

La supplementazione con probiotici nella prevenzione della malattia influenzale in età pediatrica: basi sperimentali ed applicazioni cliniche

Probiotic supplementation in prevention of seasonal influenza in children: experimental background and clinical applications

Summary

In the last ten years, several studies have been performed to evaluate the effects of various probiotics - both alone and in combination - on immune parameters and infectious/inflammatory conditions in humans. The results of these trials suggest that probiotic bacteria might improve both the humoral and cell-mediated immune response, including phagocytosis, lymphocyte proliferation, cytokine release and mucosal IgA production. The most studied probiotics are *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. They have been seen to provide numerous benefits when administered to children and adults, ranging from a lower risk of viral respiratory infections to improvement in some allergic and inflammatory diseases, particularly atopic dermatitis and bowel inflammatory disease (BID). In this paper we critically evaluate the current state of research on the use of probiotics in the prevention of winter respiratory infections, paying particular attention to the more recent and less emphasized research on children.

Pregliasco F, Zuccarini C. Probiotic supplementation in prevention of seasonal influenza in children: experimental background and clinical applications. *Trends Med* 2010; 10(2):79-85.

©2010 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

Fabrizio Pregliasco¹, Chiara Zuccarini²

¹Dipartimento di Sanità Pubblica - Virologia - Microbiologia
Università degli Studi di Milano

²UO Riabilitazione Specialistica per età evolutiva Santa Maria Bambina
Fondazione Istituto Sacra Famiglia
ONLUS - Cesano Boscone (MI)

Key words:

probiotic*
immunomodulation
respiratory infection*
flu-like infection*
influenza

✉ Fabrizio Pregliasco

Dipartimento di Sanità Pubblica -
Virologia - Microbiologia
Università degli Studi di Milano
Via C. Pascal, 36
20133 Milano

Le superfici mucose dell'albero respiratorio, dell'apparato urinario e del digerente sono a diretto contatto con l'ambiente esterno e, fra le varie funzioni, devono assolvere quella prioritaria di barriera contro l'ingresso di microrganismi esterni potenzialmente patogeni. Alla nascita tali superfici sono virtualmente sterili e nelle ore immediatamente successive esse iniziano ad essere colonizzate dai microrganismi presenti nell'ambiente esterno o introdotti con l'allattamento. A partire da questo momento si stabilisce fra la flora colonizzatrice e l'ospite un rapporto simbiotico di mutuo vantaggio, frutto della selezione evolutiva, sicché alcuni microrganismi diventano prevalenti ri-

spetto ad altri, fino a raggiungere un delicato equilibrio fra le varie specie commensali e fra queste e l'ospite, equilibrio da cui dipende lo stato di salute di quest'ultimo^{1,2}.

In che cosa consiste esattamente il mutuo vantaggio fra ospite e flora colonizzatrice? La prima è avvantaggiata nella competizione con altre specie e ne viene garantita la sopravvivenza grazie ad una forma di tolleranza immunitaria; per contro l'ospite utilizza la microflora intestinale (MI) e, in misura minore quella respiratoria ed urinaria, come sistema di difesa sia diretta (competizione interspecie) sia indiretta (attivazione immunitaria) nei confronti di microrganismi in ingresso (batteri, virus e miceti) potenzialmente patogeni^{3,4}.

La mucosa intestinale è sicuramente quella maggiormente coinvolta in questo rapporto di simbiosi e, in virtù della sua estensione e dell'imponente massa di batteri da cui è colonizzata (oltre 40 generi con più di 200 specie presenti per un ammontare complessivo pari a circa 100.000 miliardi di unità colonizzanti), assume un ruolo rilevante nella risposta immune (fisiologica ed alterata) sia nell'adulto sia, soprattutto, nel bambino⁵⁻⁸. Molte di queste specie batteriche sono state isolate e tipizzate e sono oggi variamente impiegate, o come additivi per migliorare le proprietà di alcuni alimenti (*functional foods*), per esempio il latte per neonati, o come preparati liofilizzati con una o più specie presenti in quantità adeguate e con ben precisi rapporti quantitativi⁹. Queste ultime preparazioni sono classificate come *probiotici*.

