

Предоставлено для использования в некоммерческих исследованиях и образовательных целях. Не подлежит воспроизведению, распространению или использованию в коммерческих целях.



Данная статья опубликована в журнале, издаваемом компанией «Elsevier». Приложенная копия предоставлена автору для внутреннего некоммерческого использования в исследовательских и образовательных целях, в том числе для обучения в учреждении авторов и обмена информацией с коллегами.

Иные способы использования воспрещаются, в том числе воспроизведение и распространение, продажа, лицензирование копий или рассылка на электронную почту персонала, веб сайты учреждений или третьей стороны.

В большинстве случаев авторам разрешается отправлять личную версию статьи (например, в формате Word или Tex) на вебсайты своего персонала или в репозиторий учреждения. Дополнительную информацию об архивировании материалов в издательстве Elsevier и политики в отношении рукописных версий авторы могут найти на сайте:

<http://www.elsevier.com/copyright>

(ЛОГОТИП) ELSEVIER	Содержание доступно на сайте SciVerse ScienceDirect Фармакологическое исследование домашняя страница журнала: www.elsevier.com/locate/yphrs	(ЛОГОТИП)
-----------------------	---	-----------

Штамм *Lactobacillus fermentum* СЕСТ 5716 является безопасным и хорошо переносится младенцами в возрасте от 1 до 6 месяцев: Рандомизированное контролируемое исследование

Mercedes Gil-Campos^a, Miguel Ángel López^b, M^a Victoria Rodriguez-Benítez^a, Julio Romero^b, Inés Roncero^a, M^a Dolores Linares^b, Jose Maldonado^b, Eduardo López-Huertas^c, Regina Berwind^d, Kristin L. Ritzenthaler^d, Victor Navas^e, Carlos Sierra^e, Lluís Sempere^f, Arjan Geerlings^f, Jose A. Maldonado-Lobón^f, Antonio D. Valero^f, Federico Lara-Villoslada^g, Mónica Olivares^{f,*}

^a Университетская больница «Королева Софии», авенида Менендес Пидаль, без номера, 14004 Кардоба, Испания

^b Университетская больница «Вирхен-де-лас-Ньевес», авенида де лас Фуэрсас Армадас 2, 18014 Гранада, Испания

^c Экспериментальная станция Заудин, Высший совет по научным исследованиям Испании. Професор Альбаредо 1, 18008 Гранада, Испания

^d «ХиПП Гмбх энд Ко Фертриб КГ», Георг-Хипп-стрит 7. D-85276 Пфаффенхофен, Германия

^e Университетская больница «Карлос Хайя», авенида Карлос Хайя, без номера, 29010 Малага, Испания

^f «Биорисёч Лайф СА», 66, Камино де Пурчиль 66, 18004 Гранада, Испания

^g Отдел питания и безопасности пищевых продуктов, «Пулева Фуд СЛ.» Камино де Пурчиль 66, 18004 Гранада, Испания

ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ	АННОТАЦИЯ
<p><i>История статьи:</i> Получено: 27 сентября 2011 г. Получена откорректированная версия: 24 ноября 2011 г. Принято в печать: 25 ноября 2011 г.</p>	<p>Целью данного исследования была оценка безопасности и переносимости детской молочной смеси, обогащённой лактобациллами <i>Lactobacillus fermentum</i> СЕСТ5716 – пробиотическим штаммом, выделенным из грудного молока, у младенцев в возрасте от 1 до 6 месяцев. Было проведено рандомизированное двойное слепое контролируемое исследование у здоровых младенцев. В течение 5 месяцев младенцы в возрасте 1 месяца получали пребиотическую детскую молочную смесь, обогащённую лактобациллами <i>L. fermentum</i> (экспериментальная группа) или ту же молочную смесь без пробиотического штамма (контрольная группа). Основным исходом в данном исследовании была средняя ежедневная прибавка в массе тела с исходного состояния до 4-месячного возраста. Дополнительными исходами были другие антропометрические данные (длина тела и окружность головы), потребление и переносимость молочной смеси. Частота инфекций также регистрировалась педиатрами. Ни в возрасте 4 месяцев ($29,0 \pm 7,8$ против $28,9 \pm 5,7$ г/день), ни в возрасте 6 месяцев ($25,1 \pm 6,1$ против $24,7 \pm 5,2$ г/день) между двумя группами не наблюдалось значительных различий в прибавке в массе тела. Статистически значимые различия в потреблении молочной смеси или симптомах, связанных с переносимостью молочных смесей, также отсутствовали. Среди младенцев в контрольной группе частота возникновения желудочно-кишечных инфекций была в 3 раза выше, в группе применения пребиотика ($p = 0,018$).</p>
<p><i>Ключевые слова:</i> Пробиотик <i>Lactobacillus fermentum</i> Безопасность Переносимость Детская молочная смесь Инфекция</p>	

Таким образом, потребление с 1 по 6 месяц жизни пребиотической детской молочной смеси, обогащённой пробиотическим штаммом *L. fermentum* СЕСТ5716, выделенным из грудного молока, хорошо переносится и является безопасным. Кроме того, потребление данной молочной смеси может улучшить здоровье младенцев посредством снижения частоты желудочно-кишечных инфекций.

© 2011 Elsevier Ltd. Перепечатка воспрещается.

Сокращения: РКИ = рандомизированное контролируемое исследование; ГОС = галактоолигосахариды; КГ = контрольная группа; ЭГ = экспериментальная группа; КЦЖК = короткоцепочные жирные кислоты; ЖКИ = желудочно-кишечные инфекции; ПЦР = полимеразная цепная реакция; МЛР = модели линейной регрессии; ОЛМ = обобщённая линейная модель; ЧВ = частота возникновения; ЧБНЛ = число больных (младенцев), которых необходимо лечить.

* Автор, которому следует направлять корреспонденцию. Тел.: +34 958 240152; факс: +34 958 240160.

Адрес электронной почты: molivares@biosearchlife.com (M. Olivares).

1043-6618/\$ - см. титульный лист Авторское право © 2011 г., принадлежит издательству «Elsevier Ltd.» Все права защищены. doi:10.1016/j.phrs.2011.11.016

1. Вводная информация

В большинстве исследований сообщалось, что фекальная микробиота у младенцев на грудном вскармливании отличается от таковой у младенцев на искусственном вскармливании [1] и может, по меньшей мере, отчасти, обуславливать благоприятные эффекты, наблюдаемые у младенцев на грудном вскармливании [2,3]. Действительно, микробиота выполняет различные функции в организме-хозяине и даже считается «забытым органом» [4]. Эти различия в микробиоте вероятно обусловлены тем, что, помимо других бифидогенных соединений, например, олигосахаридов, которые младенцы получают от матери во время кормления грудью, в грудном молоке также присутствуют кисломолочные бактерии [5,6]. По этой причине детские молочные смеси всё чаще обогащают пробиотиками, пребиотиками или синбиотиками для того, чтобы получить у младенцев на искусственном вскармливании кишечную микробиоту, схожую с таковой у детей на грудном вскармливании. Обогащение молочных детских смесей природными пробиотическими штаммами, обнаруживаемыми в грудном молоке, может стать интересной альтернативой, поскольку эти штаммы естественным образом передаются от матери к младенцу во время кормления грудью. В данном контексте Комитет по вопросам питания Европейского общества специалистов в области детских гастроэнтерологии, гепатологии и питания (ESPGHAN) пришёл к заключению о том, что применение пробиотических штаммов у здоровых младенцев не вызывает проблем с безопасностью, но эти данные нельзя экстраполировать на другие штаммы, поэтому для каждого штамма необходимо провести отдельные исследования безопасности [7]. По этой причине все штаммы, используемые в детском питании, даже те из них, что естественным образом присутствуют в грудном молоке, должны продемонстрировать безопасность в рамках интервенционных исследований.

