

Пробиотик *Lactobacillus fermentum* СЕСТ571 6, выделенный из грудного молока, снижает частоту инфекций желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей у младенцев

¹José Maldonado, ²Francisco Cañabate, ³Luis Sempere, ²Francisco Vela, ²Ana R. Sánchez, ⁴Eduardo Narbona, ⁵Eduardo López-Huertas, ³Arjan Geerlings, ³Antonio D. Valero, ³Mónica Olivares, u ⁶Federico Lara-Villoslada

См. статью «Пробиотики: Ловля рыбы в океане» Vandenplas и Veereman-Wauters на странице 4.

Ключевые слова: последующая молочная смесь, младенцы, инфекция, *Lactobacillus fermentum*, пробиотики

(JPGN 2012;54:55-61)

АННОТАЦИЯ

Цели: Целью исследования было изучение влияния последующей молочной смеси, содержащих *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 (*L. fermentum*), на частоту инфекций у младенцев в возрасте от 6 до 12 месяцев.

Пациенты и методы: было проведено рандомизированное двойное слепое контролируемое исследование у младенцев в возрасте 6 месяцев. Младенцев рандомизированно распределили в группу применения последующей молочной смеси (питание дополнительное (детские смеси) для младенцев от 6 месяцев и детей до 3 лет) с добавлением *L. fermentum* и галактоолигосахарида (экспериментальная группа, ЭГ) или группу применения той же молочной смеси с добавлением только галактоолигосахарида (контрольная группа, КГ). Основным исходом была частота инфекций в течение 6-месячного периода исследования.

Результаты: В конце периода исследования в ЭГ наблюдалось значительное снижение частоты возникновения (ЧВ) желудочно-кишечных инфекций на 46 % (ЭГ: $0,196 \pm 0,51$, КГ: $0,363 \pm 0,53$, отношение ЧВ 0,54, 95 % доверительный интервал [ДИ]: $0,307 - 0,950$, $p = 0,032$), снижение частоты инфекций верхних дыхательных путей на 27 % (ЭГ: $0,969 \pm 0,96$, КГ: $1,330 \pm 1,23$, отношение ЧВ 0,729, 95 % ДИ: $0,46 - 1,38$, $p = 0,026$) и снижение общего количества инфекций на 30 % (ЭГ: $1,464 \pm 1,15$, КГ: $2,077 \pm 1,59$, отношение частоты возникновения 0,70, 95 % ДИ: $0,46 - 1,38$, $p = 0,003$) в сравнении с КГ.

Выводы: Применение последующей молочной смеси с добавлением *L. fermentum* СЕСТ5716 может нести пользу в отношении профилактики внебольничных инфекций желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей.

Получено: 28 января 2011 г.; принято в печать: 17 июля 2011 г.

¹Университетская больница Вирхен-де-лас-Ньевес, Гранада, ²больница «Пониенте-де-Эль-Эхидо, Карретера-де-Альмеримар, Эль-Эхидо (Альмерия), ³«Биосёч Лайф СА», Гранада, ⁴университетская больница Сан-Сесилио, Гранада, ⁵экспериментальная станция «Заидин», Верховный совет по научным исследованиям, Гранада и ⁶отделение безопасности пищевых продуктов и питания, «Пулева Фуд С.Л.» Гранада 18004, Испания.

Адрес для направления корреспонденции и запросов на перепечатку: Федерико Лара-Виллослада, д-р фармации, отдел безопасности пищевых продуктов и питания, «Пулева Фуд С.Л.» 66, Камино де Пурчиль, Гранада 18004, Испания (e-mail: flara@puleva.es).

Данную работу поддержала компания «Пулева Фуд С.Л.»
www.clinicaltrials.gov регистрационный номер: NCT012156156.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторское право © 2012 г. принадлежит Европейскому обществу специалистов в области детских гастроэнтерологии, гепатологии и питания и Северо-Американскому обществу специалистов в области детских гастроэнтерологии, гепатологии и питания

DOI: 10.1097/MPG.0b013e3182333f18

Во всём мире инфекционные заболевания являются самыми распространёнными типами недугов среди младенцев. Согласно данным за 2007 г., в Испании случаи госпитализации младенцев в возрасте до 1 года составляют более половины от всех случаев госпитализации вследствие инфекционных болезней, что в среднем составляет 2 174 случаев на 100 000 человек (1). Среди детей на грудном вскармливании наблюдается более низкая частота инфекций, чем среди детей на искусственном вскармливании, что отчасти может объясняться модуляцией кишечной микробиоты компонентами грудного молока (2). Действительно, у младенцев на грудном вскармливании, по всей видимости, развивается кишечная микробиота более богатая лактобациллами и бифидобактериями с более низким содержанием патогенных бактерий, чем у младенцев на искусственном вскармливании (3). Вскармливанием исключительно грудным молоком в первые 6 месяцев жизни имеет множество плюсов, поэтому рекомендуется именно такой способ кормления младенцев (4). В тех случаях, когда грудное вскармливание невозможно или недостаточно, молочная смесь является той альтернативой, которая может отчасти имитировать эффекты грудного молока. В последнее десятилетие было признано, что манипуляции с кишечной микрофлорой младенцев с помощью введения в их рацион пробиотических штаммов является потенциальным способом их применения в лечении и профилактике инфекционных заболеваний. В обзоре, выполненном Комитетом по вопросам питания при Европейском обществе специалистов в области детских гастроэнтерологии, гепатологии и питания (ESPGHAN), указано, что некоторые немногочисленные пробиотики, вводимые в питание младенцев в виде пищевых добавок или в составы молочных смесей, могут ассоциироваться со снижением риска развития неспецифических желудочно-кишечных (ЖК) инфекций и рисков, связанных с использованием антибиотиков ((5) и ссылки приведённые в этой статье). Однако научные данные, поддерживающие применение пробиотиков для профилактики инфекционных заболеваний, только начали появляться. Эффективность пробиотиков в профилактике внебольничных инфекций у детей была изучена в ходе нескольких рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), но опубликованные результаты были противоречивыми, указывая на то, что эффекты, наблюдавшиеся при использовании одного штамма пробиотика, не могут быть экстраполированы на другие штаммы, не говоря уже о различиях между исследованиями в отношении их популяций, дизайна и методов (6,7). Такие пребиотики, как галактоолигосахариды (ГОС), относятся к неусваиваемым питательным веществам, которые присутствуют в грудном молоке и стимулируют рост и метаболическую активность «полезных» бактерий в кишечной микробиоте, что также может иметь прямой иммунологический эффект (8,9).

