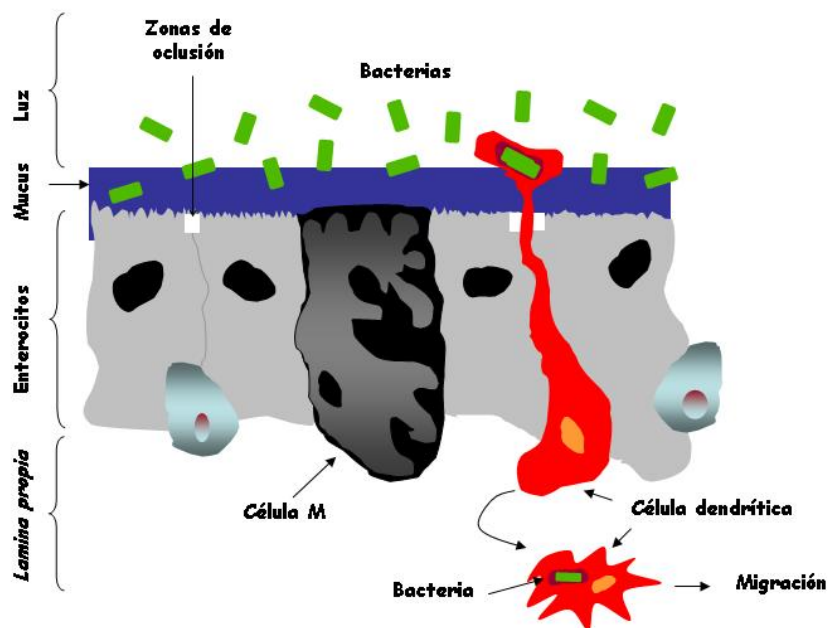


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo por el que las bacterias comensales del intestino pueden atravesar la barrera epitelial mediante interacción con las células dendríticas

Tras unirse a las células dendríticas o macrófagos, las bacterias pueden propagarse a mucosas distantes de la del aparato digestivo ya que es bien conocida la circulación de células del sistema inmunitario entre los distintos compartimentos del tejido linfoide asociado a mucosas²¹. Una vez estimuladas por la presencia de las bacterias, estas células podrían migrar desde la mucosa intestinal y colonizar mucosas distantes, como la de los tractos respiratorio y genitourinario, o la de la mismísima glándula mamaria lactante²¹ (Fig. 2). En este último caso, se establece la ruta enteromamaria, una conexión bien documentada que se establece específicamente durante los últimos meses de gestación y la lactancia. Durante tales períodos, se produce un acúmulo selectivo y masivo de células del sistema inmunitario de origen intestinal en la glándula mamaria mediante un proceso regulado por las hormonas lactogénicas²². En cualquier caso, estos procesos entero-mamarios implican el establecimiento de interacciones específicas entre las células del epitelio intestinal, las bacterias intestinales y las células del sistema inmunitario del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal^{23, 24}.