Мы идентифицировали и выделили из грудного молока штамм *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 и охарактеризовали его безопасность и пробиотические свойства в условиях *in vitro*, используя животные модели, и в ходе рандомизированных контролируемых исследований (РКИ) у человека [8-13]. То, что этот штамм выделен из грудного молока, и обладает пробиотическими свойствами, заставило нас исследовать его безопасность и эффективность у младенцев в возрасте от 6 до 12 месяцев. Применение штамма в течение 6 месяцев было безопасным, хорошо переносилось и ассоциировалось со значительным снижением частоты желудочно-кишечных и респираторных инфекций [14]. В ходе данного РКИ мы оценили безопасность детской молочной смеси, содержащей *L. fermentum* СЕСТ5716, у детей в возрасте от 1 до 6 месяцев.

2. Материалы и методы

2.1. Дизайн и протокол исследования

Рандомизированное двойное слепое контролируемое исследование в двух группах было проведено в сотрудничестве с детскими отделениями трёх испанских больниц: больница «Вирхен-де-лас-Ньевес» (Гранада, Испания), больница «Королева София» (Кордоба, Испания) и больница «Карлос Хайя» (Малага, Испания). Здоровых 1-месячных младенцев, которые по причинам, не зависящим от исследования, получали исключительно молочные смеси, включили в исследование в период с мая 2009 г. по сентябрь 2010 г. после того, как от их родителей или попечителей было получено письменное информированное согласие. К критериям исключения относились: незначительные или серьёзные нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта в анамнезе (хроническая диарея или запор, гастроэзофагеальный рефлюкс в анамнезе), хирургическая операция на ЖКТ, аллергия на белок коровьего молока, метаболические расстройства (диабет, лактозная непереносимость), иммунодефицит, назначение антибиотикотерапии за одну неделю до включения в исследование и предыдущее использование молочной смеси, содержащей пробиотика. К критериям исключения во время исследования относились несоблюдение протокола исследования, нежелательные явления, вызванные потреблением любой из исследуемых молочных смесей, неявка на запланированные визиты в больницу и сильный рефлюкс (или) колика, которые, согласно мнению педиатров, требовали назначения специальной молочной смеси.

Размер выборки был оценен по основному исходу исследования, который представлял собой среднюю прибавку в массе тела младенцев с исходного состояния до возраста 120 дней \pm 3 дня. На основании предыдущих публикаций, где рост был основной переменной исхода в исследованиях безопасности [15,16], и отчёта Научного комитета по вопросам продуктов питания исследование было спланировано таким образом, чтобы оно обладало достаточной мощностью для выявления разницы в прибавке в массе тела, равной 0,5 стандартного отклонения [17]. Следовательно, в каждую группу исследования необходимо было включить по 63 ребёнка, исходя из предполагаемой не меньшей эффективности (односторонний критерий) с уровнем значимости 2,5 % и статистической мощностью 80 %. Участники, выбывшие из исследования, не учитывались в расчётах.

Сто тридцать семь младенцев были отобраны и распределены в две группы исследования согласно списку рандомизации, генерированному компьютерной программой (SIGESMU®). В исследовании использовались стандартные порошковые детские молочные смеси, пищевой состав которых соответствовал требованиям действующего руководства ЕС. В контрольной группе (КГ) молочная смесь была обогащена галактоолигосахаридами (ГОС) (0,3 г/100 мл), а в экспериментальной группе (ЭГ) использовалась молочная смесь, содержащая такое же количество галактоолигосахаридов (ГОС) с добавлением *L. fermentum* СЕСТ5716 (*Lactobacillus fermentum* Hereditum®) в концентрации 10^7 КОЕ/г молочной смеси. Концентрацию пробиотика в молочной смеси анализировали и подтверждали каждые два месяца. Обе молочные смеси применялись у младенцев до 6-месячного возраста (интервенционный период). Детские молочные смеси, предоставленные компанией «Пулева Фуд С.Л.» (Гранада, Испания), были упакованы в обычные одинаковые чисто белые контейнеры с кодовым номером, который обозначал группу исследования. Для обеспечения маскировки рандомизации группа экспертов провела ряд органолептических исследований обеих молочных смесей и пришла к выводу о том, что обе молочные смеси были идентичными. Педиатры назначили младенцам ежедневную порцию молочной смеси и дали указания по дополнительному прикорму в соответствии с действующим руководством ESPGHAN [18]. Данное исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, и протокол был одобрен Региональным этическим комитетом Андалусской системы здравоохранения в Севилье (Испания). Исследование было зарегистрировано в Медицинской библиотеке США (www.clinicaltrials.gov) под номером NCT01346644.

2.2. Исходы в исследовании и сбор данных

Основным исходом в данном исследовании была средняя прибавка в массе тела с исходного состояния (T0) до 4-месячного возраста (T2). Дополнительными исходами были средняя прибавка в длине тела и окружности головы, частота кишечных инфекций, поведение, связанное с кормлением, нежелательные явления, связанные с потреблением молочной смеси, фекальная микробиота, концентрация фекальных короткоцепочных жирных кислот (КЦЖК) и концентрация фекального IgA. На интервенционный период было запланировано четыре клинических оценки младенцев: в исходном состоянии в возрасте 1 месяца (T0), в возрасте 2 месяца (T1), 4 месяца (T2) и 6 месяцев (T3). Образцы кала собирали во временных точках T0, T2 и T3.

Диагностика инфекционных заболеваний проводилась педиатром на основании специфических симптомов и стандартизированных определений. Желудочно-кишечная инфекция (ЖК инфекция) определялась как жидкий или водянистый стул, по меньшей мере, три раза в день, сопровождающийся или не сопровождающийся повышенной температурой или рвотой [19], а инфекции дыхательных путей определялись как наличие обильной слизи и (или) кашля в течение двух или более дней подряд, сопровождающееся повышенной температурой или без неё или наличием хрипящих и (или) крепитирующих звуков, сопровождающихся повышенной температурой или без неё. Детская колика определялась как непрерывный плач в течение более трёх часов, наблюдающийся более чем три дня в неделю в течение более трёх недель [20]. Родители получили ежедневник и 15-дневный опросник, в которых они должны были записывать количество опорожнений кишечника, ежедневное количество потреблённой молочной смеси, незапланированные визиты к врачу, поведение ребёнка и дискомфорт в желудочно-кишечном тракте.