Грудное молоко является для кишечника младенца источником кисломолочных бактерий, которые могут играть важную роль в защите младенца от инфекционных патогенов (10,11). Мы идентифицировали и выделили из грудного молока *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 и охарактеризовали безопасность и пробиотические свойства штамма, используя животные модели *in vitro* и РКИ у взрослых людей (12-15). Поскольку данный штамм естественным образом присутствует в грудном молоке, мы предположили, что его введение в молочную смесь может нести пользу младенцам на искусственном вскармливании. В ходе данного РКИ мы оценили эффект, который производит молочная смесь, содержащая *L fermentum* и ГОС, в сравнении с контрольной молочной смесью, содержащей только ГОС, на частоту инфекций у младенцев в возрасте от 6 до 12 месяцев.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Дизайн и протокол исследования

Рандомизированное двойное слепое контролируемое исследование в двух группах было проведено в сотрудничестве с детскими отделениями трёх испанских больниц: Университетская больница Сан-Сесилио (Гранада, Испания), Университетская больница Вирхен-де-лас-Ньевес (Гранада, Испания) и больница «Пониенте» в эль-Эхидо (Альмерия, Испания). Для исследования подходили живущие неподалёку от больниц матери, которые родили ребёнка в больнице и (или) регулярно посещали педиатра. С ними связались через акушерок исследования во время

запланированных визитов в больницу. Перед включением в исследование младенцы прошли физикальный осмотр, и в их медицинских картах изучили записи о ранее перенесённых заболеваниях и полученных режимах фармакологического лечения. В период с мая 2008 г. по июль 2009 г. в исследование включили здоровых 6-месячных младенцев, получавших исключительно грудное молоко, после того, как их родители или попечители предоставили письменное информированное согласие. К критериям исключения относились: нарушения со стороны ЖКТ (хроническая диарея или запор в анамнезе, гастроэзофагеальный рефлюкс), хирургическая операция на ЖКТ, аллергия на белок коровьего молока, метаболические расстройства (диабет, лактозная непереносимость), иммунодефицит, назначение антибиотикотерапии за 1 неделю до включения в исследование и предыдущее использование молочной смеси, содержащей пробиотики или пребиотики.

Размер выборки оценили на основании эффектов в отношении желудочно-кишечных инфекций. На основании ранее полученных данных по частоте диареи (16), исследование было спланировано таким образом, чтобы оно обладало достаточной мощностью (85 %) для выявления 20 % разницы между группами при уровне значимости 0,05. В каждую группу необходимо было включить по 83 младенца: однако мы набрали на 30 % больше младенцев с учётом возможного выбывания субъектов из исследования.

В общей сложности 215 младенцев были отобраны и распределены в две группы лечения согласно списку рандомизации, генерированному компьютерной программой (SIGESMU, Мадрид, Испания). В контрольной группе (КГ) применялась стандартная порошковая молочная смесь, обогащённая ГОС (0,4 г/100 мл), для дополнительного питания младенцев от 6 месяцев и детей до 3 лет, состав которой соответствует действующим требованиям Европейского союза, а в экспериментальной группе (ЭГ) применялась молочная смесь, в состав которой, помимо такого же количества ГОС, входил пробиотик *L. fermentum* CECT5716 (*L. fermentum* Hereditum, «Биорисёч Лайф», Гранада, Испания) в средней дозе 2×10^8 колониестимулирующих единиц (КОЕ)/день. Концентрацию пробиотика в молочной смеси анализировали и подтверждали каждые 2 месяца. Обе молочные смеси применялись в течение 6-месячного интервенционного периода. Последующие молочные смеси, предоставленные компанией «Пулева Фуд С.Л.» (Гранада, Испания), были упакованы в обычные одинаковые белые контейнеры с кодовым номером, который обозначал группу исследования. Для обеспечения маскировки распределения в группы исследования группа экспертов провела органолептическое исследование обеих молочных смесей и сделала вывод о том, что обе молочные смеси идентичны. Педиатры назначили младенцам ежедневное количество молочной смеси. Родители получили общие указания по прикорму согласно действующему руководству ESPGHAN (17). Согласно плану исследования, младенцы должны были пройти клиническую оценку в начале исследования в возрасте 6 месяцев (Т0), через 3 месяца после начала исследования в возрасте 9 месяцев (Т3) и через 6 месяцев после начала исследования в возрасте 12 месяцев (Т6). Образцы кала также собирали во временных точках Т0, Т3 и Т6. Исследуемые молочные смеси доставляли на дом каждые 2 месяца и забирали пустые контейнеры. Также применялись следующие критерии исключения во время исследования: несоблюдение протокола исследования, нежелательные эффекты, возникшие на фоне применения любой из исследуемых молочных смесей, и неявка на запланированные визиты в больницу.

Настоящее исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией; протокол был одобрен Региональным этическим комитетом Андалусской системы здравоохранения в Севилье (Испания).

Исходы в исследовании и сбор данных

Основным исходом в исследовании была частота инфекций, включая инфекции ЖКТ, респираторные инфекции, отит, инфекции мочевыводящих путей и другие менее распространённые инфекции. Дополнительными исходами были следующие показатели: масса тела, длина тела и окружность головы, фебрильные судороги, назначение антибиотиков и концентрации короткоцепочных жирных кислот (КЦЖК), иммуноглобулина (Ig) А и состав микробиоты в образцах кала. Дополнительным исходом также считалась частота рецидивов (определяемых как ≥ 3 явлений) респираторных инфекций.

