

Оригинальная информация

Выживаемость *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM1572) в желудочно-кишечном тракте у здоровых детей

Milko Radicioni,¹ Ranjan Koirala,³ Walter Fiore,^{2,3} Chiara Leuratti,¹ Simone Guglielmetti,³ Stefania Arioli³

Получено: 14 июня 2018 года / Принято: 14 ноября 2018 года

© Авторы, 2018 год

Аннотация

Цель. Способность выживать в процессе пищеварения является одним из важнейших факторов в определении эффективности пробиотиков. В этом исследовании впервые исследовали способность пробиотика *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM1572) выживать во время транзита пищи по желудочно-кишечному тракту у здоровых детей.

Методы. Двадцать детей в возрасте 3-12 лет получали *L. casei* DG® в виде питьевого раствора, содержащего 1×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ), один раз в день 7 дней подряд. Восстановление в образцах кала оценивали на исходном уровне и в различные временные точки во время и после приема. Также исследовали частоту дефекации, консистенцию кала, пищеварительную функцию и безопасность препарата.

Результаты. У девятнадцати (95%) из 20 детей, включенных в исследование, присутствовали жизнеспособные клетки *L. casei* DG® в кале не менее одного раза во время исследования, максимальное количество (среднее $4,3 \log_{10}$ КОЕ/г $\pm 2,3$) было достигнуто с 4 по 6 день от начала приема. Следует отметить, что для 11 (57,9%) из 19 детей с жизнеспособными клетками, *L. casei* DG® выживали в образцах кала до 3 дней после завершения приема. Частота дефекации, консистенция кала и пищеварительная функция не изменились значительно во время или после терапии. Безопасность исследуемого препарата была очень хорошей.

Заключение. Это исследование впервые показало, что *L. casei* DG® выживает во время транзита пищи по желудочно-кишечному тракту при приеме детьми в виде детского питьевого раствора с пробиотиками, содержащего 1×10^9 КОЕ, и сохраняется в кишечнике до 3 дней после завершения приема, что демонстрирует устойчивость *L. casei* DG® к желудочному соку, гидролитическим ферментам и желчным кислотам.

Ключевые слова: Здоровые дети, пробиотики, восстановление *L. casei* DG®, *Lactobacillus paracasei* CNCM1572

Сокращения

КОЕ: колониеобразующие единицы

GCP: Надлежащая клиническая практика

ЖК: желудочно-кишечный

GRAS: в целом признанный безопасным, общепризнанный безопасным

ICH: Международная конференция по гармонизации

LCDG: *L. casei* DG®

Дополнительные материалы в электронном виде: Он-лайн версия этой статьи (<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1860-5>) содержит дополнительные материалы, которые доступны для зарегистрированных пользователей.

✉ Milko Radicioni; milko.radicioni@croalliance.com

✉ Stefania Arioli; stefania.arioli@unimi.it

¹ «КРОСС Рисерч С.А.» (CROSS Research S.A.), виа Ф.А. Джорджиоли 14, 6864 Арсо, Швейцария

² «СОФАР СпА» (SOFAR SpA), 20060 Милан, Треццано-Роза, Италия

³ Кафедра питания, экологии и нутрициологии (DeFENS), Миланский университет, Милан, Италия

Введение

Первая оценка эффективности пробиотиков была произведена в 2001 году Международной группой экспертной консультации, работающей на Продовольственную и сельскохозяйственную организацию (ФАО) Объединенных наций и Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ), которая вылилась в Руководство по Оценке пробиотиков в пищевых продуктах, опубликованное в 2002 году [1]. Одним из результатов была переработка определения пробиотиков, которое было принято в 2014 году Международной научной ассоциацией по пробиотикам и пребиотикам [2], с минимальным грамматическим изменением, а именно: «Пробиотики являются живыми микроорганизмами, которые при приеме в адекватных количествах полезны для здоровья хозяина».

Сообщения о лечебно-профилактическом эффекте пробиотических бактерий, в основном лактобактерий (*Lactobacilli*) и бифидобактерий (*bifidobacteria*), встречаются все чаще, в частности, у пациентов с патологическими состояниями [1–7]. В недавнем обзоре в отношении роли пробиотиков Khaledi и соавт. [8] подтвердил, что добавление в пищу пробиотиков создает неустойчивое улучшение микробиоты кишечника и играет определенную роль в улучшении реакции иммунной системы, консистенции стула, перистальтики кишечника и концентрации вагинальных лактобактерий также и у здоровых пациентов. К тому же, авторы подтвердили, что у здоровых взрослых прием пробиотиков может оказывать положительный эффект на иммунную систему, желудочно-кишечный тракт и репродуктивную систему у женщин. Эффективный пробиотик желателен должен быть человеческого происхождения, оставаться жизнеспособным во время хранения и использования, быть общепризнанным безопасным (GRAS), оказывать положительное влияние на хозяина, влиять на иммунитет хозяина, предотвращать или лечить специфические патогенные инфекции путем противомикробного действия, прикрепляться к клеткам кишечника человека, содержать большое количество жизнеспособных клеток и быть способным выживать в кишечнике [5]. Можно сделать вывод о том, что основным фактором в определении эффективности пробиотика является его способность выживать в процессе пищеварения и благополучно развиваться в желудочно-кишечном тракте [9–13]. Действительно, в кишечнике принятые внутрь бактерии сталкиваются с разнообразными физико-химическими воздействиями, которые могут негативно влиять на их выживаемость. К числу таких воздействий относятся кислота желудочного сока, желчная кислота и пищеварительные ферменты, а также разнообразное и конкурентное окружение, представленное кишечной микрофлорой [14, 15].

Интересно отметить, что выживание различных штаммов лактобактерий в желудочно-кишечном тракте после перорального приема было продемонстрировано в нескольких исследованиях кала, проведенных на здоровых добровольцах [16–18].

Lactobacillus paracasei является нормальным компонентом кишечной микрофлоры здоровых людей, обычно используемым в препаратах пробиотиков. *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM11572; LCDG) является штаммом пробиотика, изолированным из кала человека и разработанным компанией «СОФАР С.п.А.» (SOFAR S.p.A.) в линейку продуктов Энтеролактис®. LCDG поместили в институт Луи Пастера, Париж (Номер депозита CNCM11572).

Характеристики LCDG включают способность штамма прикрепляться к слизистой тонкого кишечника, производить молочную кислоту, выживать в условиях pH 3.0 и в присутствии желчных кислот и не индуцировать устойчивости к антибиотикам [19, 23].

В соответствии с этими особенностями, некоторое количество исследований *in vitro/ in vivo* поддерживают терапевтическое применение: у здоровых взрослых LCDG продемонстрировал способность влиять на микробную экосистему в кишечнике [20] и влиять на иммунную реакцию хозяина [21, 22], благодаря своей уникальной экзополисахаридной капсуле [23]. К тому же, LCDG наделен терапевтическим потенциалом в отношении нескольких дисфункциональных и патологических состояний, таких как язвенный колит [24], дивертикулез [25, 26], избыточный рост бактерий в тонкой кишке [27] и синдром раздраженного кишечника [23, 28].