У каждого участника исследования одновременно собирали по четыре свежих образца кала в исходном состоянии (в возрасте 1 месяца), в возрасте 4 и 6 месяцев, которые затем хранились при температуре -20 °C и обрабатывались в течение 1 недели. Три образца использовались для оценки различных анализируемых параметров, а оставшийся образец хранился при температуре -80 °C.

2.3. Подсчёт числа бактерий

Число бактерий в образцах кала подсчитывали с использованием классических микробиологических методик, следуя протоколу, описанному в работе Мальдонадо и соавт. [14]. Для выявления *L. fermentum* СЕСТ5716 образцы кала диспергировали в пептонно-солевом буфере (100 мг/мл) и распределяли в агаре для культивирования лактобацилл по Манну, Рогозе и Шарпу (агар МРШ). Через 48 часов инкубации при температуре 37 °C в анаэробных условиях колонии собирали и суспендировали в дистиллированной воде. Штамм *L. fermentum* СЕСТ5716, полная геномная последовательность которого установлена [21], обнаруживался в этих бактериальных суспензиях после обработки, основанной на гнездовой ПЦР. Праймеры и зонды были разработаны с использованием программного обеспечения Primer Express («Applied Biosystems») на основе видоспецифической геномной последовательности ДНК, идентифицированной методом вычитательной гибридизации ДНК (данные не приводятся).

Вкратце, реакция амплификации первого стандарта была проведена с использованием в качестве праймеров следующих олигонуклеотидов: HSL40_126D (5'-GCTTGCCGCTTCTCTGGT-3') и HSL40_126R (5'-CAACGACGATGAACACCACTT-3') при длине волны 500 нм на амплификаторе Mastercycler Gradient («Эппендорф») и ДНК-полимеразе Taq («Рош»). ПЦР была проведена при следующих условиях: этап исходной денатурации в течение 5 минут при температуре 95 °C, затем 40 циклов при температуре 95 °C в течение 30 секунд, 46 °C в течение 30 секунд и 72 °C в течение 30 секунд и заключительное удлинение цепи при температуре 72 °C в течение 3 минут. Результат амплификации и размер ампликона (222 bp) были подтверждены результатами электрофореза в агарозном геле.

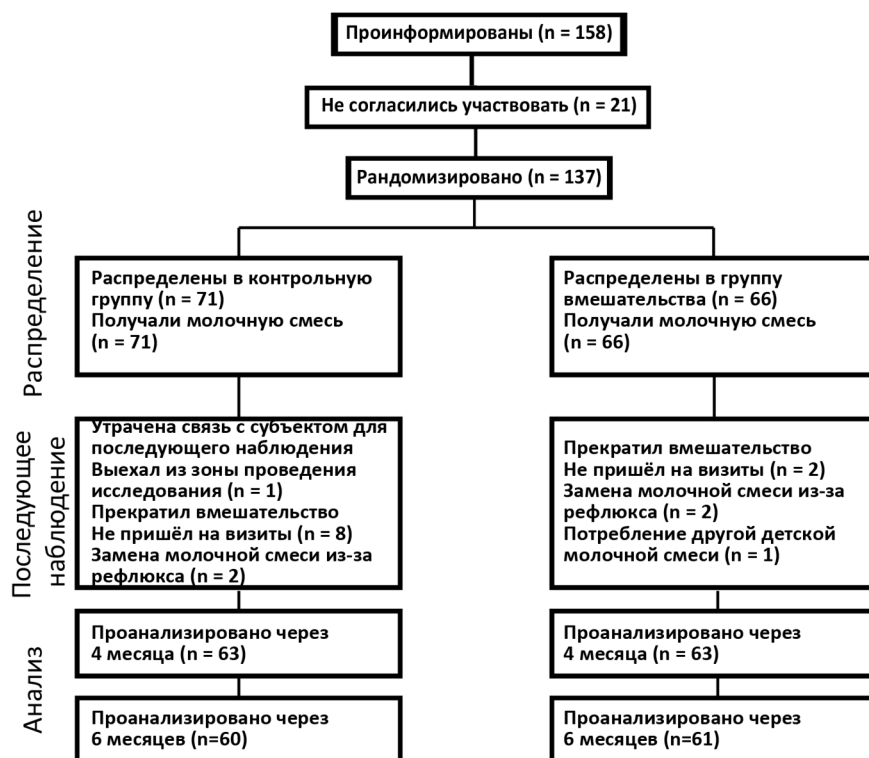


Рис. 1. Схема распределения субъектов исследования.

Вторая амплификация представляла собой ПЦР-анализ, проведённый с использованием набора TaqMan, целевая последовательность которого находилась в пределах продукта первой ПЦР. В реакционной смеси присутствовали праймеры (LC40C126_D 5'-TCAACGGCCCTTCAATACA-3', LC40C126_D 5'-GACСТААТТCACGTCAAACАТАТТТСАС-3') при длине 500 нм и зонды (LC40C126_P 5'-AGTGGTGAGATGCCAGTGTТССCG-3', JOE и меченный ВНQ1) при длине волны 250 нм. Амплификация и детектирование были проведены на термоциклере Stratagene MX3005P с использованием ДНК-полимеразы Taq («Рош»), с инкубацией в течение 5 минут при температуре 95 °С и последующими 40 циклами инкубации при температуре 95 °С в течение 15 секунд и при температуре 60 °С в течение 1 минуты.

2.4. Подсчёт числа короткоцепочных жирных кислот

Образцы кала гомогенизировали с раствором NaHCO₃ в концентрации 150 ммоль/л (рН 7,8) (1:5, масса/объём) в аргоновой атмосфере. Для ферментации образцов их инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С и до экстракции хранили при температуре -80 °С. Экстракцию КЦЖК провели методом газовой хроматографии, следуя протоколу, описанному в работе Мальдонадо и соавт. [14].

2.5. Подсчёт числа IgA в образцах кала

Концентрацию IgA в супернатантах кала измерили при помощи набора для количественного ИФА, следуя инструкциям производителя («Бетил», Монтгомери, Техас).

2.6. Статистический анализ

Статистический анализ выполнили с использованием программного обеспечения R (версия 2.12.2). Статистические модели, использованные для анализа основного и дополнительных исходов скорректировали главным образом по времени, группе лечения, полу и возрасту в исходном состоянии для корректировки по различиям в начальном возрасте младенца в

исследовании, гендерным различиям и различиям между больницами. Поскольку между больницами различий не было, итоговый анализ не включал больницу в качестве ковариаты, и корректировки по этой ковариате не требовалось.

