



Wissenschaftliches Dossier

Präbiotika
(GOS aus Lactose)

Probiotika
(*L. fermentum*)

L. fermentum CECT5716 und Galacto-Oligosaccharide in HiPP Combiotik® Säuglingsnahrungen

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| 1. Der Säugling und seine Mikrobiota | 7 |
| 1.1. Die initiale Besiedlung | 8 |
| 1.2. Die Darmmikrobiota – entscheidend für das Immunsystem | 9 |
| 1.3. Welche Faktoren beeinflussen die Darmmikrobiota? | 10 |
| 1.4. Pro-, Prä- und Synbiotika – ihr Einfluss auf die Darmmikrobiota | 13 |
| 1.5. Einfluss der Muttermilch auf die Darmmikrobiota des Säuglings | 13 |
| 2. Anforderungen an Pro- und Präbiotika in Säuglingsnahrungen | 19 |
| 3. <i>L. fermentum</i> CECT5716 – ein einzigartiges Probiotikum | 21 |
| 3.1. Auswahlkriterien für <i>L. fermentum</i> CECT5716 | 21 |
| 3.2. Sicherheitsstudien zu <i>L. fermentum</i> CECT5716 | 22 |
| 3.3. Wirksamkeitsstudien zu <i>L. fermentum</i> CECT5716 | 24 |
| 4. Galacto-Oligosaccharide – bewährte Präbiotika | 29 |
| 4.1. GOS sind bei Säuglingen sicher, gut verträglich und haben präbiotische Effekte | 30 |
| 4.2. GOS beeinflussen die Stuhlcharakteristika | 32 |
| 4.3. GOS zeigen positiven Effekt bei infantiler Kolik | 33 |
| 4.4. Weitere Sicherheitsaspekte von GOS | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 5. Studien zu Sicherheit und Nutzen der Kombination von <i>L. fermentum</i> CECT5716 und GOS bei Säuglingen | 35 |
| 5.1. Die Kombination aus <i>L. fermentum</i> CECT5716 und GOS ist sicher | 37 |
| 5.2. Die Kombination aus <i>L. fermentum</i> CECT5716 und GOS ist gut verträglich | 37 |
| 5.3. Die Kombination aus <i>L. fermentum</i> CECT5716 und GOS verändert die Mikrobiota | 40 |
| 5.4. Die Kombination aus <i>L. fermentum</i> CECT5716 und GOS führt zu einer verringerten Infektionshäufigkeit | 40 |
| 6. Zusammenfassung und Fazit | 43 |
| 7. Auswahl an Abstracts | 47 |
| 7.1. <i>L. fermentum</i> CECT5716 | 47 |
| 7.2. Galacto-Oligosaccharide (GOS) | 58 |
| 7.3. Kombination <i>L. fermentum</i> CECT5716 und GOS | 61 |
| 8. Literaturverzeichnis | 65 |
| Abkürzungsverzeichnis | 70 |
| Impressum | 71 |

1. Der Säugling und seine Mikrobiota

Die Anzahl der mit dem Menschen vergesellschafteten Mikroorganismen ist enorm, man geht von 10^{14} bis 10^{15} Bakterienzellen aus. Damit übersteigt die Zahl der Bakterien die der menschlichen Körperzellen etwa um das Zehnfache. Streng genommen bestehen wir also nur aus 10 % Mensch und aus 90 % Mikroben. Was die Zahl der verschiedenen Spezies angeht, sprechen konservative Quellen von 400 bis 500, andere Autoren bereits von mindestens 1000. Genau lässt sich das aufgrund der fehlenden Kultivierbarkeit vieler Mikroorganismen nicht beziffern. Fakt scheint aufgrund neuer Studien allerdings zu sein, dass es keine vollkommen sterile Region in unserem Körper gibt. Neben stark besiedelten Regionen wie Urogenitaltrakt, Verdauungstrakt und Mundhöhle wurden Bakterien bzw. deren DNA z. B. auch im Gehirn und in der Plazenta nachgewiesen (Reid G et al. 2015).

Die bei weitem größte Ansammlung von Bakterien (knapp 99 %) findet sich unzweifelhaft im Darm. Dies macht aus verschiedenen Gründen Sinn. Zum einen stellen die Nahrungsreste im Darm eine optimale Nahrungsquelle für die Mikroorganismen dar. Zum anderen ist die riesige Darmoberfläche Voraussetzung für die effektive Resorption von Nährstoffen. Würde man den Darm mit all seinen Falten und Zotten zu einer Fläche auseinanderfalten, ergäbe sich eine Fläche von ca. 400 m² (zum Vergleich: Lunge ca. 100 m², Haut ca. 2 m²). Gleichzeitig kommt unser Körper tagtäglich in Kontakt mit Antigenen und Fremdorganismen, die wir mit der Nahrung aufnehmen, und das darmassoziierte Immunsystem (GALT – gut-associated lymphatic tissue) muss unterscheiden, was davon als pathogen bzw. apathogen einzustufen ist. Mehr als zwei Drittel der immunkompetenten Zellen befinden sich im Darm. Wie später noch zu sehen sein wird, arbeiten unser Immunsystem und die Darmmikrobiota eng zusammen. Diese Mikroorganismen sind gerade zu Beginn des Lebens unabdingbar, da sie das noch unreife Immunsystem des Säuglings „trainieren“.

Ein ausgewogenes bakterielles Gleichgewicht stellt eine wichtige Grundlage für die menschliche Gesundheit dar. So ist eine ausreichend vorhandene physiologische Bakterienbesiedlung notwendig, um von außen eindringende pathogene Keime zu verdrängen. Darüber hinaus produzieren Mikroorganismen zahlreiche Substanzen, die das Darmmilieu und somit den gesamten Stoffwechsel beeinflussen.

Die körpereigene Darmmikrobiota hat die Eigenschaft, Wachstum und Ausbreitung neuer Bakterien im Darm zu verhindern. Dadurch wird die Ausbreitung enteropathogener Bakterien unterbunden bzw. erschwert (Kolonisierungsresistenz). Eine gut ausgebildete körpereigene Darmmikrobiota ist somit die beste „Waffe“ gegen den Angriff von Viren und Bakterien, die eine infektiöse Diarrhoe auslösen können.