Одно из предшествующих исследований с участием здоровых добровольцев, которые принимали состав с LCDG, содержащий $8,5 \times 10^9$ КОЕ, один раз в день в течение 7 дней, продемонстрировало присутствие живых клеток LCDG в образцах кала до 7 дней после завершения терапии [29]. В исследовании Ferrario и соавт. [20], клетки LCDG в образцах кала здоровых взрослых значительно возросли в количестве по сравнению с исходным уровнем через 4 недели приема капсул (Энтеролактис® Плюс), содержащих не менее 24×10^9 живых клеток. В том же исследовании было продемонстрировано, что прием LCDG оказывал влияние на микрофлору кишечника, в частности, путем увеличения количества *Costridiales geni Coprococcus: Blautia*, которое, по данным литературы, может потенциально оказывать пользу для здоровья хозяина. В последнее время LCDG, как было обнаружено, способны выживать после прохождения через желудочно-кишечный тракт у здоровых взрослых [30].

Целью настоящего открытого 1-недельного исследования было подтверждение способности педиатрического состава LCDG, содержащего 1×10^9 живых бактерий, проходить через желудочно-кишечный тракт у детей во время и после периода приема. Также оценивали безопасность продукта, частоту дефекации, консистенцию кала и пищеварительную функцию.

Методы

Дизайн и участники исследования

Данное исследование было одноцентровым, открытым, односторонним исследованием на чувствительность, которое включало скрининговый визит, 1-недельный вводный период, 1-недельный период приема, 2-недельный период последующего наблюдения и завершающий визит. После визита скрининга (B1) пациенты посещали клинический центр в день перед первым приемом (день -1, B2), в день 8 (B3) и для завершающего визита (день 22/23) (Рис. 1).

Протокол исследования (№ PSC-DS RECENT-BS 16) был утвержден этическим комитетом кантона Тичино, Швейцария. Всем пациентам дали детальное описание исследования, и все из них дали письменное информированное согласие перед включением в исследование. Исследование проводилось в период с августа по октябрь 2017 года в соответствии с Хельсинкской декларацией, гармонизированными европейскими стандартами по надлежащей клинической практике (ICH E6 1.24) и применимыми местными законами.

Здоровые дети мужского и женского пола в возрасте 3-12 лет и не имеющие избыточной массы тела на основании таблицы индекса массы тела для пола и возраста [31] были включены в исследование. Все дети были физически здоровы по результатам медицинского осмотра на момент скрининга. Не было пациентов на особой диете или вегетарианцев. Дети с частотой дефекации более 3 раз в день или менее 3 раз в неделю не были включены в исследование.

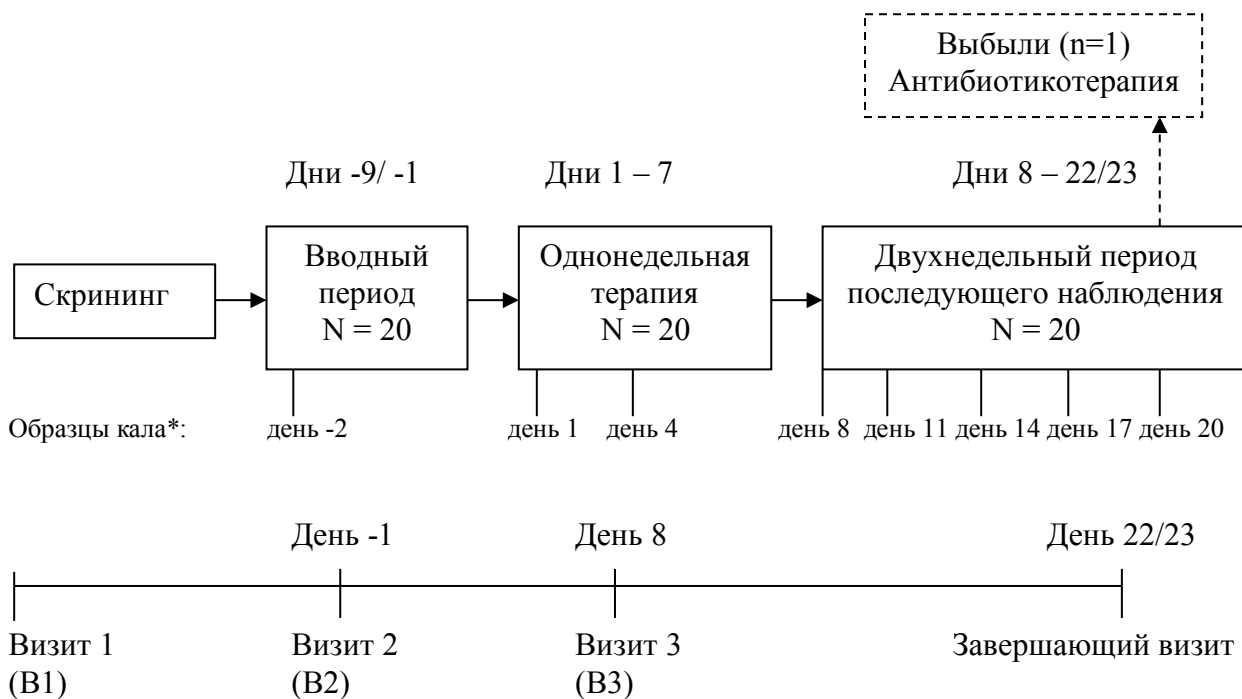


Рисунок 1. Графическое представление дизайна исследования

Критериями исключения также были следующие: значимые заболевания в анамнезе, в частности, воспалительные/инфекционные заболевания кишечника, вирусные или бактериальные энтериты, язвы желудка или двенадцатиперстной кишки, нарушения обмена веществ, первичный или вторичный иммунодефицит, прием антибиотиков в течение 1 месяца до скринингового визита, прием любого другого препарата, включая безрецептурные препараты, в течение 2 недель до исследования. Пациентов не включали в исследование, если они имели гиперчувствительность или аллергию к какому-либо ингредиенту или компоненту пищи, и, если они принимали участие в других исследованиях за последние 3 месяца.

Исследуемый препарат

Энтеролактис® представляет собой лекарственную форму пробиотика, в основном *L. casei* DG® (= *Lactobacillus paracasei* CNCM11572 = живые клетки LCDG). Продукт поставлялся в виде флаконов, содержащих 1×10^9 КОЕ в качестве порошка в колпачке («СОФАР С.п.А.», Италия) и 2% раствора фруктозы (добавки: лимонная кислота в качестве регулятора кислотности и натрия бензоата и калия бензоата в качестве консервантов).

Все дети, включенные в исследование, получали один флакон исследуемого препарата, по одному в день с 1 по 7 день.