I probiotici

Con il termine generico di probiotici si indicano "microrganismi vitali che, somministrati in quantità adeguate, conferiscono all'ospite effetti benefici"¹⁰. I batteri più frequentemente impiegati come probiotici negli studi sperimentali e clinici sono alcune specie appartenenti al genere *Bifidobacteria* (particolarmente *B. lactis*, *B. bifidum*), alcuni ceppi di *Lactobacillus* (particolarmente *L. casei*, *L. paracasei*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*), alcuni ceppi di *Streptococcus* e la muffa *Saccharomyces boulardii*. E' interessante rilevare che se tutti i probiotici presentano la capacità di indurre una certa risposta immunitaria, le caratteristiche di tale risposta sono

in ampia misura correlate al probiotico o alla miscela di probiotici utilizzata: per esempio alcune specie inducono una risposta prevalentemente anti-infiammatoria, altre inducono una risposta di segno opposto, altre ancora risposte di tipo prevalentemente antimicrobico^{11,12}.

Probiotici e sistema immunitario

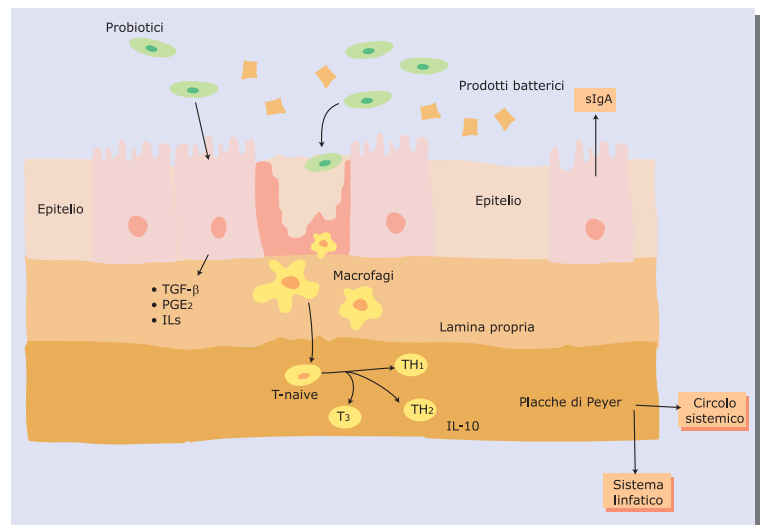
Le modalità attraverso cui i probiotici regolano il sistema immunitario, sia a livello locale che sistemico, sono state oggetto di studi numerosi ed approfonditi con l'utilizzo di vari modelli sperimentali, ed oggi molti dei meccanismi di cross-talking fra probiotici e sistema immunitario dell'ospite sono stati delucidati^{13,14}. Benché alcuni tasselli del puzzle non siano ancora stati posizionati, i rapporti fra probiotici e sistema immunitario possono essere schematizzati secondo il disegno di figura 1. La stimolazione del sistema immunitario è mediata sia dalle cellule epiteliali che dalle

cellule M nelle placche di Peyer da cui maturano le cellule dendritiche: si noti sia la produzione di Iga secretorie (sIgA) sia il rilascio di citochine dai linfociti T, "indirizzabili" prevalentemente verso i cloni TH1 o TH2 in relazione al composto utilizzato.

E' possibile "manipolare" la flora batterica intestinale a vantaggio dell'ospite?