1.1. Die initiale Besiedlung

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Geburt den Startschuss für die initiale Besiedlung des kindlichen Organismus mit Bakterien gibt. Neuere Forschungsdaten weisen allerdings darauf hin, dass sich der erste Kontakt mit Bakterien bereits im Mutterleib ereignet. In verschiedenen Studien konnten Bakterien bzw. deren DNA bereits im Fruchtwasser, in der Plazenta, im Nabelschnurblut, im Mekonium und sogar in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden (DiGiulio DB et al. 2008; Jiménez E et al. 2005 und 2008; Satokari R et al. 2009; Pelzer ES et al. 2013). Nach heutigem Wissensstand müssen wir also davon ausgehen, dass wir vom Zeitpunkt der Konzeption an mit Bakterien konfrontiert sind. Es ist hinlänglich bekannt, dass der Säugling beim Durchtritt durch den Geburtskanal mit Vaginal- und Rektalkeimen der Mutter beimpft wird. Diese Keime findet man später auch im Darm des Säuglings wieder.

Die Mikrobiota des Säuglings verändert sich im Laufe der Zeit. Obgleich die Details nicht vollständig bekannt sind, geht man heute von einem klaren Besiedlungsmuster aus. Zunächst siedeln sich sogenannte fakultative Anaerobier oder aerotolerante Keime als „Pionierkeime“ an. Zu den Erstbesiedlern des Darms zählen Enterobakterien, Lactobazillen (v.a. *L. fermentum*, *L. acidophilus* und *L. salivarius*) sowie verschiedene Enterokokken und Staphylokokken (Bischoff SC 2009). Diese Bakterien tolerieren bzw. verbrauchen den vorhandenen Sauerstoff im Darm und schaffen so das Milieu für die zweite Gattung, die strikt anaeroben Keime, von denen wichtige Vertreter die Bacteroides sowie die Bifiduskeime darstellen (**Abbildung 1**). Im Laufe der Besiedlung stellen die anaeroben Keime die bei weitem größte Zahl an Bakterien im Darm. Dies bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass sie auch die wichtigste Gruppe darstellen. Letztlich ist es das Zusammenspiel der verschiedenen Mikroorganismen, das eine „gesunde“ Darmmikrobiota ausmacht.

Die Umstellung der Säuglings-Mikrobiota auf eine Erwachsenen-Mikrobiota beginnt bereits im Alter von etwa fünf Tagen und wird mit dem Zeitpunkt der Beikosteneinführung beschleunigt (Palmer C et al. 2007). Wann genau sich die intestinale Zusammensetzung stabilisiert und eine Artenvielfalt wie beim Erwachsenen erreicht wird, ist umstritten. Man geht heute davon aus, dass dies im Alter zwischen zwei und fünf Jahren der Fall ist (Rodríguez JM et al. 2015). Danach ändert sich die Darmmikrobiota bis ins Seniorenalter kaum noch (**Abbildung 1**).

Jeder Mensch hat eine individuelle und höchst variable Zusammensetzung von Darmmikroorganismen, obwohl allen Menschen eine Kernkombination von Mikroorganismen gemeinsam ist (Tremaroli V, Bäckhed F 2012). Nach neueren Studien scheint es beim Menschen je nach dem dominant vorkommenden Bakterienstamm (Bacteroides, Prevotella und Ruminococcus) drei sogenannte Enterotypen zu geben (Arumugam M et al. 2011). Welche Bedeutung dies möglicherweise für das Individuum hat (Vorteile, Risiken), ist Gegenstand laufender Studien.

Die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota wirkt sich auf den gesamten Organismus aus, da eine Reihe von Darmfunktionen und das Immunsystem davon beeinflusst werden.

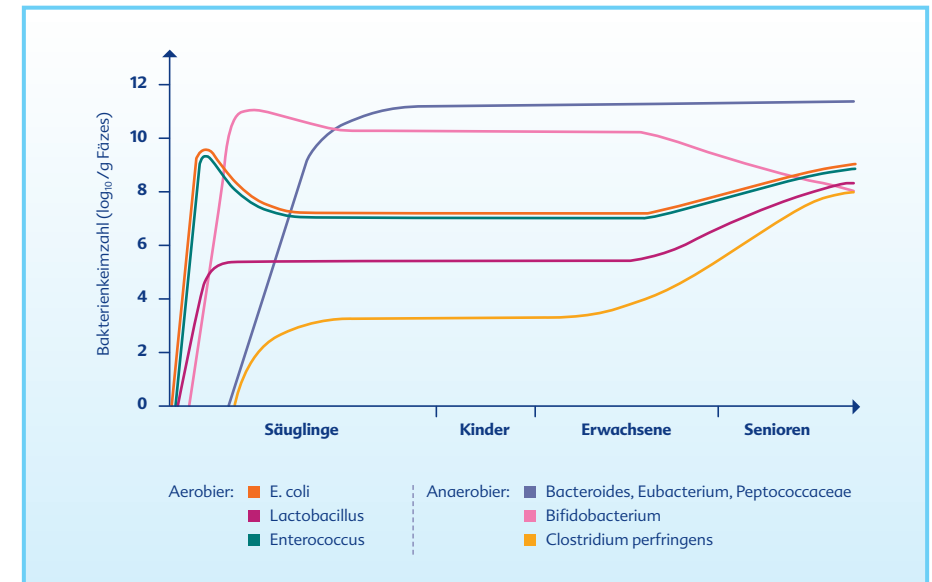


Abb. 1: Veränderung der Darmmikrobiota im Laufe des Lebens (modifiziert nach Schulze J et al. 2008)

1.2. Die Darmmikrobiota – entscheidend für das Immunsystem

Viele Organsysteme sind zum Zeitpunkt der Geburt noch unreif. Dies gilt auch für das Immunsystem, das erst „trainiert“ werden muss, um seine volle Leistung zu bringen. Genau diese Aufgabe übernimmt die Darmmikrobiota. Mit verschiedenen Mechanismen wirkt sie direkt gegen Fremdkeime und hilft damit, Infektionen zu vermeiden. So stellen die positiven Bakterien im Darm etwa eine natürliche Barriere gegenüber Fremdkeimen dar, d. h. sie besetzen Rezeptoren an den Darmepithelzellen, die dadurch für pathogene Keime nicht zugänglich sind.