Продукт был восстановлен непосредственно перед приемом. После открытия флакона порошок в колпачке непосредственно смешивался с питьевым раствором. Для приема после встряхивания флакона дети пили содержимое флакона непосредственно натощак утром как минимум за 10 минут до завтрака, или, как вариант, вечером перед сном, не менее 2 часов после последнего приема пищи. Даты и время приема регистрировали в дневнике. Учет препарата и проверку дневников проводили для проверки приверженности к лечению.

На протяжении всего исследования пациенты придерживались обычного режима питания, за исключением ферментированного молока, добавок в пищу в виде пробиотиков или любых других добавок в пищу, содержащих пробиотики, и продуктов питания с пробиотиками, которые были запрещены с начала вводного периода и до окончания исследования. Традиционные йогурты были разрешены. Прием любого препарата сообщался как отклонение от протокола.

Отбор и анализ образцов кала

Образцы кала отбирали на исходном уровне (день -2), в течение 1-недельной терапии (день 1 и 4) и на этапе последующего наблюдения (день 8, 11, 14, 17 и 20). Время отбора может варьироваться от +1 дня на исходном уровне до +2 дней на всех других временных точках. Образцы отобраны в стерильные контейнеры, которые хранили дома при температуре приблизительно 2–8 °С, их забирал курьер как можно быстрее после дефекации, и доставлял при температуре 2–8 °С на кафедру питания, экологии и нутрициологии (DeFENS), Миланский университет, Италия.

Каждый свежий образец кала обрабатывали немедленно после доставки в лабораторию, что составляло 24 часа после дефекации, чтобы хранение не повлияло на жизнеспособность штамма пробиотика. Протокол анализа описан у Aigioli и соавт. [30]. В частности, после гомогенизации образца 1 г кала повторно растворяют в 9 мл разбавителя максимального восстановления (Maximum Recovery Diluent, MRS; Шарлау) и смешивают в гомогенизаторе Stomacher. Затем суспензию кала в сериях 1:10 растворяют и засевают путем распределения на агаровых пластинах, содержащих среду MRS («Дифко» (Difco)) с добавкой 1 мг/л ванкомицина и 10 мг/л канамицина (vkMRS). Наконец, пластины инкубируют в анаэробных условиях при температуре 37 °С до 48 часов. Идентификация колоний как штамма LCDG была проведена путем оценки клейкой/волокнутой текстуры колонии и через ПЦР для отбора колоний со специфическими для штамма праймерами (rtWELFf и rtWELFr) [20]. ПЦР были проведены в 25-мкл реакционных смесях, каждая из которых содержала 1 колонию (отобранную с помощью стерильной деревянной палочки), 2,5 мкл 10× рабочего буферного раствора, по 200 ммоль/л дНТФ, 0,5 ммоль/л MgCl₂, 0,5 ммоль/л каждого праймера, и 0,5 U DreamTaq™ ДНК полимеразы («Термо Фишер Сайентифик Инк.» (Thermo Fisher Scientific Inc.), Монца, Италия). Амплификация была проведена с помощью Mastercycler 96 («Эппендорф» (Eppendorf), Милан, Италия). ПЦР смеси подвергли следующим тепловым циклическим нагрузкам: первоначальное выдерживание при температуре 95 °С в течение 3 минут, затем 39 циклов с температурой 95 °С в течение 30 секунд, 58 °С в течение 30 секунд и 72 °С в течение 30 секунд. Амплифицируемые продукты были разделены электрофорезом на 2% (масс./об.) агарозный гель (с 0,2 мкг/мл этидия бромидом) в 1× Трис-ацетат-ЭДТА буфере (40 ммоль/л трис-ацетате, 1 ммоль/л ЭДТА, рН 8,0) и сфотографированы. Маркер длины ДНК 1-kb GeneRuler DNA Ladder Mix использовали в качестве маркера. Предел обнаружения метода 100 LCDG клеток/г влажного кала. Получившиеся значения представлены как log₁₀ КОЕ/г влажного кала.

Оценка частоты дефекации, консистенции стула, пищеварительной функции и безопасности

Помимо даты/времени приема исследуемого препарата пациенты или их родители сообщали в дневнике: дату/время дефекации, консистенцию стула, частоту возникновения нежелательных явлений и прием сопутствующих препаратов. Консистенцию стула исследовали в соответствии с иллюстрациями по системе 1–7 баллов Бристольской шкалы стула [32]. Оценки в баллах выставлялись следующим образом: (1) отдельные твердые комки в виде орехов; (2) в форме сосиски, но шишковатый, (3) в форме сосиски, но с трещинами на поверхности, (4) в форме сосиски или змеи, мягкий и гладкий; (5) мягкие шарики с четкими краями; (6) рыхлые комки с неровными краями, бесформенный стул; (7) водянистый, без твердых фрагментов, полностью жидкий.

К тому же, пищеварительную функцию оценивали ежедневно в дневнике как плохую (1 балл), нормальную (2 балла), хорошую (3 балла) или оптимальную (4 балла), начиная с дня перед первым приемом до дня 8. Общая оценка приема препарата была проведена исследователем на день 8.

Безопасность и общая переносимость исследуемого препарата были основаны на частоте возникновения появившихся во время лечения нежелательных явлений, проверке дневников и медицинских осмотрах, проведенных на этапе скрининга и во время завершающего визита.

Объем выборки и анализ данных

Объем выборки не был основан на каких-либо формальных вычислениях, он был признан пригодным, учитывая описательный и пилотный характер исследования.

Данные, полученные в этом исследовании, и измеряемые параметры были описаны с использованием методов классической статистики, то есть, с использованием среднего, СО, КВ (%), минимальных и максимальных значений, для количественных переменных и частоты для качественных переменных. Данные, которых не было, рассматривались как “отсутствующие значения”. Анализ был проведен с использованием программного обеспечения SAS® версии 9.3 (TS1M1).

Нежелательные явления были закодированы с помощью Медицинского словаря нормативно-правовой деятельности, версия 20.1.

Результаты

Демографические характеристики и распределение участников исследования

В исследование были включены двадцать (20) здоровых детей, 10 мальчиков и 10 девочек, удовлетворяющих критериям включения/исключения исследования, они получали запланированные дозы исследуемого препарата и были включены в анализ данных.

Демографические характеристики пациентов исследования представлены в Таблице 1.

Девятнадцать (19) детей завершили исследование согласно протоколу, а один (пациент 12) досрочно завершил исследование во время фазы последующего наблюдения, после завершения 1-недельного периода лечения вследствие антибиотикотерапии по поводу абсцесса зуба (то есть, 180 мг суспензии азитромицина), которая не допускается в соответствии с требованиями исследования.

Восстановление в кале *L. casei* DG® (LCDG)

На исходном этапе живых клеток LCDG не было обнаружено в анализируемых образцах кала. Это было ожидаемо, принимая во внимание то, что детям было дано указание не употреблять каких-либо компонентов или добавок в пищу с пробиотиками/пребиотиками.