Диагностика инфекционных заболеваний проводилась педиатром на каждом визите на основании специфических симптомов и стандартизированных определений. Инфекция ЖКТ определялась как жидкий или водянистый стул, по меньшей мере, 4 раза в день, сопровождающийся или повышенной температурой или рвотой или без них. Инфекция верхних дыхательных путей определялась как обильная слизь и (или) кашель в течение не менее чем двух дней подряд, сопровождающиеся такими симптомами, как повышенная температура, в том числе общий озноб, ларингит, фарингит/тонзилит, ларинготрахеит, острый ринит и острый риносинусит, или без них. Инфекции нижних дыхательных путей определялись как слизь и (или) кашель в течение двух или более дней подряд, сопровождающиеся такими симптомами, как повышенная температура, хрипящие и (или) крепитирующие звуки, включая острый бронхит, бронхиолит и пневмонию, или без них. Отит определялся как состояние, отвечающее следующим критериям: оталгия, выражающаяся у младенцев в необъяснимой возбудимости или внезапном пробуждении, недавно появившиеся оторрея или выбухание барабанной перепонки, сопровождающиеся сильным покраснением или без него. Инфекции мочевыводящих путей диагностировались на основании температуры тела выше 38 °С, пиурии (согласующиеся результаты двух анализов подряд с числом лейкоцитов не ниже 25/мл) и результатов посева мочи (согласующиеся результаты двух анализов подряд, указывающие на рост только одного микроорганизма $\geq 100\ 000$ КОЕ/мл). Другие типы инфекций включали ветрянку, конъюнктивит, кандидоз полости рта, вирус Эпштейна-Барра, герпесвирус и фебрильные судороги неустановленной этиологии.

В исследовании использовались три типа опросников: первый – опросник для запланированных визитов, заполнявшийся педиатром во время запланированных визитов (Т0, Т3, Т6), включал исследуемые параметры и явления, связанные со здоровьем младенца; второй – опросники для родительского ежедневника и для оценки, запланированной на 15-й день, в которых родители записывали количество выделений, респираторные симптомы, незапланированные визиты к врачу, диагностированные инфекции, особенности сна и плача, изменения в характере сна, эпизоды повышенной температуры, дискомфорт в ЖКТ и назначение антибиотиков. В опросник 15-го дня вносилась соответствующая обобщённая информация из ежедневников. Родителей проинструктировали по заполнению опросника и просили связаться с персоналом исследования в случае необходимости. Третий тип – внеочередные опросники, заполнявшиеся педиатрами во время незапланированных визитов, когда родители приходили к врачу при подозрении на инфекцию или возникновении проблем со здоровьем. В случае визита в отделение неотложной помощи копию сообщения от пациента отправляли педиатру для включения в файл данных исследования.

Подсчёт числа бактерий в образцах кала

Каждый образец кала гомогенизировали по отдельности пептонно-солевым раствором (100 мг/мл). Для оценки концентрации групп бактерий соответствующие разведения нанесли в четырёх экземплярах в на агар для культивирования молочнокислых бактерий по Манну, Рогозе и Шарпу (МРШ), агар МРШ с добавлением диклоксациллина в концентрации 0,5 мг/л, 1 LiCl г/л и L-цистеина гидрохлорида в концентрации 0,5 г/л для культивирования бифидобактерий, усиленный клостридиальный агар, содержащий полимиксин в концентрации 20 мкг/мл, для культивирования клостридий и агар с желчью и эскулином для культивирования бактериоидов. Все питательные среды были получены из компании «Оксид» (Бейсингстоук, Великобритания), а антибиотики и другие пищевые добавки были получены из компании «Сигма Кемикал Ко» (Сент-Луис, Миннесота). Культуральный планшет инкубировали в анаэробных условиях в течение 24 – 48 часов при температуре 37 °С. Аналогичным образом, 1 мл каждого подходящего разведения распределили в специальный петрифилм Count Plates Petrifilm (3 моль/л; Сент-Пол, Миннесота) для количественного определения общего числа аэробных бактерий. Петрифильмы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов, в условиях аэробноза. После инкубации рассчитали рост колоний на селективной питательной среде и логарифм числа жизнеспособных микроорганизмов на 1 грамм кала (число колониеобразующих единиц на грамм), полученные результаты представили как среднее \pm стандартная ошибка среднего (СОС).

Подсчёт числа короткоцепочных жирных кислот

Образцы кала гомогенизировали с раствором NaHCO_3 в концентрации 150 ммоль/л (рН 7,8) (1:5, масса/объём) в аргонной атмосфере. Гомогенизированные образцы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов и до выделения КЦЖК хранили при температуре -80 °С. Для выделения КЦЖК к 1 мл гомогената добавили 50 мкл раствора 2-метилвалериановой кислоты в концентрации 100 моль/л (внутренний стандарт), 10 мкл серной кислоты и 0,3 мл этилацетата. Смесь центрифугировали со скоростью 10 000 г в течение 5 минут при температуре 4 °С. Супернатанты дегидрировали сульфатом натрия (безводным) и центрифугировали со скоростью 10 000 г в течение 5 минут при температуре 4 °С. Затем образец (0,5 мл) инокулировали в газовый хроматограф без деления потока (режим CP-3800; «Вариан», Лейк-Форест, Калифорния) оснащённый внутренним диаметром (CPWAX 52CB 60 м x 0,25 мм) и подключённый к пламенно-ионизационному детектору («Вариан»). В качестве газа-носителя и вспомогательного газа использовали гелий, скорость потока составила 1,5 мл/мин. Температура ввода составила 250 °С. Концентрации ацетата, пропионата и бутирата автоматически рассчитали по площадям соответствующих пиков, используя программу рабочей станции Star Chromatography (версия 5.5), подключённую онлайн к пламенно-ионизационному детектору.