La figura 1 suggerisce la possibilità di stimolare il sistema immunitario accentuando, per esempio, una risposta di tipo immunosoppressivo se si induce polarizzazione dei linfociti T verso il clone TH1, o al contrario una risposta di tipo immunostimolante se si induce espansione del clone TH2. Questa opportunità, che ha grande valenza clinica, è stata confermata da studi sperimentali che hanno dimostrato che l'utilizzo di miscele di probiotici, in rapporti quantitativi ben precisi fra i vari ceppi o le varie specie presenti, consente di indurre prevalentemente

Figura 1. Schematizzazione delle interazioni fra probiotici e mucosa intestinale.



te l'una o l'altra risposta. In un recente studio di Castellazzi e associati è stato dimostrato che due ceppi appartenenti alla specie *Lactobacillus* (*L. salivarius* I1794 ed *L. paracasei* I1688) esprimono una "specifica" attività immunomodulante su cellule mononucleate di sangue periferico inducendo il rilascio di talune citochine piuttosto che di altre¹¹.

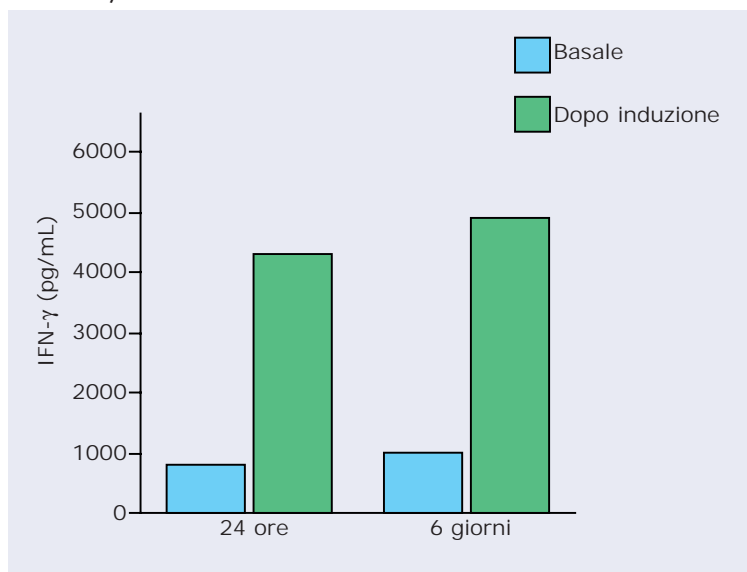
Attività anti-infiammatoria

Questa caratteristica spiega la capacità di diversi probiotici, singolarmente o in opportune miscele, di agire positivamente su un grande numero di condizioni cliniche caratterizzate da eziopatogenesi apparentemente opposta: da quelle con prevalente esaltazione della componente infiammatoria ed allergica (dermatite atopica, allergie alimentari, malattia infiammatoria cronica intestinale), a quelle caratterizzate da pigrizia immunitaria (ridotta risposta anticorpale dopo vaccinazione, infezioni croniche o recidivanti, predisposizione alle enterocoliti virali o batteriche, etc)¹⁵⁻²¹. Un esempio tipico di azione anti-infiammatoria viene da *Lactobacillus plantarum* che, in diversi studi, ha mostrato la capacità di indurre il rilascio di citochine anti-infiammatorie, prevalentemente IL-10, da parte di macrofagi e linfociti T della mucosa intestinale e ne è quindi stato proposto l'utilizzo nel trattamento della Inflammatory Bowel Disease (IBD)²².

Attività immunostimolante

In modo analogo è possibile indurre una risposta di tipo immunostimolata sia sulla componente linfocitaria di tipo B (incremento dell'immunità umorale) e T (incremento

Figura 2. Produzione di IFN- γ da parte di cellule mononucleate di sangue umano dopo stimolazione precoce (24 ore) con un probiotico a base di *L. plantarum* +*L. paracasei*+*L. salivarius* e stessa misura compiuta dopo stimolazione protratta (6 giorni). (Dati da Malfa P et al 2009²⁵).