Таблица 1 Демографические характеристики исследуемых детей

Параметр	Анализируемых пациентов N = 20
Пол	
Мужской – n(%)	10 (50%)
Женский – n(%)	10 (50%)
Раса	
Европеоидная	20 (100%)
Возраст (лет)	
Средний ± СО	7,0 ± 2,8
Медианное значение (диапазон)	6,5 (3-12)
Масса тела (кг)	
Средняя ± СО	27,07 ± 11,64
(Диапазон)	25,05 (13,4-59,5)
Рост (см)	
Средний ± СО	125,1 ± 19,0
(Диапазон)	125,0 (94-170)
Индекс массы тела (кг/м ²)	
Средний ± СО	16,49 ± 1,89

(Диапазон)	15,75 (14,2-20,9)
------------	-------------------

В период приема препарата большинство пациентов продемонстрировали различные количества живых КОЕ LCDG в кале. В частности, жизнеспособные клетки LCDG были изолированы из по меньшей мере одного образца кала 19 (95%) из 20 испытуемых детей, единственным исключением был один ребенок, у которого не было обнаружено живых клеток (Таблицы 2, 3). Индивидуальные отклики и демографические данные приведены в Дополнительной таблице S1.

В целом, большинство живых клеток LCDG были изолированы в течение недели терапии пробиотиками с максимальным количеством (среднее \log_{10} КОЕ/г $4,3 \pm 2,3$ [диапазон 3,7–6,3]; Таблица 3), достигнутым с дня 4 по 6 от начала приема.

Таблица 2 Процент детей с живыми клетками *L. casei* DG® в образцах кала, отобранных на исходном уровне (день -2 [+1]), во время терапии (День 1 [+2]), День 4 [+2]) и на этапе последующего наблюдения (День 8 [+2] и дни 11, 14, 17 и 20 [+2])

Оценка	Количество пациентов	Пациенты, <i>n</i> (%), с живыми <i>L. casei</i> DG® в образцах кала				
		Исходный уровень	Терапия в течение 1 недели		Последующее наблюдение	
		День - 2 (+1)	День 1 (+2)	День 4 (+2)	День 8 (+2)	День 11, 14, 17, 20 (+2)
Ежедневная оценка	20	0 (0,0%)	3 (15,0%)	16 (80,0%)	11 (55,0%)	0 (0,0%)
Всего	20	0 (0,0%)	19 (95,0%)			0 (0,0%)

Таблица 3 Индивидуальные и средние (\pm SD) количества живых *L. casei* DG® в образцах кала исследуемых детей (N=20) на исходном уровне, в период приема пробиотиков и в период последующего наблюдения.

Пациент	Количество живых <i>L. casei</i> DG® (\log_{10} КОЕ/г в кале)				
	Исходный уровень	Терапия в течение 1 недели		Последующее наблюдение	
	День - 2 (+1)	День 1 (+2)	День 4 (+2)	День 8 (+2)	День 11 (+2), 14 (+2), 17(+2), 20 (+2)
1	НПО	НПО	5,7	3,7	НПО
2	НПО	НПО	4,5	НПО	НПО
3	НПО	НПО	НПО	5,5	НПО
4	НПО	НПО	5,7	НПО	НПО
5	НПО	НПО	НПО	4,7	НПО
6	НПО	НПО	4,7	НПО	НПО
7	НПО	НПО	5,9	НПО	НПО
8	НПО	НПО	5,3	4,7	НПО
9	НПО	4	6,3	4	НПО
10	НПО	НПО	3,7	4,7	НПО
11	НПО	НПО	5	3,95	НПО
12 ^a	НПО	НПО	5,3	НПО	НПО ^b
13	НПО	НПО	5,9	3,3	НПО
14	НПО	НПО	5	4,7	НПО
15	НПО	4,8	5,3	4	НПО
16	НПО	НПО	5,9	4,3	НПО
17	НПО	НПО	5,5	4,5	НПО
18	НПО	4,5	НПО	НПО	НПО
19	НПО	НПО	НПО	НПО	НПО
20	НПО	НПО	5,3	4,5	НПО
Среднее \pm CO	НПО	0,5 \pm 1,6	4,3 \pm 2,3	2,8 \pm 2,2	НПО

НПО – ниже предела обнаружения. Значения НПО в дни 1 (+1), 4 (+2), 8 (+2) считали «0» в расчете средних значений \pm CO.

^aПациент 12 досрочно прекратил участие в исследовании на 20 день. Этот пациент прекратил прием исследуемого препарата (дни 1-7), при этом оценки в дни 14 (+2), 17(+2) и 20 (+2) не производились.

^bТолько День 11 (+2)

У троих из 19 детей с живыми клетками (15,8%) LCDG были обнаружены в день 3 (время оценки: день 1 [+2]) в количестве 4–4,8 \log_{10} КОЕ/г, в то время как для других 17 детей живых LCDG не было обнаружено в этой временной точке. Примечательно, что у 11 (57,9%) из 19 детей с обнаруженными живыми клетками LCDG выживали в образцах кала до 3 дней после завершения терапии (день 10, то есть, время оценки: день 8 [+2]; Таблицы 2, 3). На этой временной точке количество живых LCDG варьировалось от 3,7 до 5,5 \log_{10} КОЕ/г, со средним значением \log_{10} 2,8 \pm 2,2 КОЕ/г.

Частота дефекации и консистенция стула

Среднее количество дефекаций в день за неделю было постоянным на протяжении периодов исследования (Рис. 2). Процент пациентов, сообщающих о 0, 1, 2 или 3 дефекациях в день, не изменился значительно с периода ввода и с периода приема до периода последующего наблюдения, при этом большинство пациентов сообщали об одной дефекации в день на протяжении всего исследования.

Наиболее частым баллом консистенции стула был 3 на протяжении большинства дней исследования (Рис. 3). Баллы 1 и 6 регистрировались редко (частота < 5%), а балл 7 никогда не был зарегистрирован. Балл 2 несколько увеличился, а балл 5 слегка снизился со временем во время и после терапии.

Согласно общей частоте дефекации и консистенции стула, дети чаще всего оценивали свою пищеварительную функцию как «Оптимальную» и на исходном уровне (50%), и в конце периода терапии (55%), большинство детей, у которых пищеварение было «Оптимальным» на исходном уровне, сохраняло ту же пищеварительную функцию на протяжении всех фаз исследования.

Пищеварение было «хорошим» для 30% детей на исходном уровне и для 25% детей на конец исследования. Примечательно, что для одного ребенка, у которого было «хорошее» пищеварение на исходном уровне, оно улучшилось до «Оптимального» начиная с дня 4 до последней оценки (день 8). Для остальных детей пищеварительная функция была оценена как «нормальная», у одного ребенка она улучшилась с «нормальной» до «хорошей» к концу исследования. Ни у одного ребенка пищеварение не получило оценку «плохое» на любом этапе исследования.