Для анализа повторных показателей в динамике по времени с учётом межиндивидуальной корреляции ответов на лечение применялась линейная смешанная модель. Когда переменными исследования были непрерывные ответы как показатели интервенционного периода, применялись модели линейной регрессии (МЛР) для коррекции среднего значения по ковариатам, представляющим интерес. Для анализа ответов, определённых на основании числа событий или значений, полученных дихотомным методом, применялись общие линейные модели (ОЛМ). В частности, для анализа по числу событий была проведена подгонка модели регрессии Пуассона с логарифмической функцией связи, и анализ по частоте возникновения был проведён с использованием модели логистической регрессии. Проверки провели при двустороннем 5 % уровне значимости и для оценок рассчитали 95 % доверительные интервалы.

3. Результаты

3.1 Популяция

Сто пятьдесят восемь родителей получили информацию об исследовании. В итоге, 137 младенцев были включены в исследование и рандомизированно распределены в группы лечения. Шестнадцать младенцев из 137 выбыли из исследования: 11 в контрольной группе и 5 в экспериментальной группе. В интервенционном периоде причинами выбывания младенцев из исследования были выезд из зоны проведения исследования (1 младенец в контрольной группе), изменение молочной смеси из-за рефлюкса (2 в КГ и 2 в ЭГ), использование другой молочной смеси (1 в ЭГ) и утрата связи с субъектом из-за низкого уровня соблюдения назначенного режима питания и нарушения протокола исследования (8 в КГ и 2 в ЭГ). На 4-м месяце было проанализировано в общей сложности 126 младенцев, у которых не было зарегистрировано существенных нарушений протокола (по 63 младенца в каждой группе), и на 6-м месяце был проанализирован 121 младенец (60 в КГ и 61 в ЭГ). Распределение субъектов исследования показано на рис. 1. Исходные характеристики 121 младенца, завершившего интервенционный период, были сопоставимыми в двух группах исследования (таблица 1).

Таблица 1

Исходные характеристики субъектов исследования.

	КГ (n = 60)	ЭГ (n = 61)
Мужской пол/женский пол, n (%)	38/22 (63/37)	34/27 (56/44)
Возраст на момент включения в исследование (недели), среднее \pm СО	4,3 \pm 1,1	4,3 \pm 0,5
Масса тела при рождении (кг), среднее \pm СО	3,15 \pm 0,6	3,24 \pm 0,6
Кесарево сечение (%)	48	36
Гестационный возраст (недели), среднее \pm СО	40 \pm 2,3	40,5 \pm 2,4
Возраст матери на момент родов (лет) среднее \pm СО	30,6 \pm 4,9	28,2 \pm 5,4
Грудное вскармливание (%)		
На искусственном вскармливании	74	73
< 1 недели	19	21
1 – 4 недели	8	6
Курение в период беременности (%)	22	15
Курение в период кормления грудью (%)	27	16
Курение в доме (%)	52	48
Старшие братья и сёстры (%)	44	45
Дневное детское учреждение до 6-месячного возраста (%)	11	3
Масса тела матери (кг), среднее \pm СО	72,7 \pm 6,5	68,8 \pm 5,7
Семейная история аллергии (%)	32	23
Домашние животные (%)	30	33
Вакцинация против ротавируса	68	69

3.2. Процентили и показатели z-score исследования

В конце исследования средние процентиля массы тела и головы составили примерно 75 % среди девочек и 50 % – 75 % среди мальчиков и были схожими в двух группах (КГ и ЭГ). Если в обеих группах длина тела увеличивалась в конце исследования, то средние процентиля для девочек и мальчиков варьировали в диапазоне от 50 % до 75 % (рис. 2).

Показатели сигмальных (z-score) отклонений массы тела, длины тела и окружности головы по отношению к возрасту рассчитали, опираясь на нормы роста детей, разработанные ВОЗ [22]. Популяция исследования не отличалась от стандартной популяции (рис. 3). Было отмечено, что экспериментальная молочная смесь не оказала значительного влияния на показатели z-score массы тела по отношению к возрасту ($p = 0,061$) и показатели z-score окружности головы ($p = 0,453$). Эффект лечения был значительным ($p = 0,021$) в плане показателей z-score длины тела по отношению к возрасту, указывая на то, что у младенцев в группе экспериментального лечения показатели z-score длины тела по отношению к возрасту были выше, чем в контрольной группе.

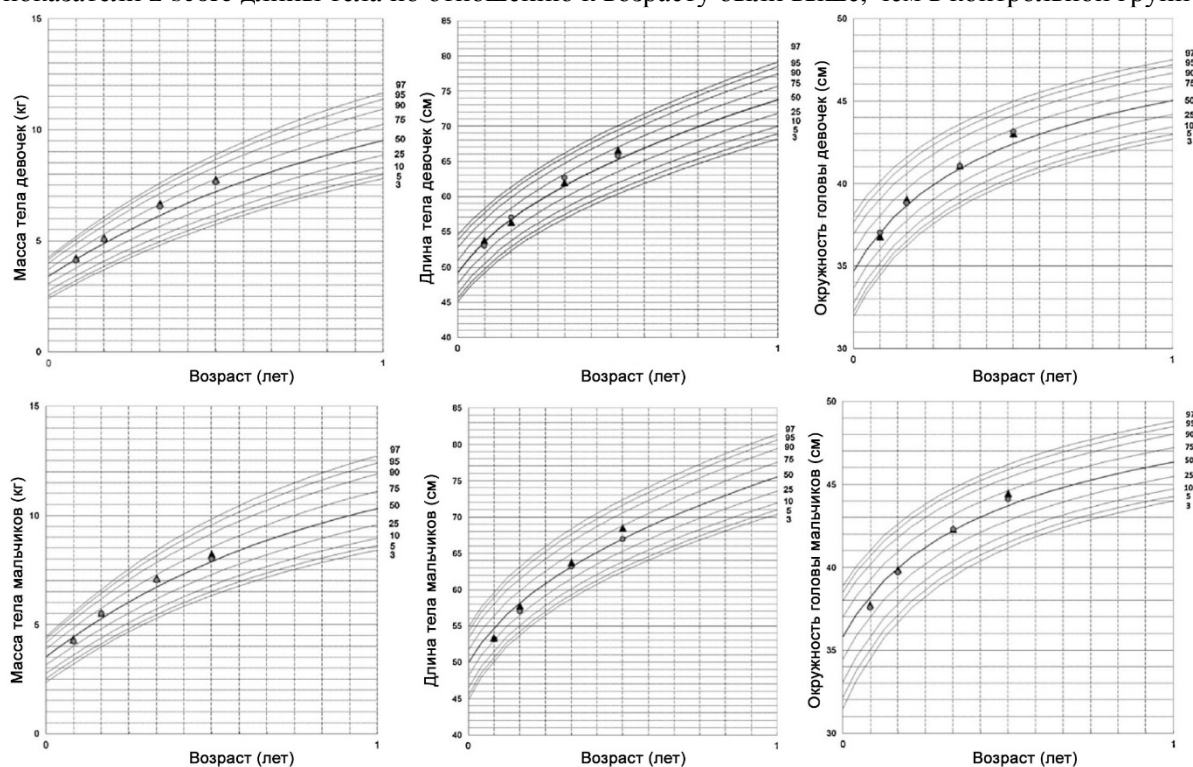


Рис. 2. Представленные по отношению к стандартным кривым соответствующие процентиля для среднего значения среди мальчиков и девочек в каждой группе в динамике по времени рассчитаны на основании средних значений массы тела (по полу и группе), длины тела и окружности головы младенцев. Точками показаны возрастающие средние значения в КГ, треугольниками – возрастающие средние значения в ЭГ. Каждая кривая (чёрные линии) – это стандартный процентиль в каждой возрастной точке ребёнка.