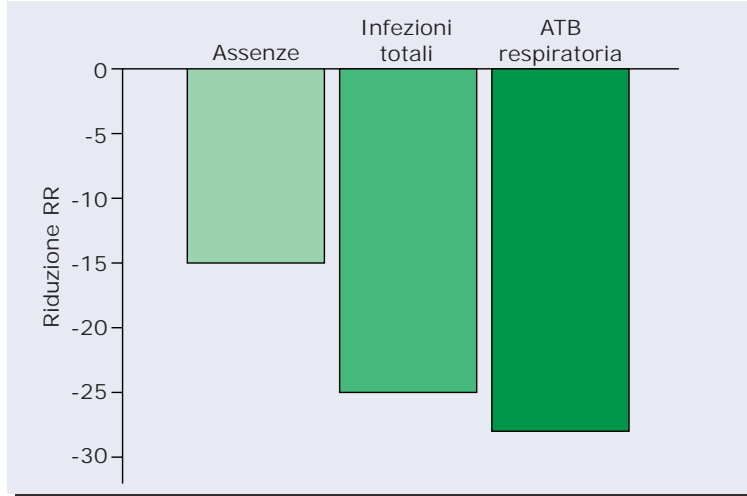
to dell'immunità cellulo-mediata) sia sulla componente fagocitaria, in particolare su cellule polimorfonucleate^{23,24}. La possibilità di indurre risposte di questo tipo è utile in circostanze cliniche ben precise, per esempio quando si voglia fare un ciclo di 4-6 mesi di immunoprofilassi delle infezioni delle alte vie respiratorie prima della stagione invernale, o in aggiunta alla vaccinazione anti-influenzale per aumentare la risposta anticorpale al vaccino o, più in generale, per aumentare la vigilanza immunitaria aspecifica verso patogeni di varia natura^{12,26}. In un recente studio sono state valutate le proprietà immunofavorevoli di una miscela di tre ceppi probiotici (*L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688 e *L. salivarius* I1794) in rapporto 200:4,9:0,1 su colture cellulari di linfociti umani eseguendo il dosaggio di IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α sia dopo stimolazione

acuta (24 ore) che protratta (6 giorni)²⁵. In figura 2 sono riportati i dati relativi all'induzione di IFN- γ , una citochina notoriamente coinvolta nei processi di *alerting* immunitario, particolarmente attraverso la risposta cellulo-mediata, e le cui concentrazioni sono risultate significativamente aumentate dopo stimolazione con la miscela di probiotici summenzionata. L'azione dell'IFN- γ si esplica nell'attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC), nell'aumento dell'attività lisosomiale dei macrofagi e nell'incremento dell'attività dei linfociti NK^{27,28}.

Probiotici e malattie influenzali nel bambino: i dati clinici

Le malattie influenzali in età pediatrica, e le relative complicanze a carico delle alte e basse vie respiratorie, sono un problema sanitario e sociale

Figura 3. Rischio relativo (RR) di assenze, cicli di antibioticoterapia (ATB) respiratoria ed infezioni respiratorie totali nei supplementati rispetto ai controlli. (Dati da Hatakka K 2001³⁰).



rilevante con costi al 1991 compresi fra 650 e 2.300 sterline/anno/bambino a causa delle terapie e delle assenze lavorative dei familiari²⁹. Le dimensioni del problema sono correlate sia alla maggior suscettibilità alle infezioni nei primi anni di vita, sia all'elevata contagiosità dei virus respiratori negli asili e nelle scuole primarie. Ciò spiega la ragione per cui sin dai primi anni '90 si sono tentate procedure di stimolazione immunitaria aspecifica e di semplice applicabilità in età prescolare e scolare²³.

Il primo studio di profilassi a lungo termine in bambini di età compresa fra 1 e 6 anni che frequentavano asili pubblici è stato pubblicato nel 2001³⁰. In questo trial in doppio cieco, placebo-controllato, 296 bambini che assumevano un latte arricchito con un probiotico (*L. rhamnosus* 5-10x10⁵ CFU/mL) sono stati comparati a 298 bambini di controllo ai fini dei tassi infettivi e delle relative complicanze per un periodo di 7 mesi. In figura 3

sono riportati i risultati più importanti registrati al termine del follow-up.

