

ESPECIES DE *LACTOBACILLUS* POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS

aisladas de cavidad bucal
de niños nacidos por parto natural

*Species of lactobacillus potentially probiotics isolated
from oral cavity of children born by natural childbirth*

POR

DAYLET **R HERNÁNDEZ**¹

GÉNESIS **D P CABEZAS**¹

L JOSÉ MANUEL **JIMÉNEZ MEDINA**²

YASMIN YINEC **VARELA RANGEL**²

ELAYSA JOSEFINA **SALAS OSORIO**³

CARLOS ARTURO **MARTÍNEZ AMAYA**³

¹ Licenciada en Bioanálisis.

² Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas "Prof. Celina Araujo de Pérez", Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

³ Cátedra de Patología Clínica. Cátedra de Terapéutica Estomatológica. Grupo de Investigaciones Biopatológicas GIBFO. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Autor de correspondencia: Elaysa Salas Osorio. Calle 23 entre avenidas 2 y 3, Edificio La Casona, Facultad de Odontología, Departamento de Biopatología, Cátedra de Microbiología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Teléfono: 0274-2402381, fax: 0274-2402383, 0414-0757272.

elaysalas72@gmail.com

Resumen

Actualmente se reconoce la transmisión vertical de la microbiota habitual de la madre al hijo durante la gestación; sin embargo, desde tiempos remotos se aceptó que durante el paso por el canal de parto el feto tenía su primer contacto microbiológico y era inoculado con la microbiota vaginal de la madre. Dentro del universo microbiano vaginal coexisten cerca de 300 especies de bacterias, siendo *Lactobacillus* el género predominante, por el cual cumplen funciones protectoras probióticas. El objetivo del presente trabajo fue comprobar la presencia de *Lactobacillus* spp. en muestras bucales de 17 neonatos nacidos por parto natural en la Unidad de Ginecología-Obstetricia del Hospital Sor Juana Inés de la Cruz Mérida-Venezuela durante el tercer trimestre del año 2015. Previo consentimiento de los representantes legales y el aval de la Directiva del Hospital se recolectó por hisopado una muestra de los carrillos, encías y piso de la boca, se inoculó en caldo MRS e incubó a 37 °C durante 48 horas en microaerobiosis. Posteriormente se efectuó el aislamiento en agar MRS bajo las mismas condiciones de incubación. Se seleccionaron macroscópicamente colonias típicas, se evaluaron las características microscópicas, así como las pruebas preliminares para el género *Lactobacillus* obteniéndose 49 aislados. Se seleccionaron 6 aislados para la identificación bioquímica resultando 2 *Lactobacillus acidophilus*, 1 *Lactobacillus plantarum*, 2 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* y 1 *Lactobacillus fermentum* especies ampliamente reconocidas como probióticas. Los hallazgos obtenidos demuestran la presencia de Lactobacilos en la cavidad bucal de neonatos y contribuyen a los estudios relacionados con transmisión vertical madre hijo.

PALABRAS CLAVE (DECS): Recién Nacido; *Lactobacillus*; Parto Normal; Transmisión Vertical de Enfermedad Infecciosa; Boca.

Abstract

Recently, the vertical transmission of the usual microbiota from mother to child during pregnancy has been established. However, since ancient times it has been accepted that during the passage through the birth canal the fetus had its first microbiological contact and was inoculated with the vaginal microbiota of the mother. Within the vaginal microbial universe coexist about 300 species of bacteria, *Lactobacillus* being the predominant genus, which performs protective probiotic functions. The objective of the present research consisted in verifying the presence of *Lactobacillus* spp. in oral samples of 17 neonates born by natural birth in the Gynecology-Obstetrics Unit of Hospital Sor Juana Ines de la Cruz, Merida-Venezuela during the third quarter of 2015. Prior consent of the parents and endorsement of the Hospital Directive, the sample was collected by swab of the cheeks, gums and floor of the mouth, inoculated in MRS broth and incubated at 37 °C for 48 hours in microaerobiosis. Subsequently, isolation was carried out on MRS agar under the same incubation conditions. Typical colonies were selected macroscopically, microscopic characteristics were evaluated, as well as preliminary tests for the genus *Lactobacillus*, obtaining 49 isolates. Six isolates were selected by biochemical identification resulting in 2 *Lactobacillus acidophilus*, 1 *Lactobacillus plantarum*, 2 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and 1 *Lactobacillus fermentum* species widely recognized as probiotics. The findings obtained demonstrate the presence of *Lactobacilli* in the neonatal oral cavity and contribute to studies related to vertical transmission mother-child.