Подсчёт числа IgA в образцах кала

Каждый образец кала гомогенизировали по отдельности пептонно-солевом растворе (100 мг/мл) и центрифугировали со скоростью 10 000 г в течение 5 минут при температуре 4 °С. Концентрации IgA в супернатантах измерили при помощи наборов для количественного ИФА, следуя инструкциям производителя («Бетил», Монтгомери, Техас).

Статистический анализ

Анализ полученных данных выполнил специалист по статистике, используя пакетную программу для статистического анализа STATA 11.1 («СтейтаКорп ЛП», Колледж-Стейшн, Техас). В пуассоновской многоуровневой регрессии использовалась схема фиксированных эффектов/случайной секущей, рассматривающая 2 уровня организации данных: факторами фиксированных эффектов были группа исследования (контрольная и экспериментальная) и период (0 – 3 месяца, 3 – 6 месяцев), а факторами случайных эффектов были дети, помещённые в группу, и показатели за определённый период, полученные у каждого ребёнка. Значения отношения частоты возникновения (ОЧВ) были рассчитаны на компьютере как показатели эффекта с использованием количества явлений в качестве зависимой переменной. Все данные об инфекциях, возникших с 0 до 6 месяца, объединили и проанализировали с использованием классической пуассоновской регрессии, и для соответствующих зависимых переменных на компьютере рассчитали классическую логистическую регрессию. Значения ЧВ рассчитали как количество диагнозов (числитель), разделённое на внесённый человеко-год. Этот анализ дал значения ОЧВ, 95 % ДИ и *p*-значения.

Если переменные были числовыми, то, как и в предыдущем случае, использовалась модель многоуровневой линейной регрессии. Результаты, полученные из разных центров, также обработали по отдельности и сравнили между собой, при этом статистически значимых различий между центрами не наблюдалось (данные не приводятся).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Популяция исследования

Из 215 младенцев, рандомизированно распределённых в 2 группы исследования, 27 младенцев были исключены из исследования (7 в КГ и 20 в ЭГ) по следующим причинам: 3 младенца переехали из зоны проведения исследования (1 в КГ и 2 в ЭГ), 7 младенцев не получили экспериментальную молочную смесь с пробиотиками, и ошибка была выявлена после того, как они не пришли на первый визит к врачу, 7 младенцев были исключены после завершения

исследования из-за того, что собранные у них данные были неполными (2 в КГ и 5 в ЭГ), и 10 младенцев не пришли на исходные визиты к врачу (4 в КГ и 6 в ЭГ). Таким образом, общее количество проанализированных добровольцев (завершивших исследование без существенных отклонений от протокола) составило 188 человек, 91 из которых были в КГ, и 97 – в ЭГ. На рисунке 1 приведена схема распределения участников в исследовании. До включения в исследование никто из набранных детей не получал молочные смеси с пробиотиками, поскольку на момент набора в исследование на испанском рынке не было ни одной молочной смеси для младенцев (от 0 до 6 месяцев), обогащённой пробиотиками. Ни в одном из проанализированных исходных параметров между двумя группами не наблюдалось статистически значимых различий (таблица 1).

В наборе и мониторинге детей принимали участие пять педиатров (J.M., F.C., F.V., A.R.S. и E.N.) из 3 центров. Больница «Вирхен-де-лас-Ньевес» (Гранада, Испания), клиническая больница (Гранада, Испания) и больница «Пониенте» (Альмерия, Испания). В каждом центре были включены и наблюдались 68, 64 и 56 младенцев соответственно.

Потребление молочной смеси, переносимость и рост

Обе молочные смеси, использованные в исследовании, хорошо переносились и уровень соблюдения назначенного режима питания был хорошим. Нежелательных явлений, связанных с потреблением молочных смесей (в том числе симптомов в верхнем отделе ЖКТ, например, срыгивания) не наблюдалось, и никто из добровольцев не покинул исследование в интервенционном периоде. Между двумя группами исследования не наблюдалось значительных различий в ежедневном потреблении молочной смеси (КГ: 741 ± 146 мл/день против ЭГ: 732 ± 150 мл/день; таблица 1). В результате рандомизации между группами исследования имелись значительные различия в показателях длины тела ($p = 0,047$) и окружности головы ($p = 0,029$). Во временных точках Т3 и Т6 между группами исследования не наблюдалось различий в массе, длине тела, окружности головы и росте, указывая на то, что исследуемые молочные смеси были безопасными (таблица 2).

Здоровье ребёнка

В течение 6-месячного вмешательства у 72,5 % младенцев наблюдались инфекции дыхательных путей, у 15,7 % младенцев наблюдались инфекции ЖКТ, 5,7 % младенцев перенесли отит, у 1,8 % младенцев наблюдались инфекции мочевыводящих путей, и у 4,2 % младенцев были зарегистрированы другие типы инфекций, указанные в разделе «Методы исследования» (таблица 3).

В конце периода исследования в ЭГ наблюдалось значительное снижение ЧВ желудочно-кишечных инфекций на 46 % ($0,196 \pm 0,51$) в сравнении с контрольной группой ($0,363 \pm 0,53$) (отношение ЧВ: 0,54, 95 % ДИ: 0,307 – 0,950, $p = 0,032$). В том что касается общего количества респираторных инфекций, в конце периода в ЭГ наблюдалось значительное снижение на 26 % ($p = 0,022$) ЧВ ($1,093 \pm 1,09$) в сравнении с контрольной группой ($1,473 \pm 1,31$) (отношение ЧВ: 0,74, 95 % ДИ: 0,580 – 0,957, $p = 0,022$). В 90 % случаев инфекции дыхательных путей относились к инфекциям верхних дыхательных путей. В сравнении с контрольной группой, в ЭГ наблюдалось снижение на 27 % частоты инфекций верхних дыхательных путей (отношение ЧВ: 0,729, 95 % ДИ: 0,46 – 1,38, $p = 0,026$), при этом между группами не наблюдалось значительных различий в частоте инфекций нижних дыхательных путей. В ЭГ также наблюдалось снижение на 72 % частоты рецидивов респираторных инфекций.