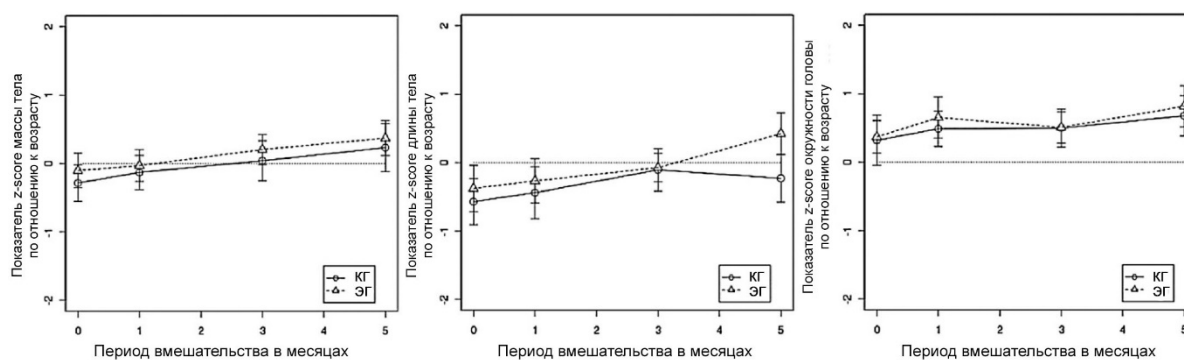


Рис. 3. Показатели z-score массы тела по отношению к возрасту, длины тела по отношению к возрасту и окружности головы (среднее значение и 95 % ДИ по группам исследования) относительно норм, разработанных ВОЗ.

3.3. Рост

В том что касается массы тела, между группами не наблюдалось значительных различий в отношении массы тела и прибавки в массе тела ни в возрасте 4 месяцев (основной исход исследования), ни в конце интервенционного периода (в возрасте 6 месяцев). Схожие результаты были получены в отношении окружности головы (таблица 2).

В 4-месячном возрасте между группами не наблюдалось значительных различий в длине тела, но в 6-месячном возрасте рост младенцев в ЭГ был значительно выше, чем в КГ ($p = 0,038$). Однако прибавка в длине тела (см/день) младенцев была схожей, и никаких значительных межгрупповых различий не наблюдалось (таблица 2).

Таблица 2

Антропометрические показатели в исходном состоянии (1 месяц) и в возрасте 4 и 6 месяцев. Прибавка/день соответствует разнице между значениями, полученными в возрасте 6 месяцев и исходном состоянии. Значения указаны как среднее \pm СОС. *, $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Параметры роста	Контрольная группа			Экспериментальная группа				
	1 месяц	4 месяца	6 месяцев	Прибавка в массе тела/день ^а	1 месяц	4 месяца	6 месяцев	Прибавка в массе тела/ден ^а
Масса тела (кг)	4,2 \pm 0,6	6,8 \pm 0,8	7,9 \pm 1,0	25,3 \pm 6,0	4,3 \pm 0,5	6,9 \pm 0,7	8,0 \pm 0,9	24,8 \pm 5,1
Длина тела (см)	53,1 \pm 2,6	62,8 \pm 3,5	66,6 \pm 2,5	0,90 \pm 0,2	53,6 \pm 2,1	63,0 \pm 1,8	68,1 \pm 3,4*	0,96 \pm 0,3
Окружность головы (см)	37,4 \pm 1,6	42,1 \pm 2,7	43,7 \pm 1,3	0,421 \pm 0,1	37,3 \pm 1,1	41,1 \pm 4,7	43,7 \pm 1,6	0,43 \pm 0,1

^а Для массы тела: г/день; для длины тела и окружности головы: мм/день.

3.4. Потребление молочной смеси, переносимость и нежелательные эффекты

Обе молочные смеси, использованные в исследовании, хорошо переносились и уровень соблюдения назначенного режима питания был хорошим. Между двумя группами исследования не наблюдалось значительных различий в ежедневном потреблении молочной смеси (630,9 \pm 197,7 мл/день в КГ против 587,8 \pm 201,3 мл/день в ЭГ). Два младенца в КГ и два младенца в ЭГ выбыли из исследования в интервенционном периоде из-за рефлюкса, и у них не было отмечено никаких изменений после замены исследуемой молочной смеси на антирефлюксную детскую молочную смесь, однако между группами не наблюдалось значительных различий в количестве выбывших участников. Характер поведения, связанного с кормлением (количество опорожнений кишечника в день, цвет, консистенция кала, метеоризм, рефлюкс, часы сна и поведение), был

схожим в двух группах (таблица 3). Во время исследования нежелательных явлений, связанных с применением пробиотической добавки, не наблюдалось.

3.5. Здоровье младенцев

Во время интервенционного периода у 51 % младенцев были зарегистрированы респираторные инфекции и у 16 % – ЖК инфекции. Большинство инфекционных заболеваний относились к респираторным инфекциям (76 % от общего количества инфекций) (таблица 4). Между группами не наблюдалось различий в частоте возникновения респираторных инфекций, хотя в ЭГ частота всё же была ниже, чем в КГ. В ЭГ наблюдалось значительное снижение (на 71 %) частоты возникновения ЖК инфекций (ЧВ: $0,082 \pm 0,037$) в сравнении с КГ (ЧВ: $0,283 \pm 0,068$) (таблица 4). Отношение частоты возникновения ЖК инфекций (ОЧВ = $0,289$, 95 % ДИ: $0,085 - 0,831$) было значительным ($p = 0,018$), указывая на то, что в КГ частота возникновения диареи была выше, чем в ЭГ. Для снижения частоты диареи на одно явление необходимо было пролечить 5 младенцев (ЧБНЛ). Отношение рисков развития, по меньшей мере, одной желудочно-кишечной или респираторной инфекции составило $0,36$ (95 % ДИ: $0,08 - 0,97$) и $0,77$ (95 % ДИ: $0,36 - 1,66$) соответственно, но разница была значительной ($p = 0,025$) только в отношении ЖК инфекций. В частности, в экспериментальной группе риск развития ЖК инфекции был в 3 раза ниже, чем в контрольной группе.