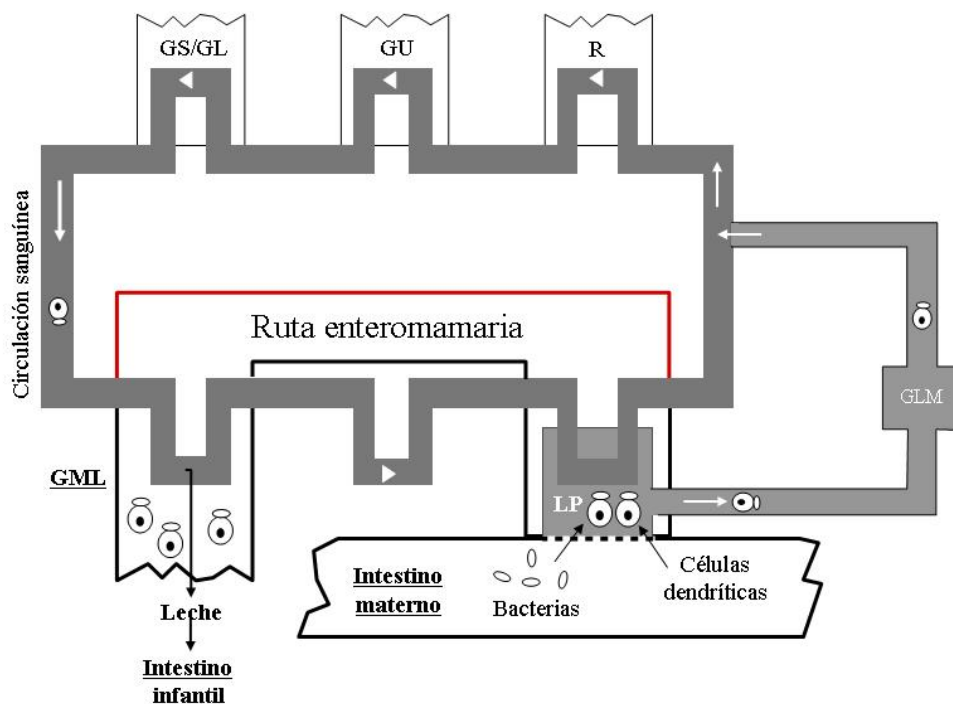


Figura 2. Acceso de las bacterias comensales intestinales a la leche materna a través de la ruta enteromamaria. Abreviaturas: GU, mucosa del tracto genitourinario; GML, mucosa de la glándula mamaria lactante; GLM, ganglio linfático mesentérico; LP, lámina propia; R, mucosa del tracto respiratorio; GSL, mucosa de las glándulas salivares y lacrimales.

Además de la capacidad de translocación, las bacterias del intestino materno deberían reunir al menos otras dos propiedades para alcanzar primero el epitelio de la glándula mamaria y, después, el intestino del niño: (1) capacidad para sobrevivir durante el tránsito por la circulación sistémica y (2) capacidad para sobrevivir durante el tránsito por el aparato digestivo del lactante. Con respecto a la primera propiedad, es interesante señalar que 125 de las 485 cepas de lactobacilos depositadas en la prestigiosa colección PROSAFE (derivada del proyecto de la UE titulado “*Biosafety evaluation of lactic acid bacteria used for human consumption*”) fueron aisladas originalmente de muestras de sangre humana obtenida, en la mayoría de los casos, de individuos sanos²⁵. Entre esas 125 cepas se encuentran hasta 16 especies distintas de lactobacilos, incluyendo las especies que se aíslan más frecuentemente de leche humana fresca. También resultan ilustrativos los resultados de un estudio-simulacro cuyo objetivo era la identificación rápida de cualquier bacilo Gram-positivo existente en la sangre de personas sanas ante un posible episodio de bioterrorismo con *Bacillus anthracis*.

Pues bien, entre los 927 aislados identificados, los pertenecientes al género *Lactobacillus* conformaban el cuarto grupo más numeroso, tras *Corynebacterium*, *Bacillus* y *Clostridium*²⁶. Por otra parte, todas las bacterias lácticas de leche humana analizadas hasta la fecha han mostrado una elevada supervivencia cuando se exponen a las condiciones existentes durante el tránsito por el tracto gastrointestinal²⁷⁻²⁹.

Aunque, obviamente, serán necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos por los que ciertas bacterias de la microbiota intestinal materna pueden colonizar el epitelio de la glándula mamaria, los resultados de los estudios realizados hasta la fecha sugieren que la modulación de la microbiota intestinal de la madre durante el embarazo y la lactancia puede tener un efecto directo en la salud de los lactantes.