KEY WORDS (MESH): Infant, Newborn; *Lactobacillus*; Natural Childbirth; Infectious Disease Transmission, Vertical; Mouth.

Introducción

A comienzos del siglo XX, el pediatra francés Henry Tissier afirmó que los bebés humanos se desarrollan dentro de un ambiente estéril y adquieren su inóculo bacteriano inicial mientras viajan a través del canal de parto materno¹. Más de un siglo después, la hipótesis del útero estéril sigue siendo un dogma, ya que se supone que cualquier presencia bacteriana en el útero es peligrosa para el bebé. Sin embargo, estudios recientes reconocen la presencia de una transmisión materna como un mecanismo de transmisión simbiótica antiguo y evolutivamente ventajoso. Por lo tanto, ya no podemos ignorar el hecho de que la exposición a los microorganismos en el útero es probable e incluso puede ser una parte universal del embarazo humano, que sirve como la primera inoculación de microorganismos beneficiosos antes del nacimiento^{1,2,3} que se complementa con microorganismos maternos durante el parto⁴ y la lactancia materna^{5,6}.

Basados en la evidencia científica descrita, la transmisión materna externa involucra cualquier transferencia de microorganismos maternos a la descendencia durante o después del nacimiento. Es decir, los bebés humanos son inoculados con microorganismos fecales y vaginales maternos cuando atraviesan el canal de parto^{7,8}. Existiendo diferencias significativas en la microbiota neonatal humana en todos los hábitats corporales (piel, bucal, nasofarínge e intestino) según el modo de parto, donde los bebés nacidos por vía vaginal adquieren microorganismos comunes en la vagina, mientras que los bebés nacidos por cesárea muestran una microbiota más similar a la de la piel humana^{4,7,9,10}.

Generalmente, la microbiota vaginal residente está conformada por *Lactobacillus* spp., siendo las especies prevalentes *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. iners*, *L. acidophilus* y *L. gasseri*, bacterias reconocidas como una línea fundamental de defensa contra patógenos potenciales¹¹. También se reportan dentro de la microbiota vaginal especies de *Bacteroides*, *Staphylococcus epidermis*, especies de *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus* y *Eubacterium*, así como otros géneros bacterianos: *Atopobium*, *Megasphaera*, *Leptotrichia* y *Mycoplasma*¹².

La comunidad microbiana vaginal cambia durante el embarazo, volviéndose menos diversa a medida que avanza el embarazo¹³. Sin embargo, a pesar de la disminución general de ciertas especies bacterianas, la comunidad vaginal de *Lactobacillus* se enriquece durante el embarazo¹³. Hacia el tercer trimestre de gestación, el conteo de *Lactobacillus* en vagina aumenta al menos 10 veces, lo cual está relacionado con un aumento de la vascularización, una mayor distensibilidad y un aumento del fluido vaginal provocado especialmente por el incremento de las hormonas (estrógenos y progesterona), además aumenta la disponibilidad de glucógeno, factor que favorece la presencia de *Lactobacillus* en las secreciones vaginales^{14,15}.

El nacimiento es el primer acontecimiento que afecta los cambios en la cavidad bucal. La colonización bucal se inicia con el paso a través del canal del parto, donde queda expuesta a la microbiota del tracto vaginal materno y solo bastan ocho horas para que se constituya la comunidad pionera, que irá variando en el tiempo de acuerdo a la interacción con el medio ambiente. La adquisición del microbiota bucal habitual sigue un desarrollo denominado sucesión ecológica, este desarrollo involucra una sucesión alogénica influida por factores no microbianos, tales como la aparición de las piezas dentales y otra autogénica, que hace referencia a los factores microbianos¹⁶.