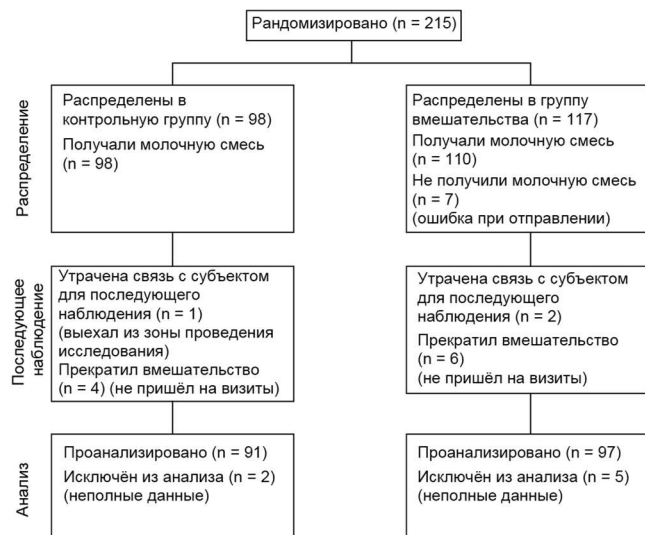


РИСУНОК 1. Схема распределения участников исследования.

Возможно, из-за небольшого количества явлений, зарегистрированных в каждой группе исследования, между группами не наблюдалось значительных различий в ЧВ отита, инфекций мочевыводящих путей и других типов инфекций. В том что касается общего количества респираторных инфекций, в конце периода в ЭГ наблюдалось значительное снижение ЧВ на 30 % ($1,464 \pm 1,15$) в сравнении с контрольной группой ($2,077 \pm 1,59$) во временной точке Т6 (отношение ЧВ: 0,70, 95 % ДИ: 0,46 – 1,38, $p = 0,003$).

В том что касается антибиотикотерапии и количества эпизодов фебрильных судорог, значительных различий между группами исследования не наблюдалось. Явления диареи, связанные с приёмом антибиотиков, наблюдались у 17,5 % младенцев в контрольной группе и у 9,6 % младенцев в ЭГ (незначительные различия, $p = 0,234$).

Параметры анализа образцов кала

Только 145 образцов кала (80 %), собранные во временных точках Т0, Т3 и Т6, попали в лабораторию в хорошем состоянии и были проанализированы. В том что касается кишечной микробиоты (таблица 4), в конце исследования в ЭГ число лактобацилл и бифидобактерий было значительно выше ($p = 0,008$ и $p = 0,022$ соответственно), чем в контрольной группе. При сравнении данных, полученных в каждой группе во временных точках Т0 и Т6, в ЭГ наблюдалась только повышающаяся тенденция для числа лактобацилл и бифидобактерий, а в КГ – только снижающаяся тенденция. Внутри каждой группы между разными временными точками не наблюдалось значительных различий в числе других проанализированных групп бактерий, также не наблюдалось значительных межгрупповых различий в количестве КЦЖК в образцах кала (бутировая, пропионовая и уксусная кислоты). Наконец, на протяжении всего периода исследования в обеих группах наблюдалась одинаковая концентрация фекального IgA.

ТАБЛИЦА 1. Исходные характеристики участников исследования

| | Контрольная группа (n = 91) | Экспериментальная группа (n = 97) |
|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| Мужской пол/женский пол, n (%) | 40/51 (44/56) | 54/43 (56/44) |
| Возраст на момент включения в исследование (месяцы), среднее \pm СО | $6,5 \pm 1,3$ | $6,5 \pm 1,2$ |
| Кесарево сечение, % | 45 | 45 |
| Гестационный возраст (недели), среднее \pm СО | $38,9 \pm 1,4$ | $38,8 \pm 1,4$ |
| На грудном вскармливании до начала периода исследования, % | 71 | 69 |
| Общая длительность исключительно грудного вскармливания, мес., (диапазон) | 2,8 (0,5 – 6,5) | 3,0 (0,5 – 6,5) |
| Дневной объём назначенной молочной смеси, мл, среднее \pm СО | 741 ± 146 | 732 ± 150 |
| Прикорм, % | 100 | 100 |

| | | |
|---|----|----|
| Вакцинация против ротавируса, % | 75 | 74 |
| Детский сад или приходящая няня, % | 25 | 27 |
| Домашние животные, % | 13 | 16 |
| Курение в период беременности или кормления грудью, % | 21 | 21 |
| Курение в доме, % | 37 | 38 |

СО = стандартное отклонение.

ТАБЛИЦА 2. Антропометрические измерения в исходной точке исследования, а также через 3 и 6 месяцев и прибавка в массе тела в период Т0 – Т6 у младенцев, получавших контрольную молочную смесь или молочную смесь с добавлением пробиотика

| Параметры роста | Контрольная группа | | | Экспериментальная группа | | | | |
|------------------------|--------------------|------------|------------|--------------------------|-------------|------------|------------|-----------------------|
| | Т0 | Т3 (мес.) | Т6 (мес.) | Прибавка в массе тела | Т0 | Т3 (мес.) | Т6 (мес.) | Прибавка в массе тела |
| Масса тела (кг) | 7,8 ± 1,0 | 9,2 ± 1,58 | 9,9 ± 1,5 | 2,3 ± 0,7 | 7,4 ± 1,0 | 8,8 ± 1,1 | 9,7 ± 1,5 | 2,4 ± 0,7 |
| Длина тела (см) | 66,6 ± 3,2 | 71,5 ± 2,8 | 75,2 ± 3,0 | 8,8 ± 2,4 | 65,6 ± 3,3* | 70,2 ± 4,0 | 74,3 ± 3,8 | 8,7 ± 2,3 |
| Окружность головы (см) | 43,7 ± 1,4 | 45,7 ± 1,4 | 47,1 ± 1,4 | 3,4 ± 0,9 | 43,2 ± 1,4* | 45,4 ± 1,4 | 46,6 ± 1,6 | 3,5 ± 1,0 |

Значения указаны как среднее ± СОС.

