

Proporcionado para la investigación no comercial y uso educacional.
No es para su reproducción, distribución o uso comercial.



Este artículo apareció en una revista publicada por Elsevier. La copia adjunta se entrega al autor para uso interno de investigación y educación no comercial, incluso para instrucción en la institución del autor y para compartir con colegas.

Se prohíben otros usos, incluida la reproducción y distribución, la venta o la concesión de licencias de copias, o la publicación en sitios web personales, institucionales o de terceros.

En la mayoría de los casos, los autores pueden publicar su versión del artículo (por ejemplo, en formato Word o Tex) en su sitio web personal o repositorio institucional. Se anima a los autores que necesiten más información sobre las políticas de archivo y manuscritos de Elsevier a visitar:

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

Lactobacillus fermentum CECT 5716 es seguro y bien tolerado en bebés de 1 a 6 meses de edad: un ensayo controlado aleatorizado

Mercedes Gil-Campos^a, Miguel Ángel López^b, Ma Victoria Rodríguez-Benítez^a, Julio Romero^b, Inés Roncero^a, Ma Dolores Linares^b, Jose Maldonado^b, Eduardo López-Huertas^c, Regina Berwind^d, Kristin L. Ritzenthaler^d, Víctor 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 Hospital Universitario Reina Sofía, Avenida Menéndez Pidal, S/N, 14004 Córdoba, España

^b Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Avenida de las Fuerzas Armadas 2, 18014 Granada, España

^c Estación Experimental Zaidín, Consejo Superior Investigaciones Científicas. Profesor Albareda 1, 18008 Granada, España

^d HiPP GmbH & Co Vertrieb KG, Georg-Hipp-Str. 7, D-85276 Pfaffenhofen, Alemania

^e Hospital Universitario Carlos Haya, Avenida Carlos Haya, S/N, 29010 Málaga, España

^f Biosearch Life SA, 66, Camino de Purchil 66, 18004 Granada, España

^g Departamento de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Puleva Food SL, Camino de Purchil 66, 18004 Granada, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historial del artículo:

Recibido el 27 de septiembre de 2011

Recibido en forma revisada el 24 de noviembre de 2011

Aceptado el 25 de noviembre de 2011

Palabras clave:

Probiótico

Lactobacillus fermentum

Seguridad

Tolerancia

Formula infantil

Infeción

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la seguridad y tolerancia de una fórmula infantil suplementada con *Lactobacillus fermentum* CECT5716, una cepa probiótica aislada de la leche materna, en bebés de 1 a 6 meses de edad. Se realizó un estudio controlado aleatorio doble ciego que incluyó a niños sanos. Los bebés de un mes recibieron una fórmula infantil prebiótica suplementada con *L. fermentum* (grupo experimental) o la misma fórmula sin la cepa probiótica (grupo de control) durante 5 meses. El resultado principal del estudio fue el aumento de peso diario promedio entre el inicio y los 4 meses de edad. Los resultados secundarios fueron otros datos antropométricos (longitud y perímetro cefálico), consumo de fórmula y tolerancia. Los pediatras también registraron la incidencia de infecciones.

No se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre ambos grupos, ni a los 4 meses de edad ($29,0 \pm 7,8$ vs $28,9 \pm 5,7$ g / día) ni a los 6 meses ($25,1 \pm 6,1$ vs $24,7 \pm 5,2$ g / día). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el consumo de las fórmulas o síntomas relacionados con la tolerancia de la fórmula. La tasa de incidencia de infecciones gastrointestinales en los lactantes del grupo de control fue 3 veces mayor que en el grupo de probióticos ($p = 0,018$). Por lo tanto, el consumo de una fórmula prebiótica para lactantes enriquecida con la cepa probiótica de la leche materna *L. fermentum* CECT5716 de 1 a 6 meses de vida es bien tolerado y seguro. Además, el consumo de esta fórmula puede mejorar la salud de los bebés al reducir la incidencia de infecciones gastrointestinales.

© 2011 Elsevier Ltd. Todos los derechos reservados.

1. Introducción

La mayoría de los estudios informan que la microbiota fecal de los lactantes amamantados difiere de la de los lactantes alimentados con fórmula [1] y podría ser responsable, al menos en parte, de algunos de los efectos beneficiosos observados en estos lactantes [2, 3]. De hecho, la microbiota desempeña una variedad de funciones para el huésped e incluso se considera el "órgano olvidado" [4].

Abreviaturas: ECA, ensayo controlado aleatorio; GOS, galactooligosacáridos; GC, grupo de control; EG, grupo experimental; AGCC, ácidos grasos de cadena corta; GI, infecciones gastrointestinales; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; LRM, modelos de regresión lineal; GLM, modelos lineales generalizados; RI, tasa de incidencia; NNT, bebés que necesitan tratamiento.

* Correspondencia al autor. Tel.: +34 958 240152; fax: +34958 240160.

Dirección de correo electrónico: molivares@biosearchlife.com (M. Olivares).

Estas diferencias en la microbiota se deben probablemente a la presencia de bacterias del ácido láctico en la leche materna, además de otros compuestos bifidogénicos como los oligosacáridos que se transfieren de la madre al lactante por la lactancia [5,6]. Por estas razones, las fórmulas infantiles se complementan cada vez más con probióticos, prebióticos o simbióticos con el objetivo de obtener en los lactantes alimentados con fórmula una microbiota intestinal similar a la de los lactantes. La suplementación de fórmulas infantiles con cepas probióticas que se encuentran naturalmente en la leche materna puede ser una alternativa interesante ya que estas cepas son suministradas naturalmente por la madre a sus bebés durante la lactancia. En este contexto, el Comité de Nutrición de ESPGHAN concluyó que la administración de cepas probióticas a lactantes sanos no planteaba problemas de seguridad, pero los datos no deberían extrapolarse a otras cepas, por lo que se necesitan estudios de seguridad para cada cepa [7].