Des Weiteren produzieren die positiven Bakterien Substanzen mit bakteriostatischer und/oder bakterizider Wirkung. Durch die Verstoffwechslung von unverdauten Nahrungsresten produzieren manche Stämme, wie z. B. Lactobazillen, Milchsäure. Diese senkt den pH-Wert im Darm ab und sorgt damit für ein Milieu, das für viele pathogene Keime lebensfeindlich ist.

Ebenso wichtig wie die direkte Wirkung gegen pathogene Keime ist die Modulation des Immunsystems durch die Darmbakterien. Diese unterstützen die Reifung des darmassoziierten Immunsystems (GALT) und sorgen für die Erhöhung und die Differenzierung von Immunzellen im Darm. Ganz bedeutend tragen sie dazu bei, dass das Immunsystem eine Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien aufbaut, also die „guten“ toleriert und die „bösen“ bekämpft. Die schützenden Abwehrprozesse werden sowohl vom angeborenen als auch vom erworbenen Immunsystem gesteuert.

Wie wichtig dieser Vorgang ist, konnte in einem Tierversuch eindrucksvoll gezeigt werden. Ursprünglich keimfreie Mäuse, die in normale, der Umwelt gegenüber offene Käfige überführt werden und somit einer mikrobiell kontaminierten Umwelt ausgeliefert sind, sterben häufig nach kurzer Zeit an simplen Infektionen. Grund dafür ist, dass keimfrei aufgezogene Mäuse nur die angeborene unspezifische und kaum eine entwickelte spezifische Immunabwehr im Darm besitzen. Werden den keimfreien Mäusen jedoch vorher niedrig dosierte Mischungen der tierarttypischen Darmflora implantiert, überleben sie im offenen Käfig. Durch die rasche Entwicklung eines funktionsfähigen GALT werden sie vor Infektionen mit Umweltkeimen geschützt (Schulz J et al. 2008).

Für die Entwicklung des Immunsystems und die Abwehr von Infektionen ist somit eine gesunde Darmmikrobiota entscheidend, denn gastrointestinale Bakterien gelten als frühester und stärkster Stimulus für die Entwicklung des darmassoziierten Immunsystems. Forscher sind sich einig, dass einer guten und planmäßigen Entwicklung der Darmmikrobiota große Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte, da diese bei der Reifung des Immunsystems und bei der Abwehr von Infektionen eine wichtige Rolle spielt.

Es mehren sich die Hinweise darauf, dass eine Dysbiose, ein Ungleichgewicht der Darmmikrobiota, langfristig negative Folgen für die Gesundheit haben kann. Genannt werden hier höhere Risiken für Übergewicht, Allergien, Diabetes, Darmerkrankungen, Infektionen sowie sogar Angstzustände und Depressionen (Collado MC et al. 2012; Houghteling PD, Walker WA 2015).

1.3. Welche Faktoren beeinflussen die Darmmikrobiota?

Wie bereits erwähnt, sind es besonders die frühen Einflussfaktoren, die die Entwicklung der physiologischen Darmmikrobiota nachhaltig prägen können. Schon während der Schwangerschaft sind es die mütterliche Mikrobiota sowie der Gesundheitsstatus und Lebensstil der Mutter, die Einfluss darauf nehmen, welche Mikroben sie an ihr Kind weitergeben wird. Zudem spielen Art und Zeitpunkt der Geburt, Wirtsgenetik, Ernährung und Umweltfaktoren wie Geschwister, Aufenthalt in Kinderkrippen, Medikation (Antibiotika) sowie Kontakt zu Haustieren eine große Rolle (**Abbildung 2**).

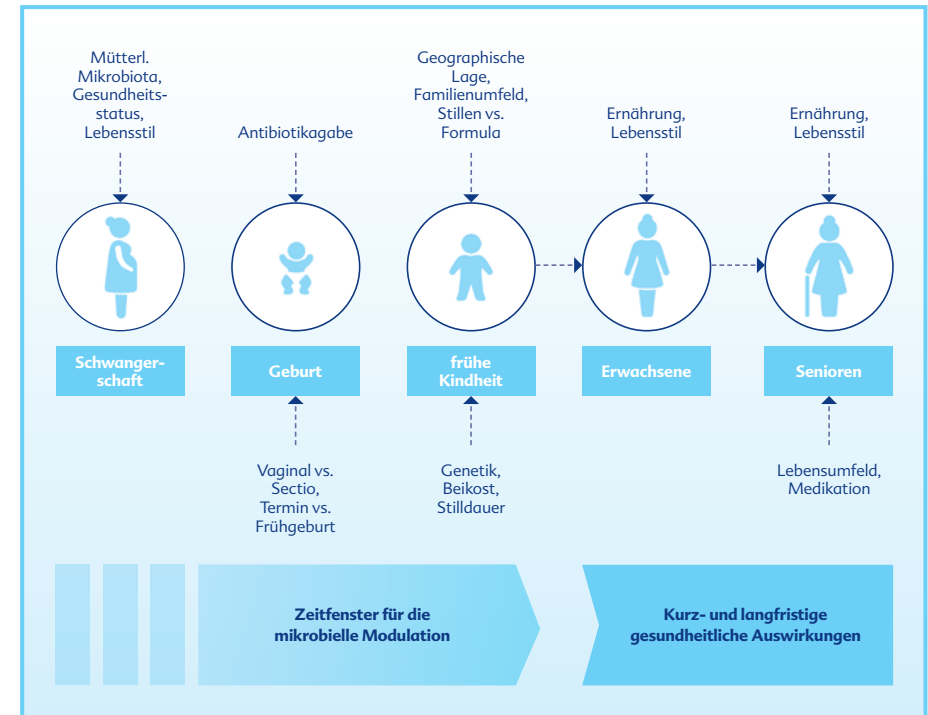


Abb. 2: Faktoren, die die Darmmikrobiota beeinflussen

(Rodríguez JM et al. 2015)

1.3.1. Die Rolle des Geburtsvorgangs

Einen starken Einfluss auf die bakterielle Besiedlung des Darms des Neugeborenen hat der Gebärvorgang. Während einer vaginalen Geburt kommt das Kind mit der mütterlichen vaginalen- und fäkalen Flora in Kontakt. Vaginal geborene Kinder weisen gegenüber per primärer Sectio geborenen Kindern eine deutlich physiologischere Darmmikrobiota auf. Diese gleicht bei vaginaler Entbindung mehr derjenigen des mütterlichen Darms, während sich bei per Sectio entbundenen Kindern mehr Hautkeime und Krankenhauskeime nachweisen lassen (**Abbildung 3**).