* $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

ТАБЛИЦА 3. Частота инфекционных заболеваний, фебрильных судорог и антибиотикотерапии в интервенционном периоде

| | Контрольная группа (n = 91) | | Экспериментальная группа (n = 97) | | Отношение частоты (95 % ДИ) | Снижение частоты, % | p-значение |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------|------------|
| | Количество во явлений | Частота (СО) | Количество явлений | Частота (СО) | | | |
| Желудочно-кишечные инфекции | 33 | 0,363 (0,53) | 19 | 0,196 (0,51)* | 0,54 (0,31 – 0,95) | 46 | 0,032 |
| Инфекции дыхательных путей | 134 | 1,470 (1,31) | 106 | 1,093 (1,00)* | 0,74 (0,58 – 0,96) | 26 | 0,022 |
| Инфекции верхних дыхательных путей | 121 | 1,330 (1,23) | 94 | 0,969 (0,96)* | 0,73 (0,56 – 0,95) | 27 | 0,021 |
| Инфекции нижних дыхательных путей | 13 | 0,143 (0,35) | 12 | 0,124 (0,33) | 0,87 (0,40 – 1,90) | 13 | 0,719 |
| Отит | 12 | 0,132 (0,34) | 7 | 0,072 (0,26) | 0,55 (0,22 – 1,32) | 45 | 0,177 |
| Инфекции мочевыводящих путей | 5 | 0,055 (0,22) | 1 | 0,010 (0,10) | 0,19 (0,02 – 1,56) | 81 | 0,083 |
| Другие инфекции* | 5 | 0,055 (0,22) | 9 | 0,093 (0,29) | 1,69 (0,50 – 1,85) | 69 | 0,326 |
| Общее количество случаев инфекции | 189 | 2,08 (1,59) | 142 | 1,46 (1,16)* | 0,70 (0,57 – 0,88) | 30 | 0,002 |
| Фебрильные судороги | 78 | 0,857 (0,90) | 67 | 0,690 (0,88) | 0,81 (0,68 – 0,94) | 19 | 0,203 |
| Лечение антибиотиками | 57 | 0,626 (0,90) | 52 | 0,536 (0,70) | 0,86 (0,59 – 1,24) | 14 | 0,445 |

ДИ = доверительный интервал; СО = стандартное отклонение.

Другие типы инфекций включают ветрянку, вирус Эпштейна-Барра, герпесвирус, кандидоз полости рта, конъюнктивит и фебрильные судороги неустановленной этиологии.

ТАБЛИЦА 4. Количественные показатели кишечной микробиоты в образцах кала младенцев (указанные как логарифм КОЕ/г), концентрация фекальных КЦЖК и IgA

| | Контрольная группа, n = 70 | | | Экспериментальная группа, n = 75 | | |
|-----------------------------|----------------------------|------------|------------|----------------------------------|------------|-------------|
| | Т0 | Т3 (мес.) | Т6 (мес.) | Т0 | Т3 (мес.) | Т6 (мес.) |
| Группа бактерий | | | | | | |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | 7,85 ± 0,1 | 7,72 ± 0,1 | 7,68 ± 0,1 | 7,81 ± 0,1 | 7,86 ± 0,1 | 8,06 ± 0,1* |
| <i>Corynebacterium</i> spp. | 8,07 ± 0,1 | 7,84 ± 0,1 | 7,81 ± 0,1 | 7,93 ± 0,1 | 8,06 ± 0,1 | 8,16 ± 0,1* |
| <i>Clostridium</i> spp. | 7,77 ± 0,1 | 7,57 ± 0,1 | 7,54 ± 0,1 | 7,74 ± 0,1 | 7,64 ± 0,1 | 7,61 ± 0,1 |
| <i>Bacteroides</i> spp. | 7,64 ± 0,1 | 7,65 ± 0,1 | 7,61 ± 0,1 | 7,86 ± 0,1 | 7,86 ± 0,1 | 7,65 ± 0,1 |
| КЦЖК, мг/г кала | | | | | | |
| Ацетат | 10,7 ± 0,8 | 10,0 ± 1,3 | 10,1 ± 0,8 | 9,9 ± 1,03 | 9,6 ± 0,5 | 11,3 ± 1,1 |
| Пропионат | 1,85 ± 0,1 | 2,17 ± 0,2 | 2,17 ± 0,2 | 2,20 ± 0,4 | 2,30 ± 0,4 | 2,35 ± 0,3 |
| Бутират | 2,15 ± 0,2 | 2,76 ± 0,4 | 2,94 ± 0,2 | 2,53 ± 0,5 | 3,05 ± 0,3 | 2,92 ± 0,3 |
| IgA, мкг/г кала | 328 ± 244 | НО | 322 ± 212 | 329 ± 170 | НО | 316 ± 242 |

Значения указаны как среднее ± СОС. IgA = иммуноглобулин А; НО = не обнаружено; КЦЖК = короткоцепочная жирная кислота.

* $p < 0,05$ при сравнении с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы доказали, что у младенцев, получающих последующие молочные смеси, обогащённые *L. fermentum*, снижается частота ЖК и респираторных инфекций. Это было первое исследование эффектов бактерий *L. fermentum* при их введении в рацион младенцев. Штамм *L. fermentum* был выбран ввиду того, что он естественным образом присутствует в грудном молоке (10). Этот штамм также способен колонизировать молочную железу при его пероральном введении кормящим грудью матерям в капсулах в сравнении с контрольной группой (15). Помимо происхождения *L. fermentum* и его способности колонизировать кишечник человека (14), данный штамм также был выбран из-за его безопасности (13,18), противоиных (19) и иммуномодулирующих (20) свойств. Кроме того, в ходе двух РКИ у взрослых субъектов было доказано, что *L. fermentum* может снижать частоту эпизодов, связанных с гриппом, при его введении до и после вакцинации (14), и что он является эффективной альтернативой использованию антибиотиков в лечении инфекционного мастита в период лактации (15). Данное исследование было запланировано с целью изучения пользы *L. fermentum* для здоровых детей. В обеих группах использовалась стандартная последующая молочная смесь, содержащая умеренное количество ГОС, которые, теоретически, должны были усилить эффекты пробиотического штамма, принимая во внимание, что ранее была описана способность ГОС стимулировать рост и активность «полезной» кишечной микрофлоры (8,9). Полученные результаты указывают на то, что в конце исследования у младенцев, получавших экспериментальную молочную смесь, содержащую *L. fermentum*, снизилась частота ЖК инфекций, респираторных инфекций, включая инфекции верхних дыхательных путей, и, в целом, наблюдалось меньше инфекционных заболеваний, чем у младенцев, получавших контрольную молочную смесь.