Рис. 2 Средний процент детей, сообщающих о 0, 1, 2 или 3 дефекациях в день на вводной фазе, во время терапии и последующего наблюдения (дни 8–14 и 15–22). $N=20$

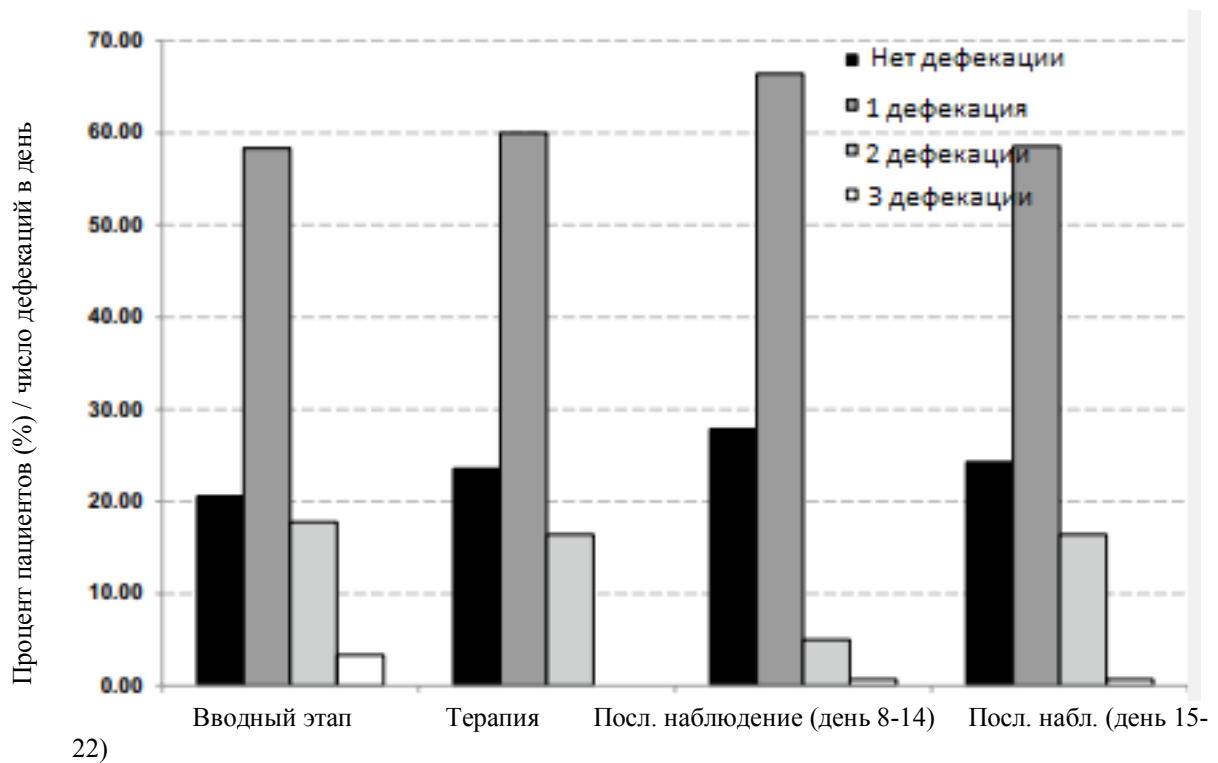
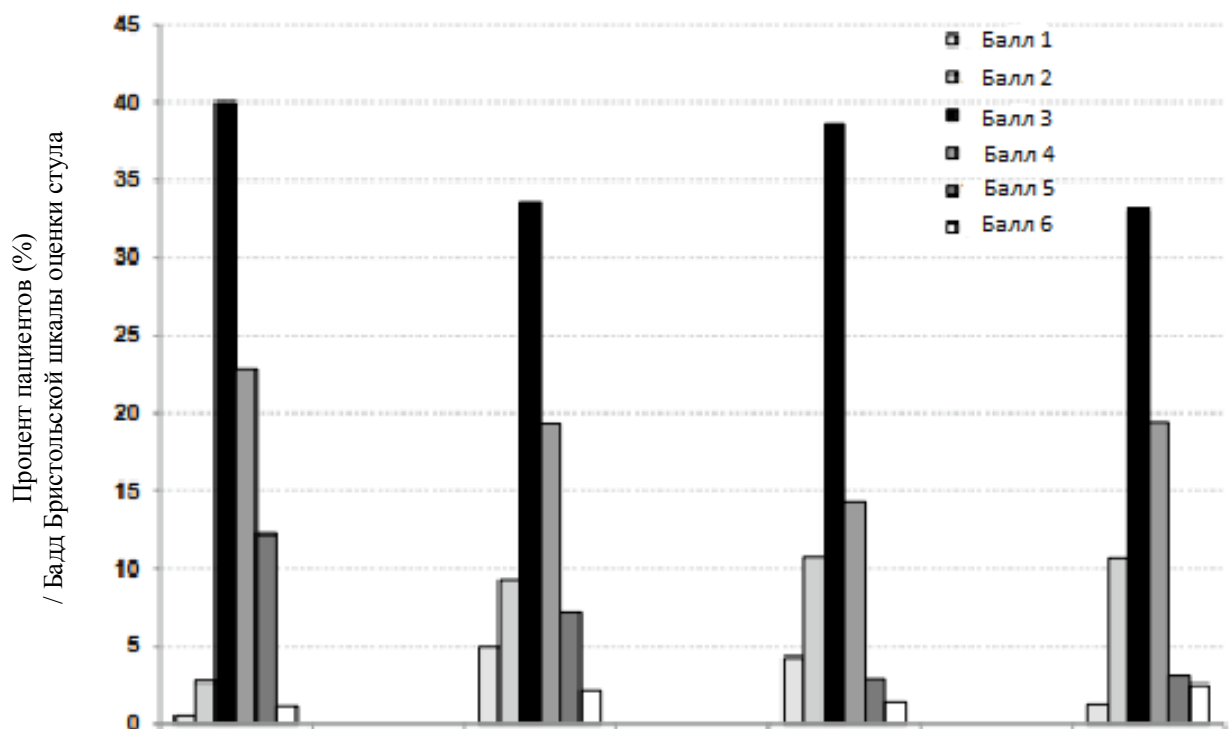


Рис. 3 Средние данные детей в процентах для каждого балла консистенции стула, оцениваемые ежедневно с помощью Бристольской шкалы баллов 1–6*, во время вводной фазы, терапии и последующего наблюдения (дни 8–14 и 15–22). $N=20$. *Балл 1: отдельные твердые комки в виде орехов; балл 2: в форме сосиски, но шишковатый, балл 3: в форме сосиски, но с трещинами на поверхности, балл 4: в форме сосиски или змеи, мягкий и гладкий; балл 5: мягкие шарики с четкими краями; балл 6: рыхлые комки с неровными краями, бесформенный стул; балл 7: водянистый, без твердых фрагментов, полностью жидкий.



Глобальная оценка и исследование безопасности

Индивидуальная глобальная оценка приема препарата была очень хорошей для 15 из 20 (75%) детей. Из остальных детей трое (15%) оценили прием препарата как хороший и двое (10%) как нормальный.