Estudios *in vivo* e *in vitro* realizados a nivel gastrointestinal, utilizando diferentes cepas de *Lactobacillus*, han demostrado su potencial benéfico en la promoción de la salud al alterar el balance ecológico mediante la exclusión competitiva de bacterias patógenas así como múltiples mecanismos, entre los cuales se destacan: promoción de la fagocitosis; inhibición del crecimiento bacteriano; modulación local de la respuesta inmune; e inhibición competitiva. Partiendo de la premisa de que la cavidad bucal representa la primera parte del tracto gastrointestinal, existen razones para considerar que por lo menos alguno de estos mecanismos también puede acontecer en esta parte del sistema^{17,18,19}. Es por ello que, como punto de partida a nuevas investigaciones en el ámbito de los probióticos, el objetivo de esta investigación fue comprobar la presencia de *Lactobacillus* spp. en muestras bucales de neonatos por parto natural en Mérida-Venezuela.

Materiales y métodos

Se desarrolló una investigación de tipo exploratoria, cuyo grupo de estudio estuvo representado por 17 neonatos sanos, nacidos por parto natural en la Unidad de Ginecología-Obstetricia y Servicio de Sala de parto del Hospital Sor Juana Inés de la Cruz de la ciudad de Mérida, estado Mérida-Venezuela durante el tercer trimestre del año 2015. Previo a la recolección de las muestras se informó a los representantes legales del recién nacido, el propósito de la investigación, los riesgos, molestias y beneficios que implicaban su participación en la misma, se procedió a la aplicación de un consentimiento informado y el llenado de la ficha clínica garantizándoles además la confidencialidad de los datos proporcionados. Esta investigación fue realizada con el aval de la Junta Directiva del Hospital.

Para la obtención de las muestras se realizó un hisopado con movimientos de barrido de la cavidad bucal con énfasis en las encías, carrillos y piso de boca. La muestra fue inoculada en tubos de Caldo MRS medio diseñado para el aislamiento de especies de *Lactobacillus* y trasladadas al laboratorio donde fueron incubadas en microaerobiosis a 37°C durante 24 horas. Siguiendo la metodología propuesta por Moreno et al, 2011¹⁸, con los cultivos obtenidos

se realizaron aislamientos en Agar MRS utilizando la técnica de agotamiento en cuatro cuadrantes, las placas se incubaron en microaerobiosis a 37°C por 48 horas. A partir de las placas de agar MRS, se seleccionaron todas aquellas colonias que reunían las características macroscópicas propias del género *Lactobacillus* y se realizó la identificación preliminar haciendo uso de las características morfológicas microscópicas y bioquímicas diferenciales, tales como Gram, movilidad, crecimiento a 15°C y 45°C, producción de amoníaco a partir de la arginina y producción de gas a partir de la glucosa^{19,20}. Los aislados obtenidos fueron conservados a -7°C en agar MRS utilizando glicerol como crioprotector. Por último, se seleccionaron al azar seis aislados para ser identificados hasta especie mediante el uso del Sistema de identificación bioquímica API 50; combinación de las galerías API 50CH diseñadas para la realización de pruebas de metabolismo de carbohidratos; el medio API 50CHL específico para la identificación de lactobacilos, y el programa Api web versión 5.0, de la casa comercial BioMerieux, Marcy-l'étoile, France^{21,2}. Los aislados obtenidos forman parte del cepario la Unidad de probióticos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, desde donde se desarrollarán las investigaciones pertinentes para la determinación del potencial probiótico. Para el análisis estadístico se utilizó estadística descriptiva mediante el cálculo de valores absolutos y porcentajes.

Resultados

Se recolectaron un total de 17 muestras de la cavidad bucal de 17 neonatos nacidos por parto natural de madres cuya edad promedio fue $24,05 \pm 7,31$ años y 38,5 semanas de gestación. Con respecto a los neonatos, se observó predominio del género femenino (52,95 %). Del análisis microbiológico en agar MRS, se obtuvieron 13 (76,47 %) cultivos positivos en agar MRS. Tomando en cuenta las características macroscópicas descritas para el género se seleccionaron 67 aislados de los cuales al realizar la tinción de Gram solo 49 presentaron morfología celular bacilar o cocobacilar Gram positivos y la prueba de catalasa fue negativa. El resto de los aislados (18) fueron descartados al observar la presencia de cocos Gram positivos dispuestos tanto en cadenas como en racimos, así como una prueba de la catalasa positiva.