E' interessante notare che benché non tutti i risultati dello studio abbiano raggiunto significatività statistica, il trend è stato particolarmente favorevole al gruppo in supplementazione. Questo trial è tuttavia interessante anche per un altro aspetto: i benefici registrati sono stati ottenuti con un solo lattobacillo aggiunto al latte, che però contiene già una certa quantità di questo batterio, peraltro assunto anche con altre componenti della dieta tipica del bambino, sicché il gruppo di "controllo" era in una certa misura avvantaggiato. In questo trial non fu registrata una riduzione consistente dei casi di diarrea acuta durante gli episodi infettivi, un dato che contrasta con i risultati di altri studi. In un trial immediatamente precedente, la supplementazione con *Lactobacillus casei* (10⁸ CFU/mL) aveva infatti ridotto gli episodi di diarrea infettiva in bambini di età

compresa fra 6 e 24 mesi (15.9% vs 22.0%; $p=0.03$), risultati confermati in un successivo trial condotto in bambini da 4 a 12 mesi, nei quali l'uso di un latte arricchito con *Lactobacillus reuteri* e *Bifidobacterium lactis* ridusse significativamente sia gli episodi febbrili ($p < 0.01$) che numero e durata degli episodi di diarrea acuta ($p < 0.01$)^{21,31}. Nei bambini di età inferiore ai 2-3 anni i benefici dei probiotici sugli episodi di diarrea infettiva (Rotavirus?) sembrano quindi essere nettamente più pronunciati rispetto alle fasce di età maggiori, e ciò potrebbe essere associato ad un viraggio della flora intestinale dopo lo svezzamento.

Questi dati, presi complessivamente, sono stati confermati da un recente trial di grandi dimensioni e lunga durata su una popolazione di 326 bambini (3-5 anni) randomizzati in 3 gruppi: 104 bambini furono assegnati al placebo, 110 alla supplementazione con *L. acidophilus* e 112 alla supplementazione con una combinazione di due probiotici (*L. acidophilus/Bifidobacterium animalis* subspecie *lactis*) per la durata di 6 mesi durante il periodo invernale³². Obiettivi dello studio erano valutare l'incidenza degli episodi influenzali o simil-influenzali e la durata dei sintomi ad essi correlati (febbre, tosse, rinorrea), nonché la necessità di terapie antibiotiche (ATB) per le complicanze batteriche. I risultati sono riassunti in tabella 1.

Poiché lo studio ha consentito una comparazione dell'associazione verso placebo, ma anche della somministrazione singola (*L. acidophilus*) vs placebo, è stato possibile calcola-

Tabella 1. Effetti della supplementazione con probiotici: follow-up a 6 mesi dagli episodi influenzali ed end-point correlati. Il rischio relativo (RR) e la significatività sono stati calcolati dopo aggiustamento per età; il valore di RR e la significatività si riferiscono ai valori ottenuti con la supplementazione combinata (LA/BB) vs placebo. (Dati da Leyer GJ 2009³²).

End-point	Frequenza (%)			Riduzione RR (%)
	PLA (n=104)	LA (n=110)	LA/BB (n=1112)	
Episodi*	2.28	1.30	0.76	45 (p<0.01)
Febbre	63.5	28.2	16.1	66 (p<0.01)
Tosse	83.7	46.4	29.5	56 (p<0.005)
Rinorrea	81.7	55.5	31.3	48 (p<0.04)
ATB	54.8	16.4	8.0	77 (p=0.77)
Assenze	49.0	18.0	18.0	63 (p<0.02)

PLA=Placebo; LA=L. *acidophilus*; LA/BB=L. *acidophilus*/Bifidobacterium *animalis*; RR=Rischio Relativo

re per sottrazione i vantaggi conferiti dai due ceppi presi singolarmente, rilevando che ai fini degli end-point in questione l'efficacia dei lattobacilli è stata di gran lunga maggiore rispetto a quella dei bifidobatteri.