Исследуемый препарат, принимаемый участвующими в исследовании детьми один раз в день в течение 7 дней, показал очень хороший профиль безопасности. Только 4 пациента (20%) сообщили о нетяжелых или умеренных нежелательных явлениях, возникших в ходе лечения либо в конце терапии, либо во время фазы повторного наблюдения. Наиболее частым явлением была головная боль, которую испытали 2 (10%) детей. Об остальных нежелательных явлениях (то есть, боли в ротоглотке, неприятных ощущениях в животе, лихорадке и ознобе и абсцессе зуба) сообщили по 1 (5%) пациенту о каждом. Нежелательные явления, о которых сообщали пациенты, были признаны не связанными с приемом исследуемого препарата, большинство симптомов были симптомами гриппа, и все они разрешились до завершения исследования. Во время медицинского осмотра, проводимого во время завершающего визита, клинически релевантных данных не наблюдали.

Обсуждение

В настоящем исследовании мы впервые продемонстрировали, что LCDG способны выживать в желудочно-кишечном тракте у 3–12-летних детей во время и после 1-недельного приема питьевого состава для детей в ежедневной дозе 1×10^9 КОЕ.

У девятнадцати из 20 пациентов (95%) имелись КОЕ LCDG в образцах кала в течение периода приема, у троих из них и через 1–3 дня терапии. Максимальные количества живых LCDG были обнаружены на 4–6 день (среднее $4,3 \log_{10}$ КОЕ/г $\pm 2,3$ [диапазон 3,7–6,3 \log_{10} КОЕ/г]).

Эти результаты подтверждают способность штамма LCDG проходить через желудочно-кишечный барьер, то есть выживать в неблагоприятной среде желудочного сока, желчных кислот и гидролитических ферментов, также у детей. В соответствии с этими данными, результаты *in vitro* предварительно показали, что LCDG могут противостоять условиям экстремально низкого pH (до pH 3) и желчных кислот [19, 23].

Несмотря на то, что в предшествующих исследованиях не была проведена оценка выживаемости LCDG у детей, некоторое количество исследований было проведено на детях до года, которые принимали другие штаммы лактобактерий в других составах. В одном исследовании, проведенном на детях от 2 месяцев до 6 лет, страдающих острой диареей, которые принимали в течение 5 дней штаммы *L. rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 в качестве раствора молока/глюкозы ($1,2 \times 10^9$ КОЕ; пропорция штамма 1:1:1), жизнеспособные клетки бактерий были обнаружены в последний день терапии в образцах кала 37 из 46 (80,4%) детей, принимавших препарат [33].

В другом исследовании Marzotto и соавт. [34] наблюдали, что у 92% из 26 детей (в возрасте 12–24 месяцев) сохранялись живые клетки *L. paracasei* A в количествах от 4,3 до 8,2 \log_{10} КОЕ/г после первой недели приема 100 г ферментированного молока, содержащего 8,2 \log_{10} КОЕ/г этого штамма *Lactobacillus*. Как ранее сообщалось, в большинстве случаев принимаемые штаммы по-прежнему обнаруживались через несколько дней [35, 36]. В вышеупомянутом исследовании [34] процент детей с положительными образцами снизился до 16% во время периода отмытки, который следовал за общим 4-недельным периодом терапии. Важно отметить, что в настоящем исследовании живые LCDG в кале присутствовали до 10 дня, то есть, через три дня после последнего приема препарата, у 57,9% участвовавших в испытании детей в количествах от 3,7 до 5,5 \log_{10} КОЕ/г, что указывает на постоянную выживаемость.

Для сравнения, в исследовании, проведенном на здоровых взрослых добровольцах [20], которые придерживались своей обычной диеты на протяжении исследования, прием

капсулы с пробиотиками, содержащей по меньшей мере 24×10^9 живых LCDG, каждый день на протяжении 4 недель, привел к значительному увеличению ($p < 0,001$) в клетках бактерий, обнаруженных в образцах кала всех пациентов на конец приема пробиотиков в среднем количестве $7,5 \pm 0,7 \log_{10}$ КОЕ/г (в диапазоне $6,2-8,3 \log_{10}$ КОЕ/г), по сравнению с исходным уровнем (7/12 пациентов; среднее $5,1 \pm 0,3 \log_{10}$ КОЕ/г; в диапазоне $4,7-5,6 \log_{10}$ КОЕ/г). Следует отметить, что после 4-недельного периода отмывки количество клеток LCDG снизилось до количества до приема пробиотиков. Позднее была произведена оценка способности LCDG выживать в желудочно-кишечном тракте у здоровых добровольцев после 1-недельного приема доз по 1×10^9 КОЕ в каждой [30]. Основным результатом этого исследования было то, что все 20 включенных в исследование пациентов продемонстрировали живые клетки LCDG в образце кала с наиболее высокой концентрацией с 4 по 8 день с начала потребления пробиотиков. Живые клетки пробиотиков можно было встретить через 5 дней после завершения приема состава Энтеролактис®.

В исследовании Drago и соавт. [29] после приема один раз в день в течение 7 дней по $8,5 \times 10^9$ КОЕ LCDG у 12 здоровых взрослых живые клетки были обнаружены во всех образцах во время приема, средние количества варьировались от $1,2 \times 10^5$ в день 3 до $2,3 \times 10^6$ КОЕ/г в день 7, и через 1 неделю после отмены препарата (среднее значение $1,1 \times 10^6$ КОЕ/г).

Результаты настоящего исследования также согласуются с ранее опубликованными данными, полученными с различными штаммами лактобактерий, где бактерии были обнаружены в количествах от $< \log_{10}$ КОЕ/г до $8 \log_{10}$ КОЕ/г [см., например, 15–19, 29, 34, 36, 37].

В этом исследовании у 19 из 20 включенных детей были обнаружены живые клетки LCDG по меньшей мере один раз. У детей 3 и 5 они были обнаружены только во время фазы последующего наблюдения, вероятно, потому, что восстановление бактерий в образцах кала варьируется у разных людей [4]. Было неожиданно, что у пациента 10 было обнаружено более высокое число живых клеток LCDG в кале во время фазы последующего наблюдения, чем во время недели приема препарата. Как в других исследованиях, на которые приводятся ссылки, наблюдалась высокая вариабельность восстановления живых клеток в образцах кала. Известно, что питание может косвенно оказывать влияние на выживаемость поступивших с пищей пробиотиков [38]. Различные количества восстановленных клеток LCDG у разных пациентов может, таким образом, быть связано с потребляемой пищей, что может повлиять на скорость опустошения желудка и, таким образом, выживаемость пробиотиков [39], хотя иные факторы могли повлиять на наблюдаемую вариабельность. Наличие в кале поступивших с пищей штаммов, также называемое «устойчивостью», отражает не только дозу принятого штамма, но также и смертность клеток (в основном в верхних отделах желудочно-кишечного тракта), и последующее воспроизведение живых клеток.