Por eso, todas las cepas utilizadas en la nutrición infantil, incluso las que se encuentran naturalmente en la leche materna humana, deben demostrar su seguridad en estudios de intervención.

Identificamos y seleccionamos *Lactobacillus fermentum* CECT5716 de la leche materna humana y caracterizamos su seguridad y propiedades probióticas in vitro, en modelos animales y mediante ensayos controlados aleatorios (RCT) en humanos [8 - 13]. Su origen en leche materna y sus propiedades probióticas nos animaron a probar la seguridad y eficacia de esta cepa en lactantes de entre 6 y 12 meses. La administración de la cepa durante 6 meses fue segura y bien tolerada y se relacionó con una reducción significativa de la incidencia de infecciones gastrointestinales y respiratorias [14]. En este ECA evaluamos la seguridad de una fórmula infantil que contiene *L. fermentum* CECT5716 en bebés de 1 a 6 meses.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño del estudio y protocolo

Se realizó un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con dos grupos de estudio en colaboración con el Servicio de Pediatría de tres hospitales españoles: Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España), Hospital Reina Sofía (Córdoba, España) y Hospital Carlos Haya (Málaga, España). Los bebés sanos de un mes que, por razones ajenas al estudio, fueron alimentados exclusivamente con fórmula, fueron reclutados en el estudio entre mayo de 2009 y septiembre de 2010 después de que se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres o cuidadores. Los criterios de exclusión incluyeron antecedentes de trastornos gastrointestinales leves o graves (antecedentes de diarrea crónica o estreñimiento, reflujo gastroesofágico), cirugía gastrointestinal, alergia a la proteína de la leche de vaca, trastornos metabólicos (diabetes, intolerancia a la lactosa), inmunodeficiencia y prescripción de antibióticos una semana antes de la inclusión y uso previo de fórmulas que contienen probióticos. Los criterios de exclusión durante el estudio fueron el incumplimiento del protocolo del estudio, los efectos adversos derivados del consumo de alguna de las fórmulas del estudio, la no asistencia a las visitas programadas al hospital y la regurgitación severa y / o cólicos que, según los pediatras, necesita prescripción de una fórmula especial.

El tamaño de la muestra se calculó sobre la base del resultado primario que fue el aumento de peso promedio de los lactantes entre el inicio y los 120 \pm 3 días de edad. Basado en publicaciones anteriores donde el crecimiento fue la variable de resultado principal como parte de un estudio de seguridad [15, 16] y según el Informe del Comité Científico de Alimentos, el estudio fue diseñado para tener un poder para detectar una diferencia en el aumento de peso igual a 0.5 desviaciones estándar [17]. Así, se necesitarían alrededor de 63 niños en cada grupo de fórmulas bajo el supuesto de no inferioridad (prueba unilateral), con un nivel de significancia del 2.5 % y una potencia del 80 %. Los abandonos no se incluyeron en el cálculo.

Se seleccionaron 137 lactantes y se distribuyeron en dos grupos de estudio, según una aleatorización generada por un programa informático (SIGESMU®). Las fórmulas administradas fueron fórmula infantil estándar en polvo con una composición nutricional de acuerdo con la normativa vigente de la UE, suplementada con galactooligosacáridos (GOS) (0,3 g / 100 mL) en el caso del grupo control (CG), y con las mismas cantidades de galactooligosacárido (GOS) más *L. fermentum* CECT5716 (*Lactobacillus fermentum Hereditum*®) a una dosis de concentración de 10⁷ ufc / g de fórmula en el caso del grupo experimental (EG). La concentración del probiótico en la fórmula se analizó y confirmó cada dos meses. Ambas fórmulas fueron consumidas por los lactantes hasta los 6 meses (período de intervención). Las fórmulas para lactantes se proporcionaron a través de Puleva Food SL (Granada, España) en envases blancos lisos idénticos etiquetados con un número de código que

hacía referencia a los grupos de estudio. Para asegurar el cegamiento del ensayo, ambas fórmulas fueron sometidas a una prueba sensorial por un panel de expertos que encontró que ambos productos eran idénticos. Los pediatras prescribieron las cantidades de fórmula por día que se administrarán a los lactantes y las pautas de alimentación complementaria de acuerdo con las pautas actuales de la ESPGHAN [18]. Este estudio se llevó a cabo según la declaración de Helsinki y el protocolo fue aprobado por el Comité Regional de Ética del Sistema Andaluz de Salud con sede en Sevilla (España). El ensayo se registró en la Biblioteca de Medicina de EE. UU. (Www.clinicaltrial.gov) con el número NCT01346644.

2.2 Resultados del estudio y colección de datos

El resultado principal del ensayo fue el aumento de peso promedio entre el valor inicial (T0) y los 4 meses de edad (T2). Los resultados secundarios fueron la longitud promedio y la ganancia de circunferencia de la cabeza, la incidencia intestinal de infecciones, el comportamiento relacionado con la alimentación, los efectos adversos asociados con el consumo de fórmula, la microbiota fecal, la concentración fecal de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la concentración fecal de IgA. Se programó que los bebés recibieran cuatro evaluaciones clínicas durante el período de intervención: al inicio del estudio a la edad de 1 mes (T0), 2 meses (T1), 4 meses (T2) y 6 meses (T3). Se recolectaron muestras fecales en T0, T2 y T3.

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas fue realizado por el pediatra basándose en síntomas específicos y definiciones estandarizadas. La infección gastrointestinal (infección GI) se definió como heces blandas o acuosas al menos tres veces al día con o sin fiebre o vómitos [19] e infecciones del tracto respiratorio como la presencia de mucosidad abundante y / o tos durante dos o más días consecutivos con o sin fiebre o presencia de sibilancias y / o crepitantes con o sin fiebre. El cólico infantil se definió como un llanto continuo que dura más de tres horas, ocurre más de tres días a la semana y continúa durante más de tres semanas [20]. Los padres recibieron un diario y cuestionarios para 15 días, en los que se registró información sobre número diario de deposiciones, cantidad diaria de fórmula consumida, visitas no programadas al médico, comportamiento y malestar gastrointestinal.