Prospettive future e considerazioni finali

Sulla base dei dati clinici e sperimentali sin qui riportati, e dei numerosi omessi poiché non attinenti all'oggetto di questa rassegna, si può ragionevolmente ipotizzare che la supplementazione con probiotici nei 4-6 mesi prime della stagione influenzale costituisca un'opportunità nella nutrizione dei bambini, soprattutto quelli che non abbiano beneficiato dell'allattamento al seno per un congruo periodo, avendo numerosi studi dimostrato quanto l'allattamento materno nei primi 6 mesi sia cruciale ai fini di una corretta "maturazione" del sistema immunitario neonatale^{33,34}. Tali effetti si riverberano sia sullo sviluppo di una microflora intestinale più efficiente nei confronti di pa-

togeni esterni, sia sui fenomeni di disregolazione immunitaria (atopia, intolleranze, allergie, etc)³³⁻³⁶.

Il problema della maturazione immunitaria non avrebbe la rilevanza che negli ultimi decenni essa ha acquisito se i bambini in età prescolare, e sempre più spesso anche i neonati, non fossero esposti ad elevato rischio di contagio delle infezioni respiratorie ed intestinali negli asili. Questa popolazione è evidentemente esposta ad una grande varietà di patogeni senza essere totalmente pronta sotto il profilo immunitario ed è quella che probabilmente *si avvantaggerebbe più di altre della assunzione protratta e ciclica di probiotici*. Se la protezione debba essere garantita a queste fasce in modo indiscriminato, per esempio attraverso l'uso di alimenti "fortificati", i cosiddetti *functional foods*, o se invece debba avvenire in modo "mirato", con supplementi specifici e selezionando solo i neonati/bambini a maggior rischio, rimane oggetto di valutazione ed è aspetto direttamente associato alle politiche sanitarie decise dai vari Paesi.

E' infine interessante notare che esiste un'altra fascia di popolazione nella quale i probiotici si dimostrano efficaci nella profilassi anti-influenzale, ed è quella degli over 65, che costituiscono una quota crescente della popolazione occidentale. In questi soggetti numerosi studi, incluso quello condotto recentemente dal nostro gruppo, hanno dimostrato che la supplementazione con probiotici induce un aumento del titolo anticorpale dopo vaccinazione influenzale, incremento che spesso si è tradotto in una minor incidenza di episodi influenzali e simil-influenzali al netto della profilassi vaccinale^{7,15,16,26,34,37}. In questi soggetti si potrebbe ipotizzare che la supplementazione con probiotici si comporti da *booster* per un sistema immunitario meno reattivo a causa dell'età avanzata: in uno studio di De Vrese e collaboratori la supplementazione con tre probiotici, per tre mesi, in 479 adulti (18-67 anni), ha sensibilmente ridotto il numero, la durata e la gravità (giorni con febbre) degli episodi influenzali, suggerendo che i benefi-

ci della stimolazione immunitaria siano presenti e di ampie dimensioni, indipendentemente dall'età¹³.

Allo stato delle conoscenze si può quindi affermare che i probiotici esplichino nume-

rose azioni benefiche in tutte le fasce di età, *in particolare ai due estremi, e che l'azione congiunta di più specie batteriche sembra conferire benefici maggiori rispetto ad una singola specie*. Rimangono da in-

dividuare con adeguati screening microbiologici le specie più interessanti, verificando per ciascuna di esse la presenza di effetti peculiari e/o particolarmente desiderabili sotto il profilo clinico³⁸. **TiM**