Набор в исследование продолжался 13 месяцев, и охватывал сезоны, в течение которых обычно наблюдается высокая частота респираторных и ЖК инфекций. Определение ЖК инфекций (жидкий или водянистый стул не менее чем 4 раза в день) был более строгим, но всё же соответствовало определению диареи, приведённому в руководстве Всемирной организации здравоохранения (21), или определению острого гастроэнтерита, приведённому в руководстве ESPGHAN (22), и широко использовалось в клинических исследованиях способов профилактики диареи (23). При использовании этого определения значения частоты ЖК инфекций в обеих группах согласуются с сообщёнными значениями ЧВ у младенцев данной возрастной группы в южной Испании, варьирующимися от 0,4 до 0,6, при этом среднее количество эпизодов составило 0,47 эпизодов в год (24). Значения частоты респираторных инфекций, полученные в данном исследовании, также согласовывались с сообщёнными значениями среди младенцев данного возраста (1).

Уровень снижения частоты ЖК инфекций, зарегистрированный в ЭГ, был сопоставим с таковым, наблюдавшимся в других исследованиях, в ходе которых сообщалось об успешной профилактике внебольничных ЖК инфекций или эпизодов диареи благодаря использованию детских молочных смесей, обогащённых пробиотиками. Например, применение молочной смеси, содержащей *Bifidobacterium lactis* в концентрации 10^7 КОЕ/г или *Lactobacillus reuteri* в концентрации 10^7 КОЕ/г, у детей в возрасте от 4 до 10 месяцев в течение 3 месяцев снизило количество эпизодов диареи на 58 % и 92 % соответственно в сравнении с контрольной группой (7). В другом исследовании, в котором использовалась молочная смесь, содержащая *B. lactis* в концентрации 2×10^7 КОЕ/г и смесь пребиотиков в концентрации 14 мг/г, частота диареи снизилась на 20 % в сравнении с контролем (25). В ходе недавно проведённого широкомасштабного исследования было установлено, что применение в течение 3 месяцев *B. longum* в концентрации 10^7 КОЕ/г, *Streptococcus thermophilus* в концентрации 10^6 КОЕ/г и ГОС в концентрации 28 мг/г снижает частоту ЖК инфекций на 50 % (26).

В данном исследовании наблюдалось незначительное снижение общей частоты респираторных инфекций на 26 %. Возможно из-за небольшого количества случаев инфекции нижних дыхательных путей (12 в ЭГ и 13 в КГ), указанный результат относится только к инфекциям верхних дыхательных путей.

В трёх исследованиях было установлено снижение частоты респираторных инфекций в группах применения пробиотических штаммов у младенцев. В РКИ у 571 ребёнка в возрасте от 1 года до 6 лет применение *Lactobacillus GG* в течение 7 месяцев привело к уменьшению на 17 % числа детей с осложнёнными инфекциями дыхательных путей (16). В другом РКИ у 281 ребёнка (в возрасте от 1 года до 7 лет) применение *Lactobacillus GG* в течение 3 месяцев привело к снижению на 33 % риска развития инфекции верхних дыхательных путей в сравнении с контролем (27). Результаты недавно проведённого РКИ у 69 новорождённых младенцев указывают на то, что применение *Bifidobacterium animalis* ВВ-12 снижает количество респираторных инфекций примерно на 30 % в сравнении с контролем (6). В дополнительных исследованиях сообщалось о тенденциях (28) или об отсутствии каких-либо эффектов (7,16,26). Образцы кала проанализировали, чтобы выяснить возможный механизм, ответственный за снижение количества ЖК инфекций. Хотя в течение периода исследования выработка КЦЖК и IgA не изменилась, потребление экспериментальной молочной смеси привело к повышению на 78 % числа лактобацилл и на 70 % числа бифидобактерий в конце исследования. Эти изменения в кишечной микрофлоре могут, по меньшей мере, отчасти, объяснять наблюдавшееся в данной группе снижение количества эпизодов ЖК инфекций.

Вызывает интерес тот факт, что в ЭГ значительно увеличилась популяция бифидобактерий, несмотря на добавление в молочную смесь только лактобацилл. Этот феномен наблюдался и при использовании других пробиотических штаммов (29,30). Предположительно, число бифидобактерий может увеличиваться в результате метаболической активности, конкуренции за питательные вещества и связывания лактобацилл с клетками кишечника, что может способствовать росту бифидобактерий. В ходе исследований в условиях *in vitro* и *in vivo* мы доказали, что бактерии *L fermentum* обладают высокой скоростью клеточной адгезии, вырабатывают несколько субстратов с противомикробной активностью, высвобождают значительное количество антиоксиданта глутатиона и при определённых условиях способны синтезировать бифидогенные углеводы (11,19). Кроме того, результаты исследований *in vitro* свидетельствуют о том, что бактерии *L fermentum* подавляют адгезию некоторых патогенных бактерий с клетками слизистой оболочки кишечника и повышают экспрессию муцинов, что также может вносить определённый вклад в антиинфекционный эффект этого пробиотического штамма (19). Хотя в ходе предыдущих исследований было доказано, что бактерии *L fermentum* способны колонизировать кишечник (14), но в данном исследовании не подсчитывалось количество *L fermentum*, что ограничивало интерпретацию полученных результатов. Ещё одним ограничением было то, что образцы кала младенцев, у которых диагностировали ЖК инфекции, не анализировались на отдельные патогены.