La leche humana como fuente de agentes bioterapéuticos

En los últimos años, los problemas asociados a la difusión de bacterias resistentes a antibióticos de relevancia clínica han conducido a un renovado interés por la bacterioterapia, una práctica que hace uso de bacterias comensales o probióticas para prevenir o tratar la colonización del hospedador por parte de patógenas y que ha despertado gran interés en el campo de la pediatría³⁰⁻³³. Esta estrategia se basa en el principio de exclusión competitiva, por el que ciertas bacterias no patógenas se imponen sobre las patógenas cuando compiten por el mismo nicho ecológico. En este sentido, es lógico suponer que algunas de las bacterias presentes en la leche materna contribuyen a la prevención de infecciones infantiles; de hecho, su presencia podría ser una de las razones que explicarían porqué la actividad antimicrobiana exhibida por la leche humana recién recolectada se pierde, parcial o totalmente, tras su pasteurización.

La leche materna es el único alimento ingerido por muchos neonatos, un segmento de la población muy sensible a las enfermedades infecciosas, especialmente cuando deben permanecer ingresados en unidades de neonatología durante un tiempo prolongado. En consecuencia, el aislamiento de bacterias con propiedades beneficiosas para la salud de los niños a partir de leche humana resulta particularmente atractivo para los sectores biomédico y alimentario ya que, por su propia naturaleza, cumplen algunos de los requisitos generalmente recomendados para bacterias empleadas como probióticos humanos, tales como origen humano, ingestión infantil prolongada sin efectos adversos y adaptación tanto a mucosas como a substratos lácteos. Además, tal hallazgo abre nuevas perspectivas sobre el papel biológico de la lactancia materna. Conviene tener en cuenta que entre las bacterias aisladas normalmente de la leche materna existen algunas especies, como *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. fermentum* o *E. faecium*, que se incluyen habitualmente entre las potencialmente probióticas. De hecho, estudios recientes han revelado que los lactobacilos aislados de leche materna poseen un potencial probiótico similar o superior al de ciertas cepas de lactobacilos de gran difusión comercial como *L. rhamnosus* GG, *L. casei* imunitass o *L. johnsonii* La1^{27, 28}.

Las bacterias lácticas juegan un papel muy importante en las barreras microbiológicas primarias que se forman en las mucosas con el fin de prevenir infecciones. En general, las bacterias lácticas aisladas de leche materna parecen mostrar un gran potencial para adherirse a las mucosas y/o para producir sustancias antimicrobianas^{27, 28, 34} y algunas cepas han sido propuestas como agentes bioterapéuticos para la prevención de infecciones neonatales y mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*¹. Además, otras bacterias de la leche, como estreptococos, estafilococos y *Escherichia coli*, pueden resultar muy útiles para reducir la incidencia de patógenos en neonatos de alto riesgo expuestos a ambientes hospitalarios. Por ejemplo, algunos estreptococos del grupo *viridans* evitan que cepas de *S. aureus* resistentes a

la meticilina puedan colonizar la cavidad oral de los niños³⁵. Por otra parte, la presencia de *St. parasanguis* en la cavidad oral infantil previene el desarrollo de caries y enfermedades periodontales debido a su antagonismo con las bacterias responsables de tales procesos, como *St. mutans*³⁶. Por lo que respecta a *E. coli*, esta especie comprende cepas patógenas y también cepas comensales; estas últimas son habitantes normales, y con funciones ecológicas relevantes, en las mucosas humanas³⁷. De hecho, la cepa *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) es la base de un producto probiótico infantil ampliamente difundido en Alemania y otros países del Este de Europa y diversos estudios han demostrado que su aplicación por vía oral, tanto a niños a término como a prematuros, reduce significativamente el número y la severidad de infecciones infantiles³⁸.