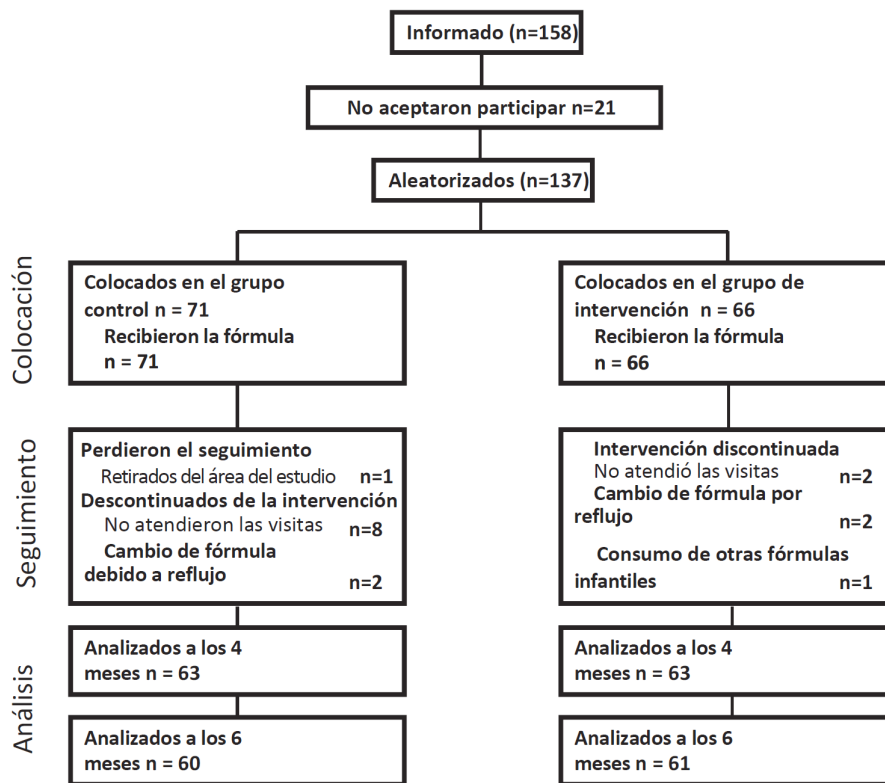
Para la recolección de muestras fecales, se recolectaron cuatro muestras fecales frescas simultáneas de cada voluntario al inicio del estudio (1 mes de edad), 4 y 6 meses de edad, conservadas a -20 °C y procesadas en 1 semana. Tres de las muestras se utilizaron para evaluar los diferentes parámetros analizados y la muestra restante se almacenó a -80 °C.

2.3 Cuantificación de bacterias fecales

La cuantificación de bacterias fecales se realizó mediante técnicas microbiológicas clásicas siguiendo el protocolo descrito por Maldonado et al. [14].

Para la detección de *L. fermentum* CECT5716, se dispersaron muestras fecales (100 mg / ml) en buffer de peptona salina y se esparcieron en agar MRS. Luego de un período de incubación de 48 h a 37 °C y condiciones anaeróbicas, las colonias fueron recolectadas y suspendidas en agua destilada. *L. fermentum* CECT5716, cuya secuencia del genoma total se conoce [21], se detectó en estas suspensiones bacterianas siguiendo una estrategia basada en PCR anidada. Los cebadores y las sondas se diseñaron utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems) procedente de una secuencia de ADN genómico específica de la especie identificada mediante hibridación sustractiva de ADN genómico (datos no mostrados).

Brevemente, la primera reacción de amplificación estándar se realizó utilizando los siguientes oligonucleótidos como cebadores HSL40 126D (5'-GCTTGCCGCTTCTCTGGT-3') y HSL40 126R (5'-CAACGACGATGAACACCACTT-3') a 500 nM en un equipo



Eppendorf Mastercycler Gradient y Taq DNA polimerasa (Roche). Las condiciones de PCR fueron un paso de desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 s, 46 °C durante 30 s y 72 °C 30 s, y una extensión final a 72 °C para 3 min. El resultado de la amplificación y el tamaño del amplicón (222 pb) se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

La segunda amplificación fue un ensayo de PCR basado en Taq-Man, cuya secuencia objetivo se ubicó dentro del producto de la primera PCR. Los cebadores (LC40C126 D 5 -TCAACGGCCCTCAATACA-3, LC40C126 D 5 -ACCTAATTCACGTCAAACATATTTTAC-3) estaban presentes en la mezcla de reacción a 500 nM y la sonda (LC40C126 P 5 -GTGGTGAGATGCCAGTGT con la etiqueta JOTCCECG-3) 250 nM. La amplificación y detección se realizaron en un termociclador Stratagene MX3005P, utilizando ADN polimerasa Taq (Roche) e incubando 5 min a 95 °C seguido de 40 ciclos a 95 °C 30 durante 15 s y 60 °C durante 1 min.

2.4 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

Las muestras fecales se homogeneizaron con NaHCO₃ 150 mM (pH 7,8) (1: 5, peso / v) en una atmósfera de argón. Las muestras se incubaron para fermentación durante 24 h a 37 °C y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción. La extracción de AGCC se realizó mediante cromatografía de gases siguiendo el protocolo descrito en Maldonado et al. [14].

2.5 Cuantificación de IgA fecal

La concentración de IgA se midió en los sobrenadantes de las heces mediante un kit de cuantificación ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Bethyl, Montgomery, TX).

2.6 Análisis estadístico

El software estadístico utilizado para realizar el análisis fue R versión 2.12.2. Los modelos estadísticos aplicados a los resultados primarios y secundarios se ajustaron principalmente por tiempo, grupo de

tratamiento, sexo y edad al inicio del estudio para corregir las diferencias en la edad de inicio del lactante en el ensayo, las diferencias entre el sexo y el hospital. Dado que no hubo diferencias entre hospitales, el análisis final no incluyó el hospital como covariable y no fue necesario realizar ningún ajuste.