Dementsprechend wird das Risiko für spätere Erkrankungen bei Sectio-Kindern als höher eingeschätzt (Cho CE, Norman M 2013). Da üblicherweise bei Sectio eine prophylaktische Antibiotikagabe der Mutter erfolgt, hat dies einen weiteren negativen Einfluss auf die Keimflora von Mutter und Kind.

Die Unterschiede können bis zum siebten Lebensjahr bestehen bleiben (Renz-Polster H et al. 2005; Cho CE, Norman M 2013) und es gibt inzwischen zahlreiche Hinweise aus der Literatur, dass eine Kaiserschnittentbindung aufgrund der ungünstiger zusammengesetzten Darmmikrobiota mit späteren gesundheitlichen Risiken wie z. B. Allergie, Asthma, Diabetes Typ 1 sowie Zöliakie assoziiert ist (Cho CE, Norman M 2013; Thavaganam S et al. 2008; Laubereau B et al. 2004).

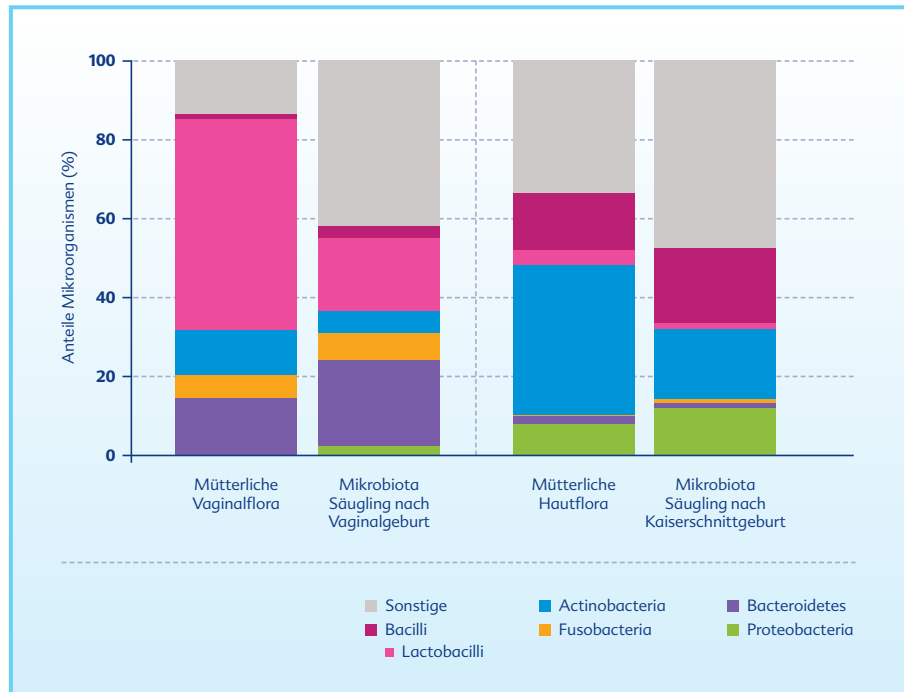


Abb. 3: Auswirkungen des Geburtsmodus auf die Mikrobiota des Säuglings (modifiziert nach Dominguez-Bello MB et al. 2010)

1.3.2. Die Rolle der Ernährung

Eine Reihe von Studien zeigt, dass flaschenernährte Kinder eine andere Darmmikrobiota aufweisen als gestillte Kinder. Die Mikroflora gestillter Kinder wird vor allem von Bifidusbakterien und Lactobazillen dominiert. Im Vergleich zu flaschenernährten Kindern zeigt sie eine geringere Zahl der Bacteroides, Clostridium-coccoides-Gruppe, Staphylokokken und Enterobakterien (Matamoros S et al. 2013). Kinder, die eine industriell hergestellte Formula erhalten, zeigen zudem ein breiteres Spektrum an Darmbakterien auf.

1.4. Pro-, Prä- und Synbiotika – ihr Einfluss auf die Darmmikrobiota

Die körpereigene Darmmikrobiota kann sowohl durch aufgenommene Mikroorganismen als auch durch spezielle Nahrungsinhaltsstoffe beeinflusst werden. Im Einzelnen dreht es sich hier um die Pro- und Präbiotika bzw. um ihre Kombination, die Synbiotika.

Probiotika sind lebende, nichtpathogene Mikroorganismen, die – in ausreichender Zahl verabreicht – einen präventiven oder therapeutischen Effekt auf den Makroorganismus haben, ihm also einen gesundheitlichen Nutzen bringen (FAO/WHO 2001). Zu den bekanntesten Probiotika zählen Milchsäurebakterien, vor allem spezielle Lactobacillus- und Bifidus-Stämme.