Al continuar con la identificación no se observó movilidad y presentaron crecimiento al ser incubados tanto a 15°C como a 45°C. Se evidenció la producción de gas a partir de la glucosa en 17 aislados ubicándolos como lactobacilos heterofermentativos, mientras que 32 aislados no mostraron acumulación de gas en el tubo de Durham clasificándolos como homofermentativos. No se logró obtener resultados concluyentes al aplicar la prueba de producción de amoníaco a partir de la arginina.

Se seleccionaron al azar 6 aislados a razón de 3 homofermentativos y 3 heterofermentativos, identificándose: 2 especies de *Lactobacillus acidophilus*, 2 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, una cepa de *Lactobacillus plantarum* y una cepa de *Lactobacillus fermentum* (TABLA 1) con porcentajes de correspondencia de identificación altos y un promedio de dos pruebas en contra, lo que indica que los resultados obtenidos al aplicar el sistema de identificación galerías API 50 se correlacionaron con la base de datos API Lab Web.

TABLA 1.

Identificación fenotípica y bioquímica de aislados obtenidos a partir de la cavidad bucal de neonatos

AISLADO	TIPO DE FERMENTACIÓN	IDENTIFICACIÓN	% DE IDENTIFICACIÓN
LN005	Homofermentativo	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	98,1
LN011	Homofermentativo	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1	98,3
LN012	Homofermentativo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
LN021	Heterofermentativo	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	97,3
LN030	Heterofermentativo	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	97,1
LN041	Heterofermentativo	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99,5

Discusión

La transmisión materna de microorganismos beneficiosos en humanos tiene una amplia relevancia para la salud. La evolución con estos microorganismos ha dado lugar a nuestra dependencia de ellos para la maduración y el desarrollo adecuado del sistema inmune y del tracto gastrointestinal. En el presente trabajo se logró demostrar la presencia de lactobacilos en la cavidad bucal del 76,47% de los neonatos inmediatamente después del alumbramiento. Para la fecha, se dispone de pocos estudios que investiguen la presencia de *Lactobacillus spp.* en la cavidad bucal neonatal. La mayoría de las investigaciones en neonatos se han desarrollado en heces^{5,6,18,23} y en aras de demostrar la transmisión vertical, en fluido vaginal de mujeres sanas y mujeres en el tercer trimestre de gestación^{24,25}, con resultados positivos al identificar diferentes especies de *Lactobacillus* tales como: *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *L. crispatus* entre otros.

Hasta hace unos 10-15 años, la identificación de *Lactobacillus* se hacía analizando propiedades fisiológicas, por ejemplo la capacidad de utilizar diversos azúcares. En esas condiciones, las especies vaginales más abundantes eran *L. acidophilus* y *L. fermentum* y pudieran aparecer con alguna frecuencia lactobacilos ambientales y colonizadores del tracto digestivo como *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. plantarum*²⁶. A pesar de ser un método de identificación que ha entrado en desuso y pese a las dificultades económicas que no per-

mitieron la identificación de la totalidad de los aislados obtenidos, mediante el sistema de identificación bioquímica API 50CH, se logró la identificación de dos cepas de *L. acidophilus* y una cepa de *L. fermentum*, especies que han sido aisladas de fluido vaginal de mujeres sanas²⁴. Además de dos cepas de *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 2 y *L. plantarum* ampliamente reconocidas como microbiota habitual del tracto gastrointestinal, que también se han encontrado en meconio¹⁸. Lo antes expuesto permite afirmar que el primer contacto microbiológico bucal ocurre en el momento que el niño atraviesa el canal de parto, hecho que se ratifica con los estudios previos que evidencian la presencia de especies de lactobacilos colonizando diferentes áreas anatómicas del ser humano, tales como vagina y tracto gastrointestinal.