Сообщалось только о 5 случаях других инфекций (3 в КГ и 2 в ЭГ) (кандидоз, инфекция мочевыводящих путей, конъюнктивит, ветрянка или отит). Общая частота возникновения инфекций была ниже в ЭГ, но разница была незначительной. В том что касается частоты фебрильных судорог и применения антибиотикотерапии, значительных различий между группами не наблюдалось.

Таблица 3

Поведение, связанное с кормлением.

ВРЕМЯ	1 месяц	4 месяца	6 месяцев
Количество опорожнений кишечника/день^a			
КГ	$1,88 \pm 0,6$	$1,84 \pm 0,5$	$1,98 \pm 0,2$
ЭГ	$1,94 \pm 0,6$	$1,80 \pm 0,7$	$1,93 \pm 0,4$
Цвет кала^b			
КГ	$1,8 \pm 0,8$	$2,10 \pm 1,0$	$2,49 \pm 0,8$
ЭГ	$1,81 \pm 0,7$	$2,07 \pm 0,9$	$3,10 \pm 1,3$
Консистенция^c			
КГ	$2,92 \pm 0,6$	$3,08 \pm 0,5$	$2,63 \pm 0,6$
ЭГ	$3,04 \pm 0,4$	$2,98 \pm 0,5$	$2,54 \pm 0,7$
Метеоризм^d			
КГ	$1,74 \pm 0,9$	$1,18 \pm 0,4$	$1,12 \pm 0,3$
ЭГ	$1,64 \pm 0,7$	$1,33 \pm 0,8$	$1,20 \pm 0,7$
Рефлюкс^e			
КГ	$1,90 \pm 0,8$	$1,78 \pm 0,8$	$1,57 \pm 0,7$
ЭГ	$1,77 \pm 0,7$	$1,89 \pm 0,9$	$1,68 \pm 1,0$
Количество часов сна^f			
КГ	$2,56 \pm 0,8$	$3,14 \pm 0,7$	$3,47 \pm 0,7$
ЭГ	$2,66 \pm 1,0$	$3,44 \pm 0,8$	$3,73 \pm 0,8$
Общее время сна^g			
КГ	$3,14 \pm 0,9$	$2,84 \pm 0,7$	$2,51 \pm 0,9$
ЭГ	$3,26 \pm 0,7$	$2,82 \pm 0,9$	$2,78 \pm 1,0$
Характер поведения^h			
КГ	$2,62 \pm 0,7$	$2,44 \pm 0,5$	$2,47 \pm 0,5$
ЭГ	$2,43 \pm 0,6$	$2,40 \pm 0,5$	$2,39 \pm 0,5$

^a Количество опорожнений кишечника/день: 1 = < 1 раза, 2 = 1 – 3, 3 = 4 – 6, 4 = 7 – 10 и 5 = > 10.

^b Цвет кала: 1 = жёлтый, 2 = горчичный, 3 = коричневый, 4 = серый и 5 = зелёный.

^c Консистенция: 1 = твёрдые комки, 2 = колбаска с трещинами, 3 = мягкая колбаска, 4 = пористый (кашеобразный) и 5 = водянистый.

^d Метеоризм: 1 = 0 ч, 2 = < 3 ч, 3 = 3 – 6 ч, 4 = 6 – 12 ч и 5 = > 12 ч.

^e Рефлюкс (срыгивание): 1 = отсутствует, 2 = срыгивание небольшого количества молока во время или вскоре после кормления, 3 = более длительное срыгивание молока во время или вскоре после кормления, 4 = незначительная рвота

через некоторое время после предыдущего кормления и 5 = тяжёлая рвота, сопровождающаяся существенной потерей жидкости.

^f Длительность сна (в течение последних двух ночей, в среднем, непрерывный ночной сон): 1 = < 4 ч, 2 = 4 – 6 ч, 3 = 6 – 9 ч, 4 = 9 – 12 ч и 5 = > 12 ч.

^g В течение последних двух дней общее среднее количество часов сна в сутки: 1 = < 11 ч, 2 = 11 – 14 ч, 3 = 14 – 17 ч, 4 = 17 – 20 ч и 5 = > 20 ч.

^h Характер поведения: поведение младенцев при пробуждении в течение последних двух дней лучше всего описывают следующие определения: 1 = утомлённый, пассивный, 2 = спокойный, наблюдающий, 3 = уравновешенный, активный, 4 = оживлённый, неугомонный, возбуждённый и 5 = встревоженный, взбудораженный.

Таблица 4

Частота инфекционных заболеваний, фебрильных судорог и антибиотикотерапии в интервенционном периоде.

	Контрольная группа		Экспериментальная группа		Отношение частоты возникновения	Снижение ЧВ (%)	ЧБ НЛ	p-значение ОЧВ
	Количество явлений	Частота возникновения (СтО)	Количество явлений	Частота возникновения (СтО)				
Другие инфекции	17	0,283 (0,07)	5	0,082 (0,04)	0,289 (0,085 – 0,831)*	71,1	5	0,018
Инфекции дыхательных путей	43	0,716 (0,11)	42	0,689 (0,11)	0,977 (0,623 – 1,530)	3,9	61	0,933
Общее количество случаев инфекции	63	1,050 (0,13)	49	0,803 (0,11)	0,778 (0,524 – 1,148)	23,5	4	0,339
Фебрильные судороги	13	0,220 (0,06)	13	0,213 (0,06)	0,967 (0,427 – 2,341)	3,3	-	-
Антибиотикотерапия	7	0,115 (0,04)	8	0,131 (0,05)	1,105 (0,362 – 3,702)	-10,5	-61	0,807

* $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

3.6. Параметры анализа образцов кала

Среднее число лактобацилл, бифидобактерий, клостридий и бактероидов, наблюдаемое в образцах кала в каждой временной точке, было схожим в двух группах, хотя следует отметить, что со временем наблюдалось значительное увеличение числа этих бактерий (таблица 5).

Живые бактерии *L. fermentum* СЕСТ5716 были обнаружены в образцах кала 53 % младенцев в ЭГ. В образцах двух младенцев в контрольной группе были обнаружены бактерии *L. fermentum*. Потенциал фекальной микробиоты младенцев к выработке короткоцепочных жирных кислот (бутириновой, пропионовой и уксусной кислоты) и концентрации фекального IgA были схожими в двух группах (таблица 5).

Таблица 5

Количество бактерий в кишечной микробиоте в образцах кала младенцев (представленное как логарифм КОЕ/г), концентрация фекальных короткоцепочных жирных кислот (КЦЖК, представленная как мг/г кала) и фекального IgA (представленная как /г кала) в исходном состоянии (в 1-месячной возрасте) и в возрасте 4 и 6 месяцев.