Präbiotika hingegen sind spezifische Substrate, welche im oberen Teil des Verdauungstraktes weder enzymatisch gespalten noch absorbiert werden können. Sie gelangen unverdaut in den Dickdarm, wo sie als Substrat für die bakterielle Fermentation dienen und die Vermehrung apathogener Darmbakterien stimulieren (Gibson GR, Roberfroid MD 1995). Durch diesen Prozess wird das Wachstum der Bakterien angeregt, die zum Abbau der Präbiotika in der Lage sind. Es handelt sich vorwiegend um Bifidobakterien und Lactobazillen. Durch deren Vermehrung und Stoffwechselaktivitäten können sich potentielle pathogene Erreger weniger stark ansiedeln. So produzieren die Darmbakterien beispielsweise durch den Abbau von Kohlenhydraten kurzkettige Fettsäuren, welche wiederum den pH-Wert im Darm absinken lassen und damit ein für viele Pathogene ungünstiges Milieu schaffen. Zu den präbiotisch wirksamen Substanzen zählen beispielsweise Galacto-Oligosaccharide, Fructo-Oligosaccharide und Inulin.

Sind in einem Lebensmittel sowohl Pro- als auch Präbiotika enthalten, spricht man bei dieser Kombination auch von **Synbiotika** (Bischoff SC 2009).

1.5. Einfluss der Muttermilch auf die Darmmikrobiota des Säuglings

Die Ernährung des Kindes stellt einen wichtigen Einflussfaktor auf die intestinale Darmmikrobiota dar. Muttermilch ist auch in diesem Bereich als Goldstandard anzusehen, denn sie enthält u. a. probiotische Bakterien mit positiver Wirkung sowie präbiotisch wirkende Muttermilch-Oligosaccharide. Da Muttermilch beide Komponenten vereint (Prä- und Probiotika), wird sie auch als natürliches synbiotisches Lebensmittel bezeichnet.

1.5.1. Muttermilch ist nicht steril

Dass Muttermilch eine Vielzahl von Bakterien enthält, ist eine noch relativ neue Erkenntnis. Lange Zeit galt Muttermilch als steril. In jüngster Zeit wurde jedoch gezeigt, dass Muttermilch Bakterien enthält, die während des Stillens auf das Baby übertragen werden (Martín R et al. 2003; Heikkila MP et al. 2003). Sie enthält neben den wesentlichen Nährstoffen zwischen 10^3 und 10^5 KbE (Koloniebildende Einheiten) Mikroorganismen pro Milliliter, was für den Säugling bei einer durchschnittlichen Trinkmenge von 800 ml ca. 10^5 bis 10^7 KbE täglich bedeutet (Martín R et al. 2005; Martín R et al. 2007; Gueimonde M et al. 2007). Daher ist es nicht überraschend, dass die Darmmikrobiota des Kindes die Mikrobiota der Muttermilch widerspiegelt (Heikkila MP et al. 2003; Martín R et al. 2004).

Inzwischen konnten insgesamt etwa 200 verschiedene Bakterienarten (rund 50 Gattungen) in Muttermilch beschrieben werden. Zu diesen zählen nicht nur Milchsäurebakterien wie Lactobazillen oder Bifidobakterien, sondern auch Streptokokken, Pseudomonaden oder Staphylokokken, die pathogene Keime sind, aber in der Muttermilch offensichtlich keine schädliche Wirkung haben (Martín R et al. 2007; Collado MC et al. 2009; Martín R et al. 2009). Bei den Lactobazillen handelt es sich vorwiegend um *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. lactis* und *L. reuteri* (Martín R et al. 2003 und 2007; Sinkiewicz G et al. 2008). Lactobazillen wurden in Muttermilchproben deutscher und österreichischer Mütter häufiger nachgewiesen als Bifidobakterien. Neben *L. salivarius* (35 %) zählte *L. fermentum* (25 %) zu den am häufigsten vorkommenden Bakterienarten. Einzelne Arten kamen bei den Bifidobakterien deutlich seltener vor: *B. breve* (14 %), *B. lactis* und *B. longum* (jeweils 4 %) (**Abbildung 4**).

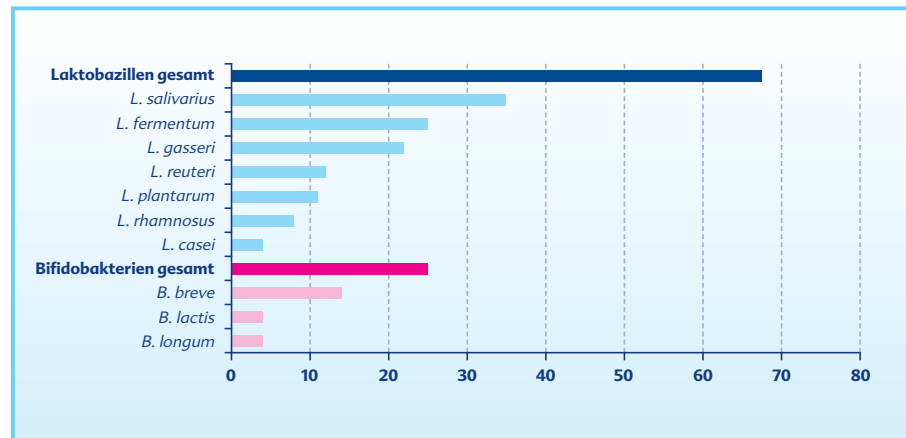


Abb. 4: Häufigkeit (%) von Lactobazillen und Bifidobakterien in 160 Muttermilchproben (Soto A et al. 2014)

Neben der individuellen Bakterienvielfalt in Muttermilch wurden auch große regionale und lokale Unterschiede zwischen der Mikrobiota in Muttermilchproben festgestellt (Sinkiewicz G et al. 2008).

Von allen Bakterien, die in Muttermilch entdeckt wurden, haben Lactobazillen aufgrund ihres probiotischen Potenzials die größte Beachtung. Trotzdem ist zu berücksichtigen, dass nicht alle Lactobazillen als probiotisch betrachtet werden können. Aus 1500 Lactobazillen-Kulturen, die aus Muttermilch gewonnen wurden, isolierte man nach Anwendung eines umfassenden Selektionsprozesses drei Bakterienstämme vom Typ *Lactobacillus* mit probiotischen Eigenschaften: *L. gasseri* CECT5714, *L. salivarius* CECT5713 und *L. fermentum* CECT5716 (Martín R et al. 2003). Diese Bakterien wurden einer großen Anzahl von präklinischen und klinischen Studien unterzogen, die ihre Sicherheit und Effizienz beweisen (Lara-Villoslada F et al. 2007). Der probiotische Stamm *L. fermentum* CECT5716 ist in HiPP Säuglingsnahrungen enthalten und steht im Mittelpunkt der weiteren Diskussion (Kapitel 3).