Cabe destacar que la presencia de lactobacilos en la cavidad bucal de los neonatos está relacionada con un proceso fisiológico natural de inoculación y paso hacia el tracto gastrointestinal, y no al establecimiento de dicha microbiota en esa área anatómica. Estudios previos demuestran que el conteo de lactobacilos es inversamente proporcional a los días de vida del niño, hecho que puede ser atribuido a la carencia de mecanismos de adhesión que le permitan a lactobacilos colonizar las mucosas bucales²⁷.

Todavía se desconoce el modo de acción que ejercen los lactobacilos en la cavidad bucal, sin embargo se supone que pueden actuar o bien por competitividad por los nutrientes y sitios de adhesión de *S. mutans* o bien por coagregación cambiando la composición de las biopelícula previniendo la caries y enfermedades periodontales. También podrían actuar produciendo metabolitos como amonio y peróxido de hidrógeno para eliminar patógenos. Las enzimas producidas por algunos Lactobacilos como *L. brevis*, que produce arginina desaminasa, previene la formación de nitrito en pacientes con periodontitis. Así como la secreción de citoquinas proinflamatorias que provoca una estimulación de la inmunidad innata produciendo IgA y estimulando la fagocitosis^{28,29}.

Sus aplicaciones en la cavidad bucal pueden verse en patologías como caries dental donde se ha demostrado que *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *streptococci* en tabletas de chicle reducen la placa bacteriana causando una disminución de la gingivitis y que la ingesta de *Lactobacillus rhamnosus* GG en la leche durante períodos definidos reduce el número de caries³⁰. En la periodontitis, se ha intentado demostrar su uso como tratamiento coadyuvante, en el control de la biopelícula y por ende, la disminución del número de patógenos³¹. En el tratamiento de la halitosis, se ha estudiado la acción de *L. salivarius* WB21 administrado bajo la forma farmacéutica de tabletas efervescentes con xilitol durante 4 semanas obteniendo la reducción de la cantidad de componentes volátiles sulfurados. La candidiasis bucal es causada por una invasión de *Candida albicans* en pacien-

tes de edad avanzada o inmunodeprimidos, en este caso, se ha hecho uso de alimentos funcionales tales como queso suplementado con *L. rhamnosus* GG y *Propionibacterium fredenreichii* durante 6 semanas demostrándose una reducción significativa de *C. albicans* y Yogurt probiótico Yakult LB (*L. casei* y *B. brevis*) observando la reducción de los contajes de *C. albicans*²⁹.

Estudios recientes también han proporcionado una mayor comprensión de cómo la composición de la microbiota de un individuo cambia a lo largo del desarrollo, especialmente durante el primer año de vida^{32,33}. A pesar de que los resultados obtenidos no son estadísticamente representativos, contribuyen a afianzar los estudios relacionados con la transmisión vertical de los microorganismos benéficos desde la madre hacia el hijo.

Conclusión

Se comprobó la presencia de especies de lactobacilos en la cavidad bucal de neonatos con la identificación bioquímica hasta especie de 6 cepas, hallazgos que contribuyen a afianzar los estudios relacionados con la transmisión vertical de los microorganismos benéficos desde la madre hacia el hijo.

Referencias

- 1 Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLoS Biol.* 2013; 11(8): 1-9. e1001631.
- 2 Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG.* 2002; 109(5): 527-533.
- 3 Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 2008; 159(3): 187-193.
- 4 Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(26): 11971-11975.
- 5 Gronlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37(12): 1764-1772.
- 6 Martín V, Maldonado A, Moles L, Rodríguez M, Campo RD, Fernández L, et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact.* 2012; 28(1): 36-44.
- 7 Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38(4): 634-642.
- 8 Huh SY, Rifas SL, Zera CA, Edwards JW, Oken E, Weiss ST, et al. Delivery by caesarean section and risk of obesity in preschool age children: a prospective cohort study. *Arch Dis Child.* 2012; 97(7): 610-616.
- 9 Li Y, Caufield PW, Dasanayake AP, Wiener HW, Vermund SH. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. *J Dent Res.* 2005; 84(9): 806-811.
- 10 Biasucci G, Benenati B, Morelli L, Bessi E, Boehm G. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr.* 2008; 138(9): 1796S-1800S.