В настоящем исследовании также оценивали пищеварительную функцию для оценки того, насколько прием LCDG в течение короткого времени здоровыми добровольцами детской популяции мог оказывать положительный эффект. Результаты продемонстрировали, что пищеварительная функция была «оптимальной» или «хорошей» у большинства пациентов уже до приема исследуемого препарата. Пищеварительная функция либо не изменилась (для 18 из 20 детей), либо улучшилась очень незначительно и только для 2 детей к концу первой недели приема по сравнению с исходным уровнем.

К тому же, большинство пациентов сообщили об одной дефекации каждый день на протяжении всего исследования с незначительными изменениями дефекации от периода к периоду исследования. Консистенция стула не менялась значительно на протяжении исследования с наиболее частым баллом 3 (*в форме сосиски, но с трещинами на поверхности*) за все время оценки. Следует отметить, что балл 3 является индикатором удовлетворительной консистенции стула. После терапии балл 2 (*в форме сосиски, но шишковатый*) слегка повысился, а балл 5 (*мягкие шарики*) слегка снизился, что предполагает очень незначительное улучшение пищеварения, не релевантное клинически, во время и после терапии. На основании имеющихся в настоящее время данных, штамм, *L.*

rhamnosus GG подтвердил свою эффективность при лечении острого гастроэнтерита у детей, предотвращении диареи, связанной с антибиотиками, и предотвращении внутрибольничной диареи [27, 40–42]. К тому же, подобно результатам настоящего исследования, предыдущее исследование на здоровых добровольцах продемонстрировало, что 2-недельный прием ферментированного молока, содержащего штамм *L. casei* (то есть, *L. casei* Shirota) не привел к изменению перистальтики кишечника или консистенции стула [18].

В настоящем исследовании общее состояние пищеварения включенных в исследование здоровых детей, включая частоту дефекации, консистенцию стула и пищеварительную функцию, уже были удовлетворительными на начало исследования вследствие ограничений, предполагаемых критериями включения в исследование. Очень вероятно, что это, вместе с кратким периодом терапии, могло стать причиной того, что релевантные изменения наблюдали до терапии пробиотиками.

В настоящем исследовании также подтвердили хороший профиль безопасности и приемлемый вкус питьевого детского состава LCDG.

В заключение, настоящее предварительное исследование, проведенное с участием здоровых детей в возрасте от 3 до 12 лет, впервые подтвердило, что *L. casei* DG® выживает в желудочно-кишечном тракте при приеме с детским питьевым пробиотическим составом, содержащим 1×10^9 КОЕ, и сохраняется в кишечнике до 3 дней после завершения приема пробиотиков, что демонстрирует устойчивость к желудочному соку, гидролитическим ферментам и желчным кислотам.

Выражение благодарности. Мы хотели бы поблагодарить «Кросс Рисерч С.А.» (CROSS Research S.A.) (Швейцария) за координирование исследования и кафедру питания, экологии и нутрициологии (DeFENS) Миланского университета (Италия) за исследование восстановления из образцов кала. Это исследование спонсировала организация «СОФАР С.п.А.» (SOFAR S.p.A.), Италия.

Соответствие этическим стандартам проведения исследований

Утверждения соответствия этическим стандартам. Протокол исследования (№ PSC-DS RECENT-BS 16) был утвержден этическим комитетом кантона Тичино, Швейцария. Всем пациентам предоставили детальное описание исследования, и все из них дали письменное информированное согласие перед включением в исследование. Исследование было проведено с августа по октябрь 2017 года в соответствии с Хельсинкской декларацией, гармонизированными европейскими стандартами по надлежащей клинической практике (ICH E6 1.24) и применимыми местными законами.

Конфликт интересов. W.F. является сотрудником «СОФАР С.п.А.» (SOFAR S.p.A.), Италия; M.R. и C.L. являются сотрудниками «Кросс Рисерч С.А.» (CROSS Research S.A.); SA, RK и S.G. являются сотрудниками кафедры питания, экологии и нутрициологии (DeFENS), Миланский университет. «Кросс Рисерч С.А.» и кафедра питания, экологии и нутрициологии, Миланский Университет, заключили контракт на проведение работ с «СОФАР С.п.А.» (заказчиком) и получили оплату за свои услуги. Авторы сообщают, что у них нет иных отношений или деятельности, которые могли бы повлиять на осуществляемую работу.

Открытый доступ Настоящая статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая допускает неограниченное использование, распространение и воспроизведение любыми средствами, при условии, что вы надлежащим образом упоминаете авторов и источники, даете ссылку на лицензию и отмечаете все внесенные изменения.

Ссылки на литературу

1. FAO and WHO working group (2002) Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Accessed 20 Apr 2018
2. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(8):506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
3. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM (2005) Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol* 16(2):204–211. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.003>
4. Derrien M, van Hylekama Vlieg JET (2015) Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol* 23(6):354–366. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>
5. Ljungh A, Wadström T (2006) Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 7(2):73–89
6. Guglielmetti S, Mora D, Gschwender M, Popp K (2011) Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life—a double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 33(10):1123–1132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04633.x>
7. Shen J, Zuo ZX, Mao AP (2014) Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis* 20(1):21–35. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000437495.30052.be>
8. Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D, Irwin C (2018) A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? *Eur J Clin Nutr*. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0135-9>
9. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G, Gobbato N (1995) Symposium: probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. *J Dairy Sci* 78:1597–1606
10. Perdigon G, Fuller R, Raya R (2001) Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol* 1:27–42
11. Dommels YE, Kemperman RA, Zebregs YE, Draaisma RB, Jol A, Wolvers DA, Vaughan EE, Albers R (2009) Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a lowfat probiotic spread. *Appl Environ Microbiol* 75(19):6198–6204. <https://doi.org/10.1128/AEM.01054-09>
12. Saxelin M, Lassig A, Karjalainen H, Tynkkynen S, Surakka A, Vapaatalo H, Järvenpää S, Korpela R, Mutanen M, Hatakka K (2010) Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *Int J Food Microbiol* 144(2):293–300. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.009>
13. Hütt P, Köll P, Stsepetova J, Alvarez B, Mändar R, Krogh Andersen K, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M (2011) Safety and persistence of orally administered human *Lactobacillus* sp. strains in healthy adults. *Benef Microbes* 2(1):79–90. <https://doi.org/10.3920/BM2010.0023>
14. Tuohy KM, Pinart-Gilberga M, Jones M, Hoyles L, McCartney AL, Gibson GR (2007) Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J Appl Microbiol* 102(4):1026–1032. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03154.x>
15. Larsen CN, Nielsen S, Kæstel P, Brockmann E, Bennedsen M, Christensen HR, Eskesen DC, Jacobsen BL, Michaelsen KF (2006) Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr* 60:1284–1293. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602450>
16. Saxelin M, Pessi T, Salminen S (1995) Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *Int J Food Microbiol* 25:199–203