Para analizar medidas repetidas en el tiempo, y para tener en cuenta la correlación de las respuestas dentro de los sujetos, se aplicó un Modelo Lineal Mixto. Cuando las variables del estudio fueron respuestas continuas como medidas del periodo de intervención, se aplicaron modelos de regresión lineal (LRM) para ajustar la media por las covariables de interés. Para las respuestas de resultado basadas en eventos de recuento o valores de dicotomía, se aplicaron modelos lineales generalizados (GLM). En particular, para el número de eventos se ajustó el modelo de regresión de Poisson con la función de enlace logarítmico y para la ocurrencia se utilizó un modelo de regresión logística. Las pruebas se realizaron al nivel de significancia bilateral del 5 % y se obtuvieron los intervalos de confianza del 95% para las estimaciones.

3. Resultados

3.1 Población

Se informó a ciento cincuenta y ocho padres sobre el estudio. Finalmente, 137 niños fueron incluidos en el estudio y asignados al azar. De los 137 bebés, 16 abandonaron el ensayo: 11 en el grupo de control y 5 en el grupo experimental. Los abandonos durante la intervención se debieron a cambio de domicilio fuera del área de estudio (1 en grupo control), cambio de fórmula por reflujo (2 en GC y 2 en EG), consumo de otra fórmula infantil (1 en EG) y pérdida durante la intervención por mal cumplimiento y violación del protocolo (8 en GC y 2 en GE). El número total de voluntarios analizados a los 4 meses (por protocolo) fue de 126 (63 por grupo), ya los 6 meses 121 lactantes (60 en el GC y 61 en el GE). En la Fig. 1 se muestra un diagrama de flujo de los participantes. Las características iniciales de los 121 niños que completaron el periodo de intervención fueron comparables entre los grupos de estudio (Tabla 1).

Tabla 1
Características basales de los sujetos que participaron en el estudio.

| | CG (n=60) | EG (n=61) |
|---|----------------|----------------|
| Hombre / mujer, n (%) | 38/22 (63/37) | 34/27 (56/44) |
| Edad al momento de la inscripción (semanas), media \pm DE | 4.3 \pm 1.1 | 4.3 \pm 0.5 |
| Peso al nacer (kg), media \pm DE | 3.15 \pm 0.6 | 3.24 \pm 0.6 |
| Parto por cesárea (%) | 48 | 36 |
| Edad gestacional (semanas) media \pm DE | 40 \pm 2.3 | 40.5 \pm 2.4 |
| Edad de la madre al nacer (años) media \pm DE | 30.6 \pm 4.9 | 28.2 \pm 5.4 |
| Lactancia materna (%) | | |
| Sin amamantar | 74 | 73 |
| <1 semana | 19 | 21 |
| 1-4 semanas | 8 | 6 |
| Fumar durante el embarazo (%) | 22 | 15 |
| Tabaquismo durante la lactancia (%) | 27 | 16 |
| Fumar en el hogar (%) | 52 | 48 |
| Hermanos mayores (%) | 44 | 45 |
| Asistir a guardería antes de los 6 meses (%) | 11 | 3 |
| Peso de la madre (kg) media \pm SD | 72.7 \pm 6.5 | 68.8 \pm 5.7 |
| Antecedentes familiares de alergia (%) | 32 | 23 |
| Mascotas en casa (%) | 30 | 33 |
| Vacunación contra el rotavirus | 68 | 69 |

3.2 Percentiles y estudios de puntuaciones z

Al final del ensayo, los percentiles promedio de peso y perímetro cefálico para las niñas fueron de alrededor del 75 % y para los niños entre el 50 %

y el 75 %, siendo similares en ambos grupos (GC y EG). En el caso de curvas crecientes de longitud al final de la prueba en ambos grupos, los percentiles promedio para niñas y niños estuvieron entre el 50 % y el 75 % (Fig. 2).

Las puntuaciones z de peso, longitud y perímetro cefálico para la edad se calcularon basándose en los patrones de crecimiento infantil de la OMS [22]. La población del estudio no difirió del estándar (Fig. 3). Se observó que el efecto de la fórmula experimental no fue significativo para los puntajes z del peso para la edad ($p = 0.061$) ni para los puntajes z del perímetro cefálico ($p = 0.453$). Con respecto a las puntuaciones z de longitud para la edad, el efecto del tratamiento fue significativo ($p = 0.021$), lo que indica que los bebés del grupo de tratamiento tenían puntuaciones z de longitud para la edad más altas en comparación con el grupo de control.

3.3 Crecimiento

En cuanto al peso, no se observaron diferencias significativas para el peso y la ganancia de peso a los 4 meses de edad (desenlace principal del estudio) ni al final de la intervención (6 meses de edad). Se obtuvieron resultados similares para la circunferencia de la cabeza (Tabla 2).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos en la longitud de los bebés a los 4 meses de edad, pero a los 6 meses de edad, los bebés en GE eran significativamente más altos que en los GC ($p = 0.038$). Sin embargo, la ganancia de longitud (cm / día) de los lactantes fue equivalente y no se observaron diferencias significativas (Tabla 2).