Für die Zusammensetzung der Muttermilch ist entscheidend, wie die mütterliche Darmmikrobiota zusammengesetzt ist, denn Bakterien können möglicherweise aus dem Darm der Mutter über das Blut-Lymph-System in die Muttermilch übertreten (**Abbildung 5**) (Perez PF et al. 2007; Fernández L et al. 2013; Jost T et al. 2014). Bei diesem sogenannten „entero-mammary pathway“ kommt den dendritischen Zellen eine Schlüsselrolle zu. Sie können die „tight junctions“ zwischen den Epithelzellen öffnen, mit ihren Ausläufern (Dendriten) Bakterien aus dem Darmlumen aufnehmen und anschließend die „tight junctions“ wieder schließen (Rescigno M et al. 2001; Uhlig HH). Danach gelangen die Bakterien über die mesenterialen Lymphknoten und den Blutweg in die Schleimhäute der Brust und somit in die Milch (Martín R et al. 2004). Dieser Prozess der bakteriellen Translokation ist ein physiologischer Vorgang, der während der Schwangerschaft und der Laktation zunimmt (Perez PF et al. 2007). Ab dem letzten Schwangerschaftsdrittel sind Bakterien in den Milchdrüsen nachweisbar. Zum Zeitpunkt der Geburt und kurz danach erreicht die Bakterienkonzentration der Muttermilch ein Maximum und nimmt dann während der Stillzeit langsam und beständig ab. Nach dem Abstillen des Kindes sind keine Bakterien in den Milchdrüsen mehr nachweisbar (Langa S 2006).

Interessant ist auch, dass sich die Mikrobiota während der Stillzeit verändert und auch Unterschiede bestehen zwischen übergewichtigen und normalgewichtigen Müttern (Cabrera-Rubio R et al. 2012).

Weitere Quellen von Bakterien, die sich in der Muttermilch finden, sind vermutlich die mütterliche Haut (Einwanderung über die Milchgänge) sowie auch die Keimflora aus der Mundhöhle des gestillten Kindes (**Abbildung 5**).

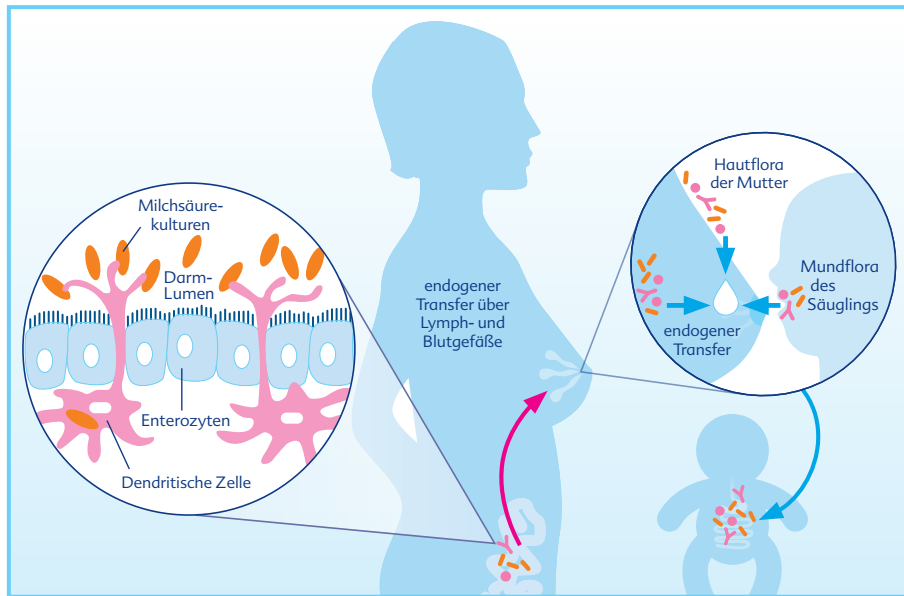


Abb. 5: Potentielle Herkunft der Bakterien in der Muttermilch

(Fernandez L et al. 2013)

1.5.2. Die mütterliche Mikrobiota kann den Darm des Säuglings besiedeln

Als Nächstes stellt sich die Frage, ob die in der Muttermilch vorhandenen Bakterien in der Lage sind, den kindlichen Darm zu besiedeln. Auch dies konnte mittlerweile bestätigt werden. Milchsäurebakterien aus der Muttermilch können in kindlichen Stuhlproben nachgewiesen werden (Martín R et al. 2003; Martín V et al. 2012). Somit können die mütterlichen Bakterien wesentlich dazu beitragen, dass im Darm des Säuglings eine Schutzbarriere ausgebildet und das Immunsystem günstig beeinflusst werden kann. Durch die Ausbildung einer physiologischen Darmmikrobiota wird das kindliche Immunsystem unterstützt. Die in der Muttermilch enthaltenen Bakterien tragen somit vermutlich auch zum sogenannten „Nestschutz“ bei, der den gestillten Säugling vor Infektionen schützt (Howie PW et al. 1990; López-Alarón M et al. 1997; Wright AL et al. 1998). Der protektive Effekt von Muttermilch wird auch durch die in ihr enthaltenen Komponenten (Immunglobuline, immunkompetente Zellen und verschiedene antimikrobielle Verbindungen) begründet (Lara-Villoslada F et al. 2007). Die geringe Infektionsanfälligkeit gestillter Säuglinge steht auch in engem Zusammenhang mit präbiotisch wirksamen Oligosacchariden in der Muttermilch, die selektiv das Wachstum von Darmbakterien stimulieren und einen positiven Effekt im kindlichen Darm ausüben (Kunz C et al. 2000).