17. Oozeer R, Leplingard A, Mater DD, Mogenet A, Michelin R, Seksek I, Marteau P, Doré J, Bresson JL, Corthier G (2006) Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl Environ Microbiol* 72(8):5615–5617. <https://doi.org/10.1128/AEM.00722-06>
18. Wang R, Chen S, Jin J, Ren F, Li Y, Qiao Z, Wang Y, Zhao L (2015) Survival of *Lactobacillus casei* strain Shirota in the intestines of healthy Chinese adults. *Microbiol Immunol* 59(5):268–276. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12249>
19. De Vecchi E, Nicola L, Zanini S, Drago L (2008) In vitro screening of probiotic characteristic of some Italian products. *J Chemother* 20(3):341–347. <https://doi.org/10.1179/joc.2008.20.3.341>
20. Ferrario C, Taverniti V, Milani C, Fiore W, Laureati M, De Noni I, Stuknyte M, Chouaia B, Riso P, Guglielmetti S (2014) Modulation of faecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J Nutr* 144:1787–1796. <https://doi.org/10.3945/jn.114.197723>
21. Balzaretto S, Taverniti V, Guglielmetti S, Fiore W, Minuzzo M, Ngo HN, Ngere JB, Sadiq S, Humphreys PN, Laws AP (2017) A novel rhamnase-rich hetero-exopolysaccharide 1 isolated from *Lactobacillus paracasei* DG activates THP-1 human monocytic cells. *Appl Environ Microbiol* 17(3):83. <https://doi.org/10.1128/AEM.02702-16>
22. Cremon C, Guglielmetti S, Gargari G, Taverniti V, Castellazzi AM, Valsecchi C, Tagliacarne C, Fiore W, Bellini M, Bertani L, Gambaccini D, Cicala M, Bastianello G, Vecchi M, Pagano I, Barbaro MR, Bellacosa L, Stanghellini V, Barbara G (2017) Effect of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 on symptoms, gut microbiota, short chain fatty acids, and immune activation in patients with irritable bowel syndrome: a pilot randomized clinical trial. *United Eur Gastroenterol J* 1:1–10. <https://doi.org/10.1177/2050640617736478>
23. Balzaretto S, Taverniti V, Rondini G, Marcollegio G, Minuzzo M, Remagni MC, Fiore W, Arioli S, Guglielmetti S (2015) The vaginal isolate *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) is suitable for oral administration. *Front Microbiol* 6:952. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00952>
24. D’Inca R, Barollo M, Scarpa M, Grillo AR, Brun P, Vettorato MG, Castagliuolo I, Sturniolo GC (2011) Rectal administration of *Lactobacillus casei* DG modifies flora composition and Toll-like receptor expression in colonic mucosa of patients with mild ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 56:1178–1187. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1384-1>
25. Turco F, Andreozzi P, Palumbo I, Zito FP, Cargioli M, Fiore W, Gennarelli N, De Palma GD, Sarnelli G, Cuomo R (2017) Bacterial stimuli activate nitric oxide colonic mucosal production in diverticular disease. Protective effects of *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572). *United Eur Gastroenterol J* 5(5):715–724. <https://doi.org/10.1177/2050640616684398>
26. Tursi A, Brandimarte G, Elisei W, Picchio M, Forti G, Pianese G, Rodino S, D’Amico T, Sacca N, Portincasa P, Capezzuto E, Lattanzio R, Spadaccini A, Fiorella S, Polimeni F, Polimeni N, Stoppino V, Stoppino G, Giorgetti GM, Aiello F, Danese S (2013) Randomised clinical trial: mesalazine and/or probiotics in maintaining remission of symptomatic uncomplicated diverticular disease—a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 38:741–751. <https://doi.org/10.1111/apt.12463>
27. Rosania R, Giorgio F, Principi MB, Amoroso A, Monno R, Di Leo A, Ierardi E (2013) Effect of probiotic or prebiotic supplementation on antibiotic therapy in the small intestinal bacterial overgrowth: a comparative evaluation. *Curr Clin Pharmacol* 8(2):169–172
28. Compare D, Rocco A, Coccoli P, Angrisani D, Sgamato C, Iovine B, Salvatore U, Nardone G (2017) *Lactobacillus casei* DG and its postbiotic reduce the inflammatory mucosal response: an ex-vivo organ culture model of postinfectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol* 17(1):53. <https://doi.org/10.1186/s12876-017-0605-x>
29. Drago L, De Vecchi E, Valli M, Nicola L, Lombardi A, Gismondo MR (2002) Colonizzazione intestinale di *Lactobacillus casei* subsp. *casei* I-1572 CNCM (*L. casei* DG) in volontari sani e in topi germ-free. *Farmaci e terapia* 19(1/2):72–76 (article in Italian)
30. Arioli S, Koirala R, Taverniti V, Fiore W, Guglielmetti S (2018) Quantitative recovery of viable *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (*L. casei* DG®) after gastrointestinal passage in healthy adults. *Front Microbiol* 9:1720. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01720>

31. SSP SGP (2012) Growing curves. http://www.swiss-paediatric s.org/sites/default/files/recommandations/courbes_de_croissance s/pdf/perzentilen_2012_09_15_sgp_i.pdf. Accessed 20 Jun 2017
32. Lewis SJ, Heaton KW (1997) Stool form as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol* 32:920–924. <https://doi.org/10.3109/00365529709011203>
33. Szymański H, Chmielarczyk A, Strus M, Pejcz J, Jawień M, Kochan P, Heczko PB (2006) Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children. *Dig Liver Dis* 38(Suppl 2):S274–S276. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60009-7](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60009-7)
34. Marzotto M, Maffei C, Paternoster T, Ferrario R, Rizzotti L, Pellegrino M, Dellaglio F, Torriani S (2006) *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. *Res Microbiol* 157(9):857–866. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.007>
35. Firmesse O, Mogenet A, Bresson JL, Corthier G, Furet JP (2008) *Lactobacillus rhamnosus* R11 consumed in a food supplement survived human digestive transit without modifying microbiota equilibrium as assessed by real-time polymerase chain reaction. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14(1–3):90–99. <https://doi.org/10.1159/000106087>
36. Fujimoto J, Matsuki T, Sasamoto M, Tomii Y, Watanabe K (2008) Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain Shirota in human feces with strain-specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA. *Int J Food Microbiol* 126(1–2):210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.022>
37. Ahlroos T, Tynkkynen S (2009) Quantitative strain-specific detection of *Lactobacillus rhamnosus* GG in human faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 106(2):506–514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04018.x>
38. Salonen A, de Vos WM (2014) Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu Rev Food Sci Technol* 5:239–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182554>
39. Russo F, Clemente C, Linsalata M, Chiloiro M, Orlando A, Marconi E, Chimienti G, Riezzo G (2011) Effects of a diet with inulin-enriched pasta on gut peptides and gastric emptying rates in healthy young volunteers. *Eur J Nutr* 50(4):271–277. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0135-6>
40. Hojsak I (2017) Probiotics in children: what is the evidence? *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 20(3):139–146. <https://doi.org/10.5223/pghn.2017.20.3.139>
41. Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF (2010) Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 10(11):CD003048. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003048.pub3>
42. Szajewska H, Skórka A, Ruszczyński M, Gieruszczak-Białek D (2007) Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 25(8):871–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03282.x>