В том что касается механизма, лежащего в основе эффектов в отношении респираторных инфекций, в ходе предыдущего исследования у взрослых субъектов, проведённого с использованием *L fermentum* в сочетании с вакциной против гриппа, в ЭГ наблюдалось значительное снижение частоты гриппоподобных заболеваний (в том числе респираторных симптомов). Это снижение объяснялось увеличением доли естественных клеток-киллеров. Число Т-лимфоцитов хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в ЭГ в сравнении с контролем (14). В настоящем исследовании между группами не наблюдалось различий в концентрации фекального IgA. Поскольку в данном исследовании образцы крови у младенцев не собирали, можно только предположить, что, возможно, в основе снижения частоты респираторных инфекций лежит стимуляция иммунного ответа. Кроме того, ещё одним ограничением настоящего исследования было отсутствие младенцев, получающих исключительно грудное молоко.

Сообщалось о том, что в грудном молоке содержатся олигосахариды, обладающие противовоспалительными и противомикробными свойствами (31). Поскольку ГОС присутствовали в составе обеих молочных смесей (в концентрации 0,5 г/100 ккал), эффекты, наблюдавшиеся в настоящем исследовании, не могут быть отнесены к содержанию ГОС. *L fermentum* и ГОС могут оказывать синергетическое действие, которое может превосходить пользу этих компонентов по отдельности. Однако в планы настоящего исследования не входило изучение потенциальных синергетических эффектов комбинации *L fermentum* и ГОС, и данный аспект следует рассмотреть в будущих исследованиях.

Таким образом, принимая во внимание значительное снижение количества инфекций, применение последующих молочных смесей, обогащённых *L. fermentum*, может нести пользу в отношении профилактики внебольничных инфекций ЖКТ и верхних дыхательных путей у младенцев. Перед разработкой рекомендаций требуется провести дополнительные контролируемые клинические исследования для изучения эффектов от применения *L. fermentum* в отдельности или в комбинации с другими штаммами в разных популяциях, используя биомаркеры и разные возрастные группы младенцев.

Благодарность: Авторы выражают благодарность д-ру Хуану де Диос Луна из отделения биостатистики Университета Гранады за помощь в проведении статистического анализа данных и рандомизации младенцев в разные группы исследования. Также авторы признательны компании «Пулева Фуд» за предоставленную последующую молочную смесь, использованную в исследовании, и компании «Биосёч Лайф С.А.» (ранее «Пулева Биотек С.А.») за предоставленные пробиотики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL, Alfaro M. Indicadores de salud 2009. *Evolución de los indicadores del estado de salud en España y su magnitud en el contexto de la Unión Europea*. Madrid: Ministerio de sanidad y Política Social; 2009:128.
2. Wold AL, Adlerberth I. Breast feeding and the intestinal microflora of the infant-implications for protection against infectious diseases. *Adv Exp Med Biol* 2000;478:77-93.
3. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1035S-45S.
4. *The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding. Report of an Expert Consultation*. WHO/NHD/01.09, WHO/FCH/CAH/01.24. Geneva: World Health Organization; 2001.
5. Wolvers D, Antoine JM, Myllyluoma E, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *J Nutr* 2010;140:698S-712S.
6. Taipale T, Pienihäkkinen K, Isolauri E, et al. Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr* 2010;24:1-7.
7. 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.
8. Boehm G, Stahl B. Oligosaccharides from milk. *J Nutr* 2007;137(3 suppl 2):847S-9S.
9. Schley PD, Field CJ. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr* 2002;87(suppl 2):S221-30.
10. Martin R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003;143:754-8.
11. Martin R, Olivares M, Marin ML, et al. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Hum Lact* 2005;21:8-17.
12. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, et al. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* 2007;98(suppl 1):S96-100.
13. Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, et al. Safety assessment of Lactobacillus fermentum CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Dairy Res* 2009;76:216-21.
14. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, et al. Oral intake of Lactobacillus fermentum CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007;23:254-60.
15. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, et al. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010;15:1551-8.
16. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä 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.
17. Agostoni C, Decsi T, Fewtrell M, et al. ESPGHAN Committee on Nutrition. Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46:99-110.

18. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA on the introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J* 2007;587:1-16.
19. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, et al. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006;101:72-9.
20. Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 2007;102:337-43.
21. World Health Organization. Diarrhea (definition and sequelae). <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en>. Accessed November 18, 2011.
22. Guarino A, Albano F, Ashkenazi S, et al. ESPGHAN/ESPID, European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases. Evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46:619-21.
23. Johnston BC, Shamseer E, da Costa BR, et al. Measurement issues in trials of pediatric acute diarrheal diseases: a systematic review. *Pediatrics* 2010;126:e222-31.
24. Calderon S. Incidencia de diarreas en una cohorte de niños de la ciudad de Sevilla. *An Esp Pediatr* 1990;32:114-8.
25. Binns CW, Lee AH, Harding H, et al. The CUPDAY Study: prebiotic-probiotic milk product in 1-3-year-old children attending childcare centres. *Acta Paediatr* 2007;96:1646-50.
26. Picaud JC, Chapalain V, Paineau D, et al. Incidence of infectious diseases in infants fed follow-on formula containing synbiotics: an observational study. *Acta Paediatr* 2010;99:1695-700.
27. Hojsak I, Snovak N, Abdović S, et al. *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr* 2010;29:312-6.
28. Puccio G, Cajazzo C, Meli F, et al. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. *Nutrition* 2007;23:1-8.
29. Gueimonde M, Sakata S, Kalliomäki M, et al. Effect of maternal consumption of *Lactobacillus* GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:166-70.
30. Sierra S, Lara-Villoslada F, Sempere L, et al. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults. *Anaerobe* 2010;16:195-200.
31. Kunz C, Rudloff S. Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol* 2008;606:455-65.