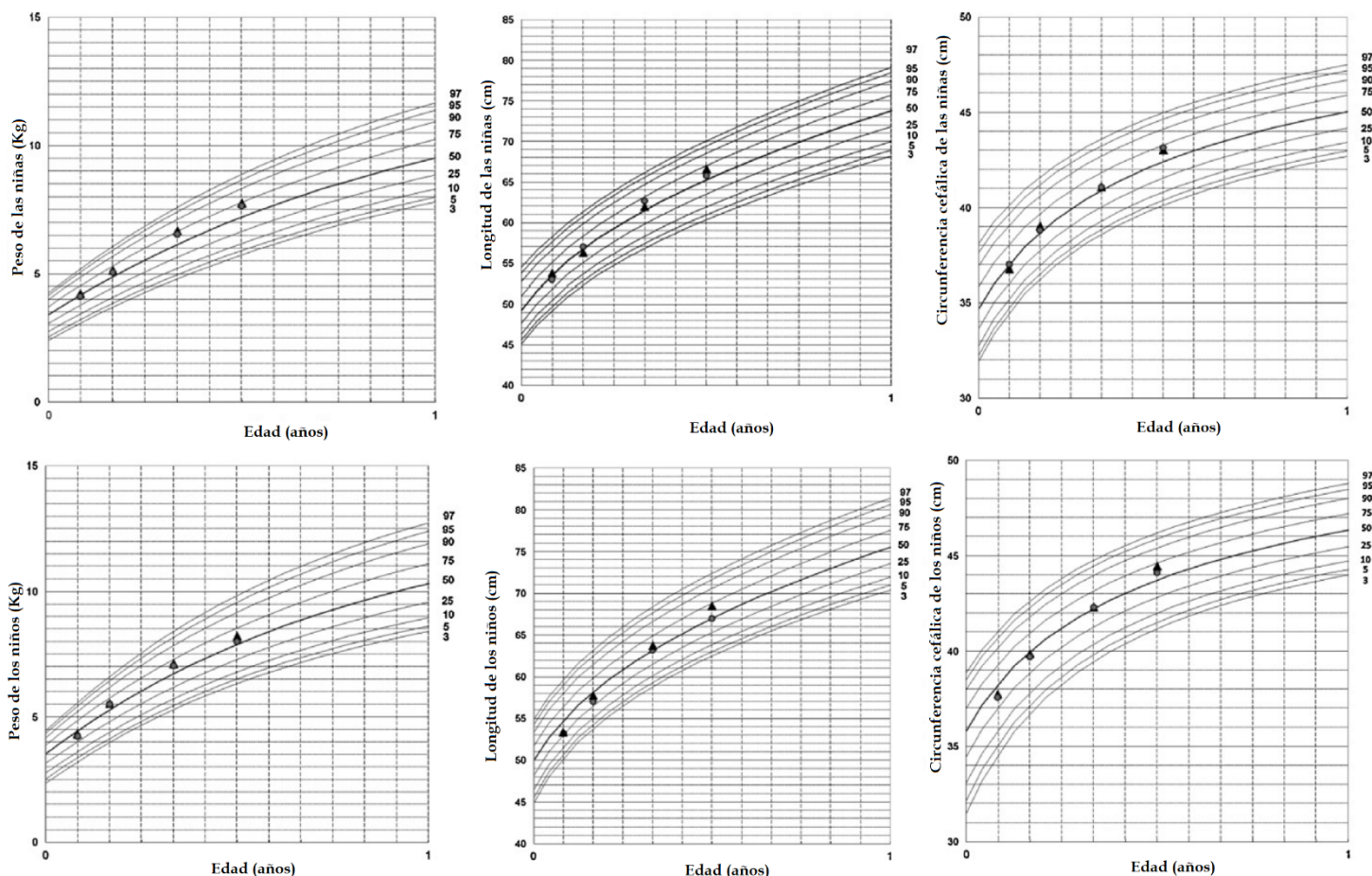


Fig. 2. Con base en la media, por género y grupo, de los pesos, longitudes y perímetro cefálico de los lactantes, se representa el percentil correspondiente a la media de niños y niñas de cada grupo a lo largo del tiempo con respecto a las curvas estándar. Los puntos muestran la curva de crecimiento en promedio para CG y los triángulos representan la curva de crecimiento en promedio para EG. Cada una de las curvas (líneas negras) es el percentil estándar en cada punto de edad de los niños.

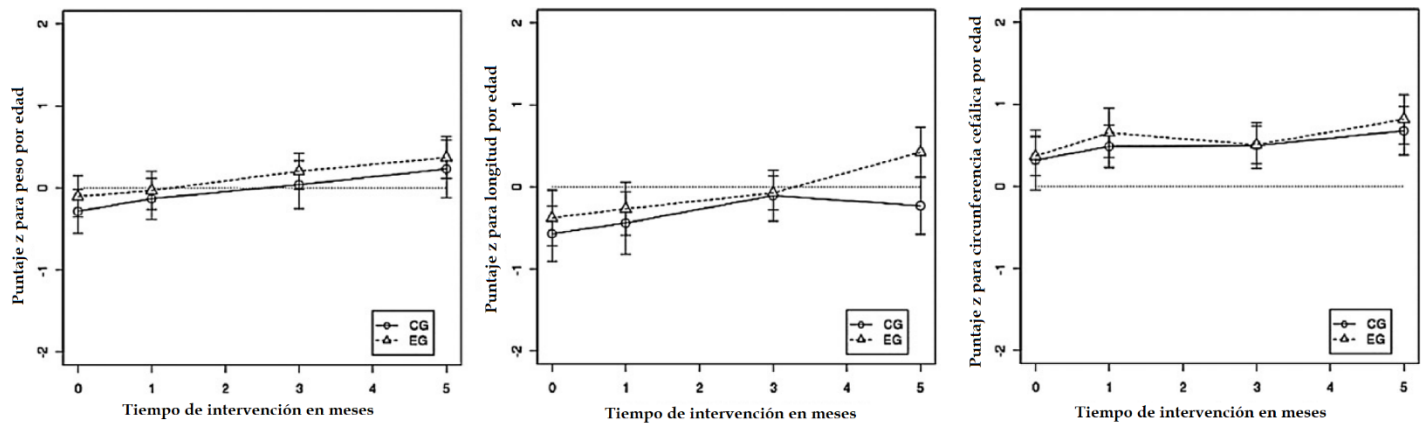


Fig. 3. Las puntuaciones z de peso para la edad, longitud para la edad y perímetro cefálico (media e IC del 95% por grupo), en relación con los estándares de la OMS.