- 11 Begier EM, Barrett NL, Mshar PA, Johnson DG, Hadler JL, Connecticut Bioterrorism Field Epidemiology Response Team. Grampositive rod surveillance for early anthrax detection. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(9): 1483-1486.
- 12 Male D, Brostoff J, Broth , Roitt I. *Inmunología*. 7ma ed. España: Elsevier; 2007.
- 13 Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 2012; 7(6): 1-15.
- 14 Ferreres I. El pH vaginal en el embarazo. *Matronas prof*. 2008; 9(4), 18-20.
- 15 Alves D, Cassamassimo M, Guimarães M, Garcia C. Alteración de la flora vaginal en gestantes de bajo riesgo atendidas en servicio público de salud: prevalencia y asociación a la sintomatología y hallazgos del examen ginecológico. *Rev Latino-Am Enfermagem*. 2010; 18(5): 1-9.
- 16 Negroni M. *Microbiología Estomatológica: Fundamentos y Guía práctica*. 2a ed. Buenos Aires- Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009.
- 17 Manzanares W, Alonso M, Biestro A. Probióticos, Prebióticos y Simbióticos en pacientes críticos. *Rev Bras Nutr Clin*. 2006; 21(2):155-162.
- 18 Moreno R, Salas E, Pérez C, Jiménez J. Evaluación del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de heces de lactantes y leche materna. *MedULA*. 2011; 20(2): 135-139.
- 19 Salas E. Lactobacilos con potencial actividad probiótica a partir de queso fresco no pasteurizado elaborado en forma artesanal. [Trabajo de Grado de Maestría en Microbiología en Alimentos]. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida-Venezuela; 2004.
- 20 Kandler O, Weiss N. "Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL". In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt Eds., Williams and Wilkins, 1986; 2:1209-1234.
- 21 De Angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo MR, Gobbetti M. Characterization of non - starter Lactic Acid Bacteria from italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 65(7):2011-2020.
- 22 Suskovic J, BrKick B., Matosic S y Maric V. *Lactobacillus acidophilus* M92 as potencial probiotic strain. *Milchwissenschaft*. 1997; 52(8): 430-435.
- 23 Vinderola G, Capellini B, Villarreal F, Suarez V, Quiberoni A, Reinheimer J. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *Food Science and Technology* 2008; 41 1678-1688.
- 24 Salas E, Jiménez JM, Moreno R, Sánchez K, Martínez C, Medina G. Evaluación preliminar del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de fluido vaginal de mujeres sanas. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2013; 33 (suplemento 1). X Congreso Venezolano de Microbiología "Ada Martínez de Gallardo".
- 25 Quintero E. Capacidad probiótica de *Lactobacillus* spp. Provenientes de fluido vaginal de mujeres embarazadas durante el tercer trimestre de gestación. [Trabajo de Grado de Especialidad en Microbiología Clínica]. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida-Venezuela; 2014.
- 26 Suarez JE. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr Hosp*. 2015; 31 (Supl. 1): 3-9.
- 27 García CE. Investigación bibliográfica de los mecanismos de defensa de las bacterias de la cavidad bucal. [Trabajo de Grado de Odontólogo]. Universidad de Guayaquil, Facultad de Odontología. Guayaquil-Ecuador; 2015.
- 28 Menon AM. Implications of Probiotics on Oral Health: Past-to-Present. *J Dent Res Rev*. 2016; 3(1):36-41.
- 29 Seminario M, López J, Estrugo A, Ayuso R, Jané E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017; 22(3), e282–e288. <http://doi.org/10.4317/medoral.21494>

30. Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, Gursoy U, Salminen S, Fontana M, et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. Clin Oral Investig. 2015; 19(1):77-83.
31. Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota?. J Clin Periodontol. 2011; 38(Suppl.11):159-177.
32. Murgas TR, Neu J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. J Perinatol. 2011; 31(Suppl 1): 29–34.
33. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS Biol. 2007; 5(7): 1556-1573.