1.5.3. Oligosaccharide in Frauenmilch

Die Humanen Milch-Oligosaccharide (HMO) zählen in der Muttermilch neben Milchzucker und Fett zu den Hauptbestandteilen (Rudloff S, Kunz C 2012). Im Unterschied zu Kuhmilch enthält reife Frauenmilch mit 10 bis 20 g/l große Mengen an Milch-Oligosacchariden. Die in Muttermilch vorkommenden Oligosaccharid-Strukturen setzen sich aus fünf Monosacchariden zusammen: Glucose, Galactose, Fucose, N-Acetylglucosamin und Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure). Humane Milch-Oligosaccharide (HMOs) haben eine sehr komplexe Zusammensetzung, bisher konnten mehr als 200 verschiedene Mehrfachzuckerverbindungen charakterisiert werden (Rudloff S, Kunz C 2015).

Zu den wesentlichen Funktionen von HMOs zählt, dass sie bestimmten Bakterien als Nahrungsquelle dienen und somit die mikrobielle Kolonisierung des Darms sowie die Entwicklung des intestinalen Immunsystems beeinflussen. Muttermilch-Oligosaccharide werden auch mit einer Hemmung der Anhaftung von pathogenen Keimen an intestinale Epithelzellen in Verbindung gebracht. Mehr über diese Substanzen erfahren Sie in den Kapiteln 2 und 4.

Für umfassendere Information zum Thema Pro- und Präbiotika in der Muttermilch möchten wir gerne auf das Buch „Prebiotics and Probiotics in Human Milk“ (McGuire M, McGuire M, Bode L 2017, Elsevier Verlag) verweisen.

2. Anforderungen an Pro- und Präbiotika in Säuglingsnahrungen

Wie bereits in Kapitel 1.5 beschrieben wurde, kommt der bakteriellen Ausstattung des Verdauungstraktes eine wichtige Bedeutung zu. Da der Verdauungstrakt des Säuglings zunächst wenig Bakterien aufweist², jedoch während der Geburt und dann später durch die Nahrungsaufnahme bakteriell besiedelt wird, scheint die Zusammensetzung der Muttermilch bzw. der verwendeten Säuglingsnahrung entscheidend für die weitere Entwicklung der Darmmikrobiota zu sein. In der Muttermilch sind sowohl Pro- als auch Präbiotika enthalten. Aufgrund der positiven Aspekte der symbiotisch zusammengesetzten Muttermilch wird mittlerweile Säuglingsnahrung mit Pro- und Präbiotika angereichert, damit auch Kinder, die nicht gestillt werden können, von diesen positiven Effekten nach dem natürlichen Vorbild annäherungsweise profitieren können.

Bei den in Säuglingsmilchnahrungen verwendeten Probiotika handelt es sich vor allem um Lactobazillen und Bifidobakterien. Als präbiotische Substanz kommen häufig Galacto-Oligosaccharide (GOS), Fructo-Oligosaccharide (FOS), saure Oligosaccharide (AOS), Polydextrose (PDX) oder Mischungen daraus zum Einsatz (Braegger C et al. 2011).

Da durch Pro- und Präbiotika ein starker Einfluss auf die Ausbildung der kindlichen Mikrobiota, das Immunsystem und somit auf den ganzen Stoffwechsel ausgeübt wird, gelten besondere Sicherheitsempfehlungen für den Einsatz von Pro- und Präbiotika in der Säuglingsernährung. So fordert die europäische Fachgesellschaft ESPGHAN, dass **Sicherheit und Nutzen** für jedes Prä- bzw. Probiotikum und für jede Kombination von beidem einzeln in wissenschaftlichen Studien erbracht werden. Zudem werden Langzeitdaten gefordert, die zeigen, welchen Einfluss die frühe kindliche Gabe von Probiotika auf die weitere Gesundheit hat (Braegger C et al. 2011).

Darüber hinaus müssen die eingesetzten Pro- bzw. Präbiotika bestimmte technologische Eigenschaften aufweisen, damit sie in qualitativ einwandfreiem Zustand und stabil in der Anwendung produziert werden können.

Diese Forderungen wurden bei der Produktentwicklung einer synbiotischen Säuglingsnahrung mit dem Probiotikum *L. fermentum* CECT5716 und dem Präbiotikum GOS (aus der Lactose gewonnene Galacto-Oligosaccharide) umgesetzt (Kapitel 3 und 4).

² Die frühere Annahme, dass der Darm des Feten steril ist, wurde mittlerweile widerlegt – Bakterien können bereits über die Plazenta den fetalen Darm erreichen.

3. *L. fermentum* CECT5716 – ein einzigartiges Probiotikum

Obwohl die Darmkolonisation bereits während der Schwangerschaft beginnt, ist Muttermilch die wichtigste Quelle an kommensalen Bakterien für das gestillte Kind. Muttermilch ist nicht steril, sondern enthält eine Vielzahl an Bakterien (**Tabelle 1**). Von Bedeutung sind vor allem die Milchsäurebakterien, die einen günstigen Einfluss auf das Darmmilieu ausüben können. Von den über tausend Spezies an Milchsäurebakterien konnte aus Muttermilch unter anderem der Lactobazillenstamm *Lactobacillus fermentum hereditum* CECT5716 mit probiotischen Eigenschaften isoliert werden (Martín R et al. 2003; Martín R et al. 2005). Dieses Milchsäurebakterium wurde von HiPP für die Verwendung in Säuglingsanfangs- und Folgenahrungen ausgewählt. Die Entscheidung fiel auf diesen Bakterienstamm, da er ursprünglich aus Muttermilch isoliert wurde, zu den Erstbesiedlern des Darms gehört und zu den sicheren und effizienten Probiotika zählt.