Bibliografia

1. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, *et al.* Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009; 44:26-46.
2. Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Hudcovic T, *et al.* Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2004; 93:97-108.
3. Cortesi B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 2007; 137:781S-790S.
4. Herik RLevkut M. Lactic acid bacteria probiotics and immune system. *Vet Med* 2002; 169:180.
5. Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:501-506.
6. Rastall RA. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr* 2004; 134(8 Suppl):2022S-2026S.
7. Pregliasco F, Anselmi G, Fonte L, *et al.* A new chance of preventing winter diseases by the administration of symbiotic formulations. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42 (Suppl 3 Pt 2):S224-S233.
8. Savage DC. Mucosal microbiota. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME (Editors). *Mucosal Immunology*. Academic Press 1998. San Diego USA, pages 216-238.
9. Gilliland SE, Morelli L, Reid G. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization; 2001. Available at: ftp://ftp.fao.org/esn/food/probio_report_en.pdf. Accessed December 18, 2009.
10. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001.
11. Castellazzi AM Valsecchi C, Montagna L, *et al.* In vitro activation of mononuclear cells by two probiotics: *Lactobacillus paracasei* I 1688, *Lactobacillus salivarius* I 1794 and their mixture (PSMIX). *Immunol Invest* 2007; 36:413-421.
12. de Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, *et al.* Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *Bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clin Nutr* 2005; 24:481-491.
13. Heller F, Duchmann R. Intestinal flora and mucosal immune responses. *Int J Med Microbiol* 2003; 293:77-86.
14. Foligne B, Zoumpoulou G, Dewulf J, *et al.* A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS ONE* 2007; 2:e313.
15. Gill HS, Darragh AJ, Cross ML. Optimizing immunity and gut function in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2001; 5:80-91.
16. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, *et al.* Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:833-839.
17. Isolauri E, Rautava S, Kalliomaki M, *et al.* Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2:263-271.
18. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, *et al.* Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (2 Suppl):444S-450S.
19. Kajander K, Hatakka K, Pousa T, *et al.* A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22:387-394.
20. Kim HJ, Vazquez Roque MI, Camilleri M, *et al.* A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL# 3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17:687-696.
21. Pedone CA, Arnaud CC, Poistaire ER, *et al.* Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract* 2000; 54:568-571.
22. Pathmakanthan S, Li CK, Cowie J, *et al.* *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19:166-173.
23. Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potenziale pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002; 15:1-9.
24. Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17:204-210.
25. Malfa P, Valsecchi C, Montagna L, *et al.* In vitro evaluation of immunomodulating activity of a food supplement containing three probiotics: *L. plantarum* P17630, *L. paracasei* I1688, *L. salivarius* I1794. *Trends Med* 2010; 10:43-49.

26. Gill HS, Cross ML, Rutherford KJ, *et al.* Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly. *Br J Biomed Sci* 2001;58: 94-6.
27. He XS, Draghi M, Mahmood K, *et al.* T cell-dependent production of IFN-gamma by NK cells in response to influenza A virus. *J Clin Invest* 2004; 114:1812-1819.
28. Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, *et al.* Compromised interferon gamma (IFN-gamma) production in the elderly to both acute and latent viral antigen stimulation: contribution to the immune risk phenotype? *Eur Cytokine Netw* 2002; 13:392-394.
29. Nurmi T, Salminen E, Ponka A. Infections and other illness of children in day-care centres in Helsinki.II: the economic losses. *Infection* 1991; 19:331-335.
30. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, *et al.* Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 2001; 322:1327-1329.
31. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 2005; 115:5-9.
32. Leyer GJ, Shuguang Li, Mubasher ME, *et al.* Probiotic effect on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. *Pediatrics* 2009; 124:e172-e179.
33. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal intestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:1035s-1045s.
34. Martin R, Langa S, Reviriego C, *et al.* Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003; 143:754-758.
35. Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. New therapeutic strategy for combating the increasing burden of allergic disease: probiotics: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group report. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:31-37.
36. Shi HN, Walker WA. Bacterial colonization in the developing gastrointestinal tract: role in the pathogenesis of intestinal diseases. *Biosci Microflora* 2004; 23:55-65.
37. Boge T, Remigy M, Vaudine S, *et al.* A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomized controlled trials. *Vaccine* 2009; 27:5677-5684.
38. Mercenier, A, Pavan S, Pot B. Probiotics as biotherapeutic agents. Present knowledge and future prospects. *Curr Phar Des* 2003; 9:175-191.