Группа бактерий	Контрольная группа			Экспериментальная группа		
	1 месяц	4 месяца	6 месяцев	1 месяц	4 месяца	6 месяцев
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,99 ± 0,2	7,35 ± 0,2	7,80 ± 0,2	6,79 ± 0,2	7,05 ± 0,2	7,88 ± 0,2
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,70 ± 0,2	7,18 ± 0,1	7,81 ± 0,2	6,65 ± 0,2	6,90 ± 0,2	7,83 ± 0,2
<i>Clostridium</i> spp.	6,80 ± 0,2	6,98 ± 0,1	7,43 ± 0,2	6,48 ± 0,2	6,81 ± 0,2	7,66 ± 0,2
<i>Bacteroides</i> spp.	6,66 ± 0,2	6,94 ± 0,1	7,52 ± 0,2	6,38 ± 0,2	6,84 ± 0,2	7,57 ± 0,2
КЦЖК						
Ацетат	14,5 ± 1,1	13,4 ± 1,5	12,4 ± 1,1	12,8 ± 1,1	11,5 ± 0,9	14,4 ± 1,4
Пропионат	2,75 ± 0,5	2,15 ± 0,2	2,71 ± 0,3	2,27 ± 0,2	1,89 ± 0,1	3,08 ± 0,5
Бутират	2,31 ± 0,5	2,32 ± 0,4	2,38 ± 0,3	1,60 ± 0,3	1,73 ± 0,2	2,94 ± 0,4

Иммуноглобулин А	1,16 ± 1,2	1,19 ± 0,9	0,89 ± 0,8	1,13 ± 1,0	1,09 ± 1,0	0,998 ± 1,0
------------------	------------	------------	------------	------------	------------	-------------

4. Обсуждение

L. fermentum СЕСТ5716 – это пробиотический штамм, изначально выделенный из грудного молока женщин через 4 дня после родов [2,8], его безопасность и пробиотический потенциал были доказаны в животных моделях и в ходе исследований у человека, в том числе у детей в возрасте от 6 до 12 месяцев [11,14,23]. В настоящем исследовании была изучена безопасность и переносимость штамма *L. fermentum* при его применении в составе детской молочной смеси у здоровых младенцев в возрасте 1 – 6 месяцев.

Определение скорости прибавки в массе тела (основной исход исследования) – единственный и самый значительный компонент клинической оценки детской молочной смеси [24–26]. В данном исследовании в обеих группах показатели z-score массы тела по отношению к возрасту и длины тела по отношению к возрасту свидетельствовали о скорости роста, сопоставимой с утверждёнными нормами роста. Поскольку эти нормы основаны на данных, полученных у здоровых младенцев, эти результаты являются значимым доказательством питательной достаточности и безопасности экспериментальной молочной смеси. Между ЭГ и КГ не наблюдалось никаких различий в показателях массы тела, длины тела и окружности головы. Однако в конце интервенционного периода было отмечено, что у младенцев в экспериментальной группе показатели длины тела были значительно выше, чем у младенцев в контрольной группе. Ранее сообщалось о схожих исследованиях, проведённых с использованием других пробиотических штаммов, в ходе которых наблюдалось влияние пробиотической терапии на массу и длину тела младенцев [27,28]. Ясного объяснения этого эффекта не было найдено, но, возможно, действие бактерий на физиологию слизистой оболочки влияет на усвоение и поглощение питательных веществ. В будущем необходимо провести исследования для выявления этих различий в росте, чтобы подкрепить полученный результат новыми доказательствами и изучить механизмы, лежащие в основе наблюдаемого эффекта.

Нежелательных явлений, связанных с потреблением экспериментальной молочной смеси, не наблюдалось. Незначительные нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, включая колики, рефлюкс, мягкий стул и запор, являются теми симптомами, которые характеризуют переносимость детской молочной смеси. Между двумя группами терапии не наблюдалось никаких различий в этих симптомах, свидетельствуя о том, что экспериментальная молочная смесь, содержащая пробиотический штамм, хорошо переносится. Помимо этого, число младенцев которые вышли из исследования из-за проблем с рефлюксом, был очень низким и схожим в двух группах. Значения уровней или частоты младенческой колики, рефлюкса и запора были в пределах нормы, установленных в Испании для детей данного возраста [29].

Хотя между двумя группами не было выявлено значительных различий в фекальной микробиоте, пробиотический штамм *L. fermentum* СЕСТ5716 обнаруживался в образцах кала 53 % младенцев в ЭГ, свидетельствуя о том, что данный штамм способен выживать в условиях желудочно-кишечного тракта младенцев. Специфические олигонуклеотиды, использованные для детектирования штамма СЕСТ5716, также были обнаружены в двух образцах кала в КГ, возможно, из-за того, что штаммы *L. fermentum*, очень схожие со штаммом СЕСТ5716, естественным образом присутствовали в образцах кала этих двух младенцев.

В том что касается общего состояния здоровья младенцев, между двумя группами не наблюдалось значительных различий в частоте респираторных инфекций, которые представляют собой наиболее распространённый тип инфекционных заболеваний в детском возрасте. В ходе предыдущего исследования у младенцев в возрасте от 6 до 12 месяцев потребление пробиотической последующей молочной смеси, содержащей тот же штамм *L. fermentum*, привело к значительному снижению на 26 % частоты респираторных инфекций [14]. Заслуживает внимания тот факт, что в данном исследовании снижение частоты респираторных инфекций было обусловлено главным образом эффектом в отношении рецидивирующих инфекций. В первые 6 месяцев жизни частота рецидивирующих инфекций, на самом деле, низкая, что может объяснять отсутствие влияния пробиотика на частоту респираторных инфекций, наблюдавшееся в данном исследовании.

Потребление экспериментальной молочной смеси, содержащей *L. fermentum*, было связано со значительным снижением на 71 % частоты желудочно-кишечных инфекций в сравнении с младенцами, получавшими контрольную молочную смесь. Данный результат согласуется с предыдущими результатами, полученными у младенцев в возрасте от 6 до 12 месяцев, у которых во время лечения с использованием *L. fermentum* наблюдалось снижение на 46 % частоты желудочно-кишечных инфекций [14]. Данное исследование было запланировано для выявления различий в росте младенцев, и принимая во внимание низкую частоту желудочно-кишечных инфекций у младенцев в первые 6 месяцев жизни, статистическая мощность исследования была ниже 80 %. Поэтому для того, чтобы подкрепить полученные результаты новыми доказательствами, в будущем необходимо провести исследования с участием значительно большего числа субъектов.

Уровень снижения частоты желудочно-кишечных инфекций, зарегистрированный в ЭГ, также был сопоставим с таковым, наблюдавшимся в других исследованиях, в ходе которых сообщалось об успешной профилактике внебольничных желудочно-кишечных инфекций или эпизодов диареи благодаря использованию детских молочных смесей, обогащённых пробиотиками [30-34].