La lactancia materna exclusiva durante los primeros meses de vida se ha asociado con tasas significativamente más bajas de asma y dermatitis atópica en la población infantil, por lo que esta práctica está fuertemente indicada en niños con una historia de atopia familiar. Las bacterias comensales de la leche materna podrían jugar un papel en este efecto protector ya que se ha descrito que algunos lactobacilos de origen humano pueden prevenir la aparición de atopia mediante diversos mecanismos³⁹. Estos autores han descrito que la administración de una cepa exógena de *Lb. rhamnosus* a embarazadas y lactantes con historia de atopia familiar reduce significativamente el riesgo de padecer este tipo de problemas. Sin embargo, resulta esclarecedor que esta especie (y/u otras especies de lactobacilos estrechamente relacionadas) ya se encuentran de forma natural en la leche materna. También es interesante resaltar que la presencia de estreptococos del grupo *viridans* (con alta prevalencia en la leche humana) parece ser una característica propia del intestino del niño sano en contraposición con el intestino del niño atópico⁴⁰. Como se ha comentado repetidamente, la leche materna es la principal fuente de bacterias comensales para el intestino del lactante y se considera que las bacterias intestinales son uno de los estímulos más importantes para el desarrollo del tejido

linfoide asociado a la mucosa intestinal, pudiendo promover procesos antiinfecciosos y antialérgicos.

6. Implicaciones para los Bancos de Leche

El potencial probiótico de las bacterias presentes en la leche materna debería ser un motivo de reflexión para los Bancos de Leche. El desconocimiento de la existencia de una microbiota específica en la leche materna ha propiciado que estas entidades desechen aquellas leches que contienen un recuento total de entre 10^3 y 10^5 ufc/ml, a pesar de que dichas concentraciones se encuentran de forma natural en la leche de prácticamente cualquier mujer sana^{1, 2}. Además, la mera presencia, a cualquier nivel, de enterococos, estafilococos o bacterias Gram-negativas también se considera un elemento de inaceptabilidad ya que se atribuye a una higiene defectuosa o a las contaminaciones de los equipos empleados para su extracción por bacterias con alta prevalencia en los ambientes hospitalarios⁴¹. Curiosamente, la esterilización de las bombas empleadas para la extracción de la leche no impide la presencia de estas bacterias en leche⁴².

En los últimos años, el empleo de medios de cultivo y de técnicas moleculares ha revelado que tales bacterias son habitantes naturales de la leche materna por lo que, siguiendo ese criterio, prácticamente ninguna mujer sana debería amamantar a su hijo; afortunadamente, a las mujeres que amamantan directamente a sus hijos no se les practican cultivos de leche materna. En este sentido, no es de extrañar que hasta un 86% de las muestras de leche extraídas de mujeres chinas sanas habría sido rechazada según los criterios de muchos Bancos de Leche³ a pesar de que, en ese mismo estudio, el empleo de esa leche “presuntamente contaminada” derivó en efectos beneficiosos para la salud de los niños que la consumieron, especialmente en comparación con la de aquellos que recibieron fórmulas infantiles. En

resumen, en el futuro habrá que tener en cuenta que la leche materna no sólo es un alimento completo desde el punto de vista nutritivo o inmunológico sino también desde el punto de vista microbiológico.

Bibliografía

1. Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 471–478.
2. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Ped* 2003; 143: 754–758.
3. Ng DK, Lee SYR, Leung LCK, Wong SF, Ho JCS. Bacteriological screening of expressed breast milk revealed a high rate of bacterial contamination in Chinese women. *J Hospital Infect* 2004; 58: 146–150.
4. Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Wold AE. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle. *Pediatric Res* 2006; 59: 96–101.
5. Ahrné S, Lönnemark E, Wold AE, Åberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Molin G, Adlerberth I. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microb Infect* 2005; 7: 1256–1262.
6. Rinne MM, Gueimonde M, Kalliomäki M, Hoppu U, Salminen SJ, Isolauri E. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43: 59–65.

7. Martin R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jimenez E, Fernandez L, Smidt H, Rodriguez JM. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women. *Res Microbiol* 2007; 158: 31-37.
8. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 219–226.
9. Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 1990; 64: 185–188.
10. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 1035S–1045S.
11. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 61–67.
12. Tissier H. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Paris: Carreand G, Naud C; 1900.
13. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Pediatr* 2003; 91: 48–55.
14. Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K, Kato H. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Chemother* 2002; 8: 43–49.
15. Schultz M, Göttl C, Young RJ, Iwen P, Vanderhoof JA. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J Ped Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 293–297.

16. Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA. Plasmid profiling of members of the Family *Enterobacteriaceae*, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1225–1228.
17. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 1999; 401: 804–808.
18. Rescigno M, Urbano M, Valsazina B, Francoloni M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol* 2001; 2: 361–367.
19. Qutaishat SS, Stemper ME, Spencer SK, Borchardt MA, Opitz JC, Monson TA, Anderson JL, Ellingson LE. Transmission of *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 to infants through mother's breast milk. *Pediatrics* 2003; 111: 1442–1446.
20. Dasayanake AP, Li Y, Wiener H, Ruby JD, Lee MJ. Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *J Periodontol* 2005; 76: 171–177.
21. Roitt I. *Essential Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.
22. Bertotto A, Gerli R, Castellucci G, Scalise F, Vaccaro R. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology* 1991; 74: 360–361.
23. Langa S. Interacciones entre bacterias lácticas, células del epitelio intestinal y células del sistema inmunitario. Desarrollo de modelos *in vitro*. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2006.

24. Perez PF, Dore J, Leclerc M, Lévensse F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donet-Hughes A. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007; 119: 724-732.
25. Vankerckhoven VV, van Autgaerden T, Huys G, Vancanneyt M, Swings J, Goossens H. Establishment of the PROSAFE collection of probiotic and human lactic acid bacteria. *Microbiol Ecol Health Dis* 2004; 16: 131–136.
26. Begier EM, Barrett NL, Mshar PA, Johnson DG, Hadler JL. Connecticut Bioterrorism Field Epidemiology Response Team. Gram-positive rod surveillance for early anthrax detection. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1483–1486.
27. Martin R, Olivares M, Marin ML, Fernandez L, Xaus J, Rodriguez JM. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J Hum Lact* 2005; 21: 8–17.
28. Martin R, Jimenez E, Olivares M, Marin ML, Fernandez L, Xaus J, Rodriguez JM. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int J Food Microbiol* 2006; 112: 35–43.
29. Fernández L, Marín ML, Langa S, Martín R, Reviriego C, Fernández A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. A novel genetic label for detection of specific probiotic lactic acid bacteria. *Food Sci Tech Int* 2004; 10: 101–108.
30. Cabo T, Ferrer B, Dalmau J. Aspectos preventivos y terapéuticos de los prebióticos y probióticos. *Acta Pediatr Esp* 2003; 61: 343-7
31. Sanz Y, Collado MC, Dalmau J. Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediatr Esp* 2006; 64: 74-8
32. Rodríguez JM, Dalmau J. Probióticos para el binomio madre-hijo (I). *Acta Pediatr Esp* 2006; en prensa.

33. Rodríguez JM, Dalmau J. Probióticos para el binomio madre-hijo (II). *Acta Pediatr Esp* 2006; en prensa.
34. Beasley SS, Saris, PEJ. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5051-5053.
35. Uehara Y, Kikuchi K, Nakamura T, Nakama H, Agematsu K, Kawakami Y, Maruchi N, Totsuka K. H₂O₂ produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1408-1413.
36. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1001-1009.
37. Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U. Analysis of the genome structure of the non pathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* 2004; 186: 5432-5441.
38. Cukrowska B, Lodínová-Žádníková R, Enders C, Sonnenborn U, Schulze J, Tlaskalova-Hogenova H. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with non-pathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand. J. Immunol.* 2002; 55: 204-209.
39. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 1869-1871.
40. Kirjavainen PV, Apostolou E, Arvola T, Salminen SJ, Gibson GR, Isolauri E. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 32: 1-7.

41. Lindemann PC, Foshaugen I, Lindemann R. Characteristics of breast milk and serology of women donating breast milk to a milk bank. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2004; 89: F440–F441.
42. Tyson JE, Edwards WH, Rosenfeld AM, Beer AE. Collection methods and contamination of bank milk. *Arch Dis Child* 1982; 57: 396–398.