Tabla 2

Mediciones antropométricas al inicio (1 mes), 4 y 6 meses de edad. Ganancia / día correspondiente a la diferencia entre los valores a los 6 meses de edad y al inicio. Los valores son promedio \pm SEM. *, $p < 0,05$ versus el control.

| Parámetros de crecimiento | Grupo control | Grupo experimental | | | |
|------------------------------|----------------|--------------------|----------------|-----------------|---------------------------|
| | | 1 mes | 4 meses | 6 meses | Ganancia/día ^a |
| Peso (kg) | 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 |
| Longitud (cm) | 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 |
| Circunferencia cefálica (cm) | 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 |

^a Por peso: g / día; para longitud y perímetro cefálico: mm / día.

3.4 Ingesta de fórmula, tolerancia y efectos adversos

Ambas fórmulas de estudio fueron bien toleradas y el cumplimiento fue bueno. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio con respecto a la ingesta diaria de fórmula (630,9 \pm 197,7 ml / día en GC vs 587,8 \pm 201,3 ml / día en GE). Dos lactantes en el GC y dos lactantes en el GE interrumpieron la intervención debido al reflujo y tuvieron que cambiar a una fórmula infantil antirreflujo, pero no hubo diferencias significativas en las tasas de abandono entre ambos grupos. El comportamiento relacionado con la alimentación (deposiciones fecales / día, color de las heces, consistencia, flatulencia, regurgitación, horas de sueño y comportamiento) fue similar en ambos grupos (Tabla 3). No se detectaron efectos adversos asociados a la suplementación con probióticos durante el estudio.

3.5 Salud de los bebés

Durante la intervención, el 51 % de los lactantes sufrió infecciones respiratorias y el 16 %, infecciones gastrointestinales. La mayoría de las enfermedades infecciosas fueron infecciones respiratorias (76 % del total de infecciones) (Tabla 4). No se encontró diferencia en las tasas de incidencia de infecciones respiratorias entre ambos grupos, aunque fue menor en el GE que en el GC. En cuanto a las infecciones GI, el GE mostró una reducción significativa (71 %) en la tasa de incidencia (RI: 0,082 \pm 0,037) en comparación con el GC (RI: 0,283 \pm 0,068) (Tabla 4). La tasa de incidencia de infecciones gastrointestinales (TIR = 0,289 IC 95 %: 0,085-0,831) fue significativa ($p = 0,018$), lo que indica que en el GC la tasa de incidencia de diarrea fue mayor que en el GE. El número de lactantes necesarios a tratar (NNNT) para reducir un episodio de diarrea fue 5. La razón de probabilidades de tener al menos una infección gastrointestinal o infección respiratoria fue 0,36 (IC del 95 %: 0,08 a 0,97) y 0,77 (IC del 95 %: 0,36-1,66), respectivamente, pero la diferencia solo fue significativa ($p = 0,025$) para las infecciones gastrointestinales. En particular, la probabilidad de tener una infección GI en el grupo de tratamiento fue casi 3 veces menor que en el grupo de control. Solo se informaron 5 eventos (3 en GC y 2 en GE) de otras infecciones (candidiasis, infección urinaria, conjuntivitis, varicela u otitis).

Tabla 3

Comportamiento relacionado con la alimentación.

| TIEMPO | 1 mes | 4 meses | 6 meses |
|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Deposiciones fecales/día ^a | | | |
| CG | 1.88 \pm 0.6 | 1.84 \pm 0.5 | 1.98 \pm 0.2 |
| EG | 1.94 \pm 0.6 | 1.80 \pm 0.7 | 1.93 \pm 0.4 |
| Color de las heces ^b | | | |
| CG | 1.8 \pm 0.8 | 2.10 \pm 1.0 | 2.49 \pm 0.8 |
| EG | 1.81 \pm 0.7 | 2.07 \pm 0.9 | 3.10 \pm 1.3 |
| Consistencia ^c | | | |
| CG | 2.92 \pm 0.6 | 3.08 \pm 0.5 | 2.63 \pm 0.6 |
| EG | 3.04 \pm 0.4 | 2.98 \pm 0.5 | 2.54 \pm 0.7 |
| Flatulencias ^d | | | |
| CG | 1.74 \pm 0.9 | 1.18 \pm 0.4 | 1.12 \pm 0.3 |
| EG | 1.64 \pm 0.7 | 1.33 \pm 0.8 | 1.20 \pm 0.7 |
| Regurgitación ^e | | | |
| CG | 1.90 \pm 0.8 | 1.78 \pm 0.8 | 1.57 \pm 0.7 |
| EG | 1.77 \pm 0.7 | 1.89 \pm 0.9 | 1.68 \pm 1.0 |
| Horas de sueño ^f | | | |
| CG | 2.56 \pm 0.8 | 3.14 \pm 0.7 | 3.47 \pm 0.7 |
| EG | 2.66 \pm 1.0 | 3.44 \pm 0.8 | 3.73 \pm 0.8 |
| Suma total de sueño ^g | | | |
| CG | 3.14 \pm 0.9 | 2.84 \pm 0.7 | 2.51 \pm 0.9 |
| EG | 3.26 \pm 0.7 | 2.82 \pm 0.9 | 2.78 \pm 1.0 |
| Temperamento de género ^h | | | |
| CG | 2.62 \pm 0.7 | 2.44 \pm 0.5 | 2.47 \pm 0.5 |
| EG | 2.43 \pm 0.6 | 2.40 \pm 0.5 | 2.39 \pm 0.5 |

^a Deposiciones fecales / día: 1 = <1 vez, 2 = 1-3, 3 = 4-6, 4 = 7-10 y 5 => 10.

^b Color de las heces: 1 = amarillo, 2 = mostaza, 3 = marrón, 4 = gris y 5 = verde.

^c Consistencia: 1 = grumos duros, 2 = salchicha con grietas, 3 = salchicha blanda, 4 = blanda (como papilla) y 5 = aguada.