Обе молочные смеси (контрольная и экспериментальная) содержали ГОС в концентрации 0,3 г/100 мл. Благоприятные эффекты пробиотиков основаны главным образом на их влиянии на состав кишечной микробиоты и способности вырабатывать продукты ферментации (короткоцепочные жирные кислоты), выполняющие разнообразные биологические функции [35]. Присутствие в экспериментальной молочной смеси ГОС могло оказать синергетический эффект с *L. fermentum*, усилив благоприятный эффект пробиотического штамма. Однако, поскольку контрольная молочная смесь также содержала ГОС в той же концентрации, сделать какие-либо выводы не представляется возможным.

Таким образом, потребление детской молочной смеси, обогащённой пребиотиком *L. fermentum* СЕСТ5716, является безопасным и хорошо переносится у младенцев в возрасте от 1 до 6 месяцев. Кроме того, потребление данной молочной смеси может улучшить здоровье младенцев посредством снижения частоты желудочно-кишечных инфекций.

Источники финансирования

Исследование финансировалось компаниями «Пулева Фуд СЛ» (Гранада, Испания) и «ХиПП ГмБХ энд Ко Фертриб КГ» (Пфаффенхофен, Германия). Спонсоры участвовали в разработке дизайна исследования и написании отчёта.

Заявление о раскрытии интересов

MG, MAL, MVR, JR, IR, MDL, JM, ELH, VN и CD заявляют об отсутствии конфликта личных интересов/заработка в какой-либо компании/организации и о том, что при подготовке настоящей статьи они не получали никакой финансовой поддержки от какой-либо организации, связанной с соответствующей отраслью промышленности.

LS, ADV, AG и MO являются сотрудниками компании «Биосёч», которая владеет патентом на штамм *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716.

FLV является сотрудником компании «Пулева Фуд».

RB и KLR являются сотрудниками компании «ХиПП ГмБХ энд Ко».

JML получал стипендию университетского бизнес-фонда (Университет Гранады, Испания).

Благодарность

Авторы выражают благодарность Леналии Гарсия Фернандес («SEPLIN, Soluciones Estadísticas») за статистический анализ данных.

Д-р Мерседес Жил и д-р Хосе Мальдонадо являются членами «Red SAMID».

Список литературы

- [1] Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:61-7.
- [2] Grönlund 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;37:1764-72.
- [3] Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr* 2002;87:405-20.
- [4] Quigley EM. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res* 2010;61:213-8.
- [5] Martin R, Langa S, Reviriego C, Jimenez E, Marin ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003;143:754-8.
- [6] Kunz C, Rudloff S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr* 1993;82:903-12.
- [7] Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, et al. ESPGHAN Committee on Nutrition. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52:238-50.
- [8] Martin R, Olivares M, Marin ML, Fernandez L, Xaus J, Rodriguez JM. Probiotic potential of three lactobacilli strains isolated from human breast milk. *J Hum Lact* 2005;21:8-17.
- [9] Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, et al. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:737-46.
- [10] Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006;101:72-9.
- [11] Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007;23:254-60.
- [12] Díaz-Ropero MP, Martin R, Sierra S, Lara-Villoslada F, Rodríguez JM, Xaus J, et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 2007;102:337-43.
- [13] Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* 2010;215:996-1004.
- [14] Maldonado J, Canabate F, Sempere L, Vela F, Sánchez AR, Narbona E, et al. The human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 reduces the incidence of gastrointestinal and respiratory infections in infants. A Randomised Controlled Trial comparing a prebiotic containing follow-on formula vs the same formula plus probiotic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, doi:10.1097/MPG.0b013e3182333f18, in press.
- [15] Rähä NC, Fazzolari-Nesci A, Cajozzo C, Puccio G, Monestier A, Moro G, et al. Whey predominant, whey modified infant formula with protein/energy ratio of 1.8 g/100 kcal: adequate and safe for term infants from birth to four months. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:275-81.
- [16] Koletzko B, von Kries R, Closa R, Escribano J, Scaglioni S, Giovannini M, et al. Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age two years: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1836-45.
- [17] Scientific Committee on Food. Report of the Scientific Committee on Food on the revision of essential requirements of infant formulae and follow-on formulae. SCF/CS/NUT/IF/65; 2003. <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out199_en.pdf>.
- [18] Agostoni C, Decsi T, Fewtrell M, Goulet O, Kolacek S, Koletzko B, et al. Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;99:110.
- [19] World Health Organization. Diarrhea (definition and sequelae). WHO; 2010 [Available from: <www.who.int/topics/diarrhoea/en>].
- [20] Wessel MA, Cobb JC, Jackson EB, Harris GS, Detwilwe AC. Paroxysmal fussing in infancy, sometimes called «colic». *Pediatrics* 1954;14:421-35.

- [21] Jiménez E, Langa S, Martín V, Arroyo R, Martín R, Fernández L, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Bacteriol* 2010;192:4800.
- [22] WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development. Geneva: World Health Organization; 2006.
- [23] Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M. Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Dairy Res* 2009;76:216-21.
- [24] Agget P, Agostini C, Goulet O, Hernell O, Koletzko B, Lafeber H, et al. The nutritional and safety assessment of breast milk substitutes and other dietary products for infants: a commentary by de ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:256-8.
- [25] Agget P, Agostini C, Axelsson I, Goulet O, Hernell O, Koletzko B, et al. ESPGHAN Committee on Nutrition. Core data for nutrition trials in infants: a discussion document - a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:338-42.
- [26] Clinical testing of infant formulae with respect to nutritional suitability for term infants. FDA guidances; June 1988.
<<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/InfantFormula/ucm170649.htm>>.
- [27] Vendt N, Grünberg H, Tuure T, Malminiemi O, Wuolijoki E, Tillmann V, et al. Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial. *J Hum Nutr Diet* 2006;19:51-8.
- [28] Chouraqui JP, Grathwohl D, Labaune JM, Hascoet JM, de Montgolfier I, Leclaire M, et al. Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulae containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1365-73.
- [29] Infante-Pina D, Badia-Llach X, Ariño-Armengol B, Villegas-Iglesias V. Prevalence values in formula-fed infants. *World J Gastroenterol* 2008;14:248-54.
- [30] 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.
- [31] Binns CW, Lee AH, Harding H, Gracey M, Barclay DV. The CUPDAY Study: prebiotic-probiotic milk product in 1-3-year-old children attending childcare centres. *Acta Paediatr* 2007;96:1646-50.
- [32] Picaud JC, Chapalain V, Paineau D, Zourabichvili O, Bornet FR, Duhamel JF. Incidence of infectious diseases in infants fed follow-on formula containing synbiotics: an observational study. *Acta Paediatr* 2010;99:1695-700.
- [33] Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, et al. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 1999;134:15-20.
- [34] Maldonado J, Lara-Villoslada F, Sierra S, Sempere L, Gómez M, Rodríguez JM, et al. Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in 6-month-old children. *Nutrition* 2010;26: 1082-7.
- [35] Laparra JM, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res* 2010;6:219-25.