^d Flatulencia: 1 = 0 h, 2 = <3 h, 3 = 3-6 h, 4 = 6-12 h, y 5 => 12 h.

^e Regurgitación: 1 = en absoluto, 2 = regurgitación de pequeñas cantidades durante o poco después de la alimentación, 3 = regurgitación mayor durante o poco después de la alimentación, 4 = vómitos leves con retraso en la alimentación anterior y 5 = vómitos intensos con considerable pérdida de líquido.

^f Horas de sueño (durante las últimas 2 noches, el sueño nocturno continuo fue en promedio): 1 = <4 h, 2 = 4-6 h, 3 = 6-9, 4 = 9-12 y 5 => 12 h.

^g Durante los últimos 2 días, la suma total de horas de sueño en 24 h fue en promedio: 1 = <11 h, 2 = 11-14 h, 3 = 14-17, 4 = 17-20 y 5 => 20 h.

^h Temperamento de género: el comportamiento del bebé cuando está despierto durante los últimos 2 días se describe mejor como: 1 = cansado, pasivo, 2 = tranquilo, vigilante, 3 = equilibrado, activo, 4 = burbujeante, inquieto, excitado y 5 = alterado, agitado.

Tabla 4

Incidencia de enfermedades infecciosas, episodios febriles y tratamiento antibiótico durante el período de intervención.

| | Grupo control | | Grupo experimental | | Razón de tasa de incidencia | IR decremento (%) | NNT | Valor p | IRR |
|--------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|-----|---------|-----|
| | No. de eventos | Tasa de incidencia (SE) | No. de eventos | Tasa de incidencia (SE) | | | | | |
| Infecciones gastrointestinales | 17 | 0.283 (0.07) | 5 | 0.082 (0.04) | 0.289 (0.085–0.831)* | 71.1 | 5 | 0.018 | |
| Infección respiratoria | 43 | 0.716 (0.11) | 42 | 0.689 (0.11) | 0.977 (0.623–1.530) | 3.9 | 61 | 0.933 | |
| Infecciones totales | 63 | 1.050 (0.13) | 49 | 0.803 (0.11) | 0.778 (0.524–1.148) | 23.5 | 4 | 0.339 | |
| Episodios febriles | 13 | 0.220 (0.06) | 13 | 0.213 (0.06) | 0.967 (0.427–2.341) | 3.3 | – | – | |
| Tratamientos con antibióticos | 7 | 0.115 (0.04) | 8 | 0.131 (0.05) | 1.105 (0.362–3.702) | –10.5 | –61 | 0.807 | |

p < 0.05 versus control.

La tasa de incidencia de infecciones totales fue menor en EG pero esta diferencia no fue significativa. Para episodios febriles o tratamientos antibióticos no se observaron diferencias significativas.

3.6 Parámetros fecales

La media observada de conteos fecales de *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Clostridia*, *Bacteroidaceae* en cada punto de tiempo entre ambos grupos fue similar, aunque se observó un aumento significativo en estos grupos bacterianos con el tiempo (Cuadro 5).

L. fermentum CECT5716 se detectó vivo en las muestras fecales del 53 % de los lactantes del GE. Las muestras de dos bebés en el grupo de control resultaron positivas para *L. fermentum*. La capacidad de la microbiota fecal de los lactantes para producir ácidos grasos de cadena corta (butírico, propiónico y acético) y la concentración de IgA en las heces fueron similares en ambos grupos (Tabla 5).

4. Discusión

L. fermentum CECT5716 es una cepa probiótica originalmente aislada de la leche materna postparto de cuatro días [2, 8], y su seguridad y potencial probiótico se demostró en modelos animales y en estudios en humanos que incluyeron lactantes de 6 a 12 meses de edad [11, 14, 23]. En el presente estudio, se estudió la seguridad y tolerancia de *L. fermentum* en una fórmula para lactantes en lactantes sanos de 1 a 6 meses de vida.

La determinación de la tasa de aumento de peso (resultado principal del estudio) es el componente más valioso de la evaluación clínica de una fórmula infantil [24–26]. En este estudio, el peso para la edad y la longitud para la edad, los puntajes z indicaron tasas de crecimiento comparables a los estándares de crecimiento en ambos grupos. Debido a que estos estándares se basan en bebés sanos, estos resultados son una indicación valiosa de la suficiencia nutricional y la seguridad de la fórmula experimental. No se observaron diferencias en la ganancia de peso, longitud y perímetro cefálico entre GE y GC. Sin embargo, al final de la intervención se observó que los bebés del grupo experimental eran significativamente más largos en comparación con los bebés del grupo de control. Hay informes anteriores sobre estudios similares realizados con

otras cepas probióticas en los que se observó un efecto de la intervención probiótica sobre el peso y la longitud de los lactantes [27, 28]. La explicación de este efecto no está clara, pero quizás la actividad de las bacterias sobre la fisiología de la mucosa pueda influir en la digestión y absorción de nutrientes. Habrá que realizar estudios futuros diseñados para detectar estas diferencias de crecimiento para corroborar este resultado e investigar los mecanismos implicados.

No se detectaron efectos adversos relacionados con el consumo de la fórmula experimental. Los trastornos gastrointestinales leves como cólicos, regurgitación, heces blandas y estreñimiento son síntomas indicativos de la tolerancia de una fórmula infantil. No hubo diferencias en estos síntomas entre ambos grupos de intervención, lo que evidencia que la fórmula experimental que contiene la cepa probiótica fue bien tolerada. Además de esto, el número de lactantes que interrumpieron el estudio por problemas de regurgitación fue muy bajo y similar en ambos grupos. Las tasas o valores de incidencia de cólico infantil, regurgitación y estreñimiento estaban dentro del rango de los niños españoles a esta edad [29].

Si bien no se detectaron diferencias significativas en la microbiota fecal entre ambos grupos, la cepa probiótica *L. fermentum* CECT5716 pudo detectarse viva en las heces del 53 % de los lactantes del GE, demostrando que esta cepa es capaz de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal. tracto de los bebés. Los oligonucleótidos específicos utilizados para detectar la cepa CECT5716 también reconocieron como positivas dos muestras del GC probablemente debido a la presencia natural de cepas de *L. fermentum* muy similares a CECT5716 en las heces de estos dos lactantes.

En cuanto al estado de salud de los lactantes, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en las tasas de incidencia de infecciones respiratorias, el problema infeccioso más común en la infancia. En un estudio anterior en lactantes de 6 a 12 meses, el consumo de una fórmula de continuación que contiene prebióticos con la misma cepa de *L. fermentum* indujo una reducción significativa del 26 % en la incidencia de infecciones respiratorias [14]. Cabe destacar que en ese estudio la reducción en la incidencia de infecciones respiratorias se debió principalmente a un efecto sobre la infección recurrente. Durante los primeros 6 meses de vida, la incidencia de infecciones recurrentes es

Tabla 5

Recuentos de microbiota intestinal en muestras fecales de lactantes (como logaritmo de ufc / g), concentración fecal de ácidos grasos de cadena corta (AGCC, como mg / g de heces) e IgA (como mg / g de heces) al inicio (1 mes de edad), 4 y 6 meses de edad.

| Grupo bacteriano | Grupo control | | | Grupo Experimental | | |
|-----------------------------|---------------|------------|------------|--------------------|------------|-------------|
| | 1 mes | 4 meses | 6 meses | 1 mes | 4 meses | 6 months |
| <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 |
| SCFA | | | | | | |
| Acetate | 14.5 ± 1.1 | 13.4 ± 1.5 | 12.4 ± 1.1 | 12.8 ± 1.1 | 11.5 ± 0.9 | 14.4 ± 1.4 |
| Propionate | 2.75 ± 0.5 | 2.15 ± 0.2 | 2.71 ± 0.3 | 2.27 ± 0.2 | 1.89 ± 0.1 | 3.08 ± 0.5 |
| Butyrate | 2.31 ± 0.5 | 2.32 ± 0.4 | 2.38 ± 0.3 | 1.60 ± 0.3 | 1.73 ± 0.2 | 2.94 ± 0.4 |
| Immunoglobulin A | 1.16 ± 1.2 | 1.19 ± 0.9 | 0.89 ± 0.8 | 1.13 ± 1.0 | 1.09 ± 1.0 | 0.998 ± 1.0 |

realmente baja y esto podría explicar la falta de efecto sobre las infecciones respiratorias observada en este estudio.

El consumo de la fórmula experimental que contiene *L. fermentum* se relacionó con una reducción significativa del 71 % en la incidencia de infecciones gastrointestinales en comparación con los lactantes alimentados con la fórmula de control. Este resultado está en línea con resultados previos observados en lactantes de 6 a 12 meses de edad en los que se detectó una reducción del 46 % en la incidencia de infecciones gastrointestinales durante el período de intervención utilizando la misma cepa de *L. fermentum* [14]. Este estudio fue diseñado para detectar diferencias en el crecimiento de los lactantes, teniendo en cuenta las bajas tasas de infecciones gastrointestinales en los lactantes durante los primeros 6 meses de vida, la potencia estadística de este estudio sería inferior al 80 %. Por lo tanto, se necesitarán estudios futuros con significativamente más sujetos para corroborar estos resultados.

La tasa de reducción de las infecciones gastrointestinales observada en el GE también es comparable a la de otros ensayos que informaron una prevención exitosa de las infecciones gastrointestinales adquiridas en la comunidad de los episodios de diarrea utilizando una fórmula probiótica [30-34].

Ambas fórmulas, control y experimental, contenían GOS (0.3 g / 100 mL). Los efectos beneficiosos de los prebióticos dependen principalmente de su influencia en la composición de la microbiota intestinal y su capacidad para generar productos de fermentación (ácidos grasos de cadena corta) con diversas funciones biológicas [35]. La presencia de GOS en la fórmula experimental puede tener un efecto sinérgico con *L. fermentum* mejorando el efecto beneficioso de la cepa probiótica. Sin embargo, dado que la fórmula de control también contenía la misma concentración de GOS, no es posible sacar una conclusión.

En conclusión, el consumo de una fórmula infantil que contiene prebióticos y enriquecida con *L. fermentum* CECT5716 es seguro y bien tolerado en bebés de 1 a 6 meses de edad. Además, el consumo de esta fórmula puede mejorar la salud de los bebés reduciendo la incidencia de infecciones gastrointestinales.

Papel de la fuente de financiación

El estudio fue financiado por Puleva Food SL, Granada, España e HiPP GmbH & Co Vertrieb KG, Pfaffenhofen, Alemania. Los patrocinadores del estudio han participado en el diseño del estudio y en la redacción del informe.

Declaración de divulgación

MG, MAL, MVR, JR, IR, MDL, JM, ELH, VN y CD no reconocen ningún conflicto de interés de interés personal / ganancia en ninguna empresa / organización, o haber recibido apoyo financiero de cualquier organización relacionada con la industria en la preparación de este artículo.

LS, ADV, AG y MO son trabajadores de Biosearch propietario de la patente de *Lactobacillus fermentum* CECT5716.

FLV es trabajador de Puleva Food.

RB y KLR son trabajadores de HiPP GmbH & Co.

JML es becario de la Fundación Universidad-Empresa (Universidad de Granada, España).

Agradecimientos

Los autores agradecen a Llenalia García Fernández (SEPLIN, Soluciones Estadísticas) por el análisis estadístico de los datos.

La Dra. Mercedes Gil y el Dr. José Maldonado son miembros de Red SAMID.

Referencias

[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, Diaz-Ropero MP, Martin R, Rodriguez JM, Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006;101:72-9.

[11] Olivares M, Diaz-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] Diaz-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, Cañabate 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] Riihã 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, Detwilw 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, Diaz-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, Agostoni C, Goulet O, Hermell 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, Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Hermell 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;62:19–25.