Tab. 1: Häufige Bakteriengruppen und -gattungen aus Muttermilchproben (modifiziert nach Martín R et al. 2004)

| Bakteriengattung | Hauptspezies | Bakteriengattung | Hauptspezies |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>S. epidermis</i> | <i>Lactobacillus</i> sp. | <i>L. gasseri</i> |
| | <i>S. hominis</i> | | <i>L. rhamnosus</i> |
| | <i>S. capitis</i> | | <i>L. acidophilus</i> |
| | <i>S. aureus</i> | | <i>L. plantarum</i> |
| | <i>L. fermentum</i> | | |
| <i>Streptococcus</i> sp. | <i>S. salivarius</i> | <i>Enterococcus</i> sp. | <i>E. faecium</i> |
| | <i>S. mitis</i> | | <i>E. faecalis</i> |
| | <i>S. parasanguis</i> | | |
| | <i>S. peroris</i> | | |

3.1. Auswahlkriterien für *L. fermentum* CECT5716

Die Auswahl von *L. fermentum* CECT5716 erfolgte sorgfältig. Zu den wichtigsten Bereichen des Auswahlprozesses gehörten Sicherheit, probiotische Eigenschaften sowie technologische Aspekte. **Tabelle 2** zeigt einen kurzen Überblick über die verschiedenen Schritte bei der Auswahl des *L. fermentum* CECT5716.

Tab. 2: Kriterienauswahl für den Einsatz von *L. fermentum* CECT5716

| | |
|------------------------------------|---|
| A. Sicherheitskriterien | <ul style="list-style-type: none"> Biochemische und genetische Taxonomie, hinterlegt in einer internationalen Datenbank Produktion biogener Amine Enzymatische Aktivitäten Ausschluss der Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen |
| B. Funktionelle Kriterien | <ul style="list-style-type: none"> Resistenz gegenüber Verdauungssekreten (Magen-, Gallensäure) Fermentative Kapazitäten Intestinale Kolonisierung Produktion von Metaboliten Produktion antimikrobieller Substanzen Immunparameter |
| C. Technologische Kriterien | <ul style="list-style-type: none"> Wachstum und Stabilität |

3.2. Sicherheitsstudien zu *L. fermentum* CECT5716

L. fermentum CECT5716 wurde in zahlreichen Zellkultur- und Tierstudien untersucht, gefolgt von menschlichen Studien zuerst bei Erwachsenen, später bei Säuglingen. Studienergebnisse zeigen, dass *L. fermentum* CECT5716 ein probiotischer Stamm ist, der nicht nur sicher ist, sondern auch den Magen-Darm-Trakt überlebt (Martín R et al. 2005, Lara-Villoslada F et al. 2009) und einen positiven Einfluss auf das Immunsystem hat (Peran L et al. 2006, Olivares M et al. 2006, Arribas B et al. 2009, Peran L et al. 2007). Studien bei Erwachsenen (Olivares M et al. 2007, Arroyo R et al. 2010) und Kindern (Maldonado J et al. 2008, Maldonado J et al. 2012, Gil-Campos M et al. 2012; Maldonado-Lobón JA et al. 2015) bestätigen die Sicherheit und Wirksamkeit von *L. fermentum* CECT5716.

3.2.1. Sicherheit von *L. fermentum* CECT5716 bei Tieren

Eine Sicherheitsbewertung von *L. fermentum* CECT5716 zeigte, dass die Verabreichung von 10.000-mal höheren Dosen als üblicherweise vom Menschen aufgenommen (bezogen auf das Körpergewicht) bei Mäusen sicher war (Lara-Villoslada F et al. 2009). Die Behandlung von Balb/C-Mäusen mit 10^{10} KbE pro Tag über einen Zeitraum von 28 Tagen zeigte keine negativen Auswirkungen. Körpergewicht, Gewebegewichte einschließlich Leber,

Milz, Thymus, Herz und Nieren sowie biochemische und hämatologische Parameter und Nahrungsaufnahme waren zwischen Studiengruppe und Kontrollgruppe vergleichbar. Zudem wurde keine Bakteriämie oder aufgrund der Behandlung ausgelöste bakterielle Translokation in Leber oder Milz beobachtet. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass der Stamm keine Antibiotikaresistenz gegenüber anderen Bakterien überträgt.

3.2.2. Sicherheit von *L. fermentum* CECT5716 beim Menschen

Was die Sicherheit beim Menschen betrifft, wurde eine Studie mit gesunden **Erwachsenen** abgeschlossen. Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass die tägliche Aufnahme von *L. fermentum* CECT5716 bei einer Dosierung von 10^{10} KbE über einen Zeitraum von 28 Tagen sicher und gut verträglich ist, ohne dass Nebenwirkungen beobachtet werden, die mit der Verabreichung des Probiotikums in Zusammenhang stehen könnten (Olivares M et al. 2007).

Darüber hinaus wurden vier klinische Studien bei **Säuglingen** durchgeführt, die die Sicherheit von *L. fermentum* CECT5716 untersuchten. In den ersten beiden Studien wurde die Sicherheit von *L. fermentum* CECT5716 bei Säuglingen, die älter als sechs Monate waren, untersucht (Maldonado J et al. 2008; Maldonado J et al. 2012). Die dritte und vierte Studie untersuchten die Sicherheit von *L. fermentum* CECT5716 bei Säuglingen ab der Geburt (Gil-Campos M et al. 2012; Maldonado-Lobón JA et al. 2015).

In einer doppelblinden, randomisierten, placebo-kontrollierten Studie wurde die Sicherheit von *L. fermentum* CECT5716 (2×10^8 KbE/Tag) bei Säuglingen im Alter von sechs bis zwölf Monaten ($n = 80$) untersucht. Beide Gruppen erhielten eine Folgenahrung (Kontrollgruppe ohne *L. fermentum*, Studiengruppe mit *L. fermentum*) über einen Zeitraum von drei Monaten. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied im Wachstum zwischen den beiden Gruppen (**Tabelle 3**). Ferner wurden keine Nebenwirkungen in Verbindung mit dem Verzehr der Nahrung berichtet.

Tab. 3: Klinische Parameter von Säuglingen (sechs bis zwölf Monate alt) in Abhängigkeit von der Nahrung zum Zeitpunkt 0 und 3 Monate nach Intervention (Maldonado J et al. 2008)

| | Kontrollgruppe (Folgenahrung ohne <i>L. fermentum</i>) | | Studiengruppe (Folgenahrung mit <i>L. fermentum</i>) | |
|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| | 0 | 3 Monate | 0 | 3 Monate |
| Gewicht (g) | 7579 ± 870 | 9002 ± 1011 | 7101 ± 957 | 8574 ± 1150 |
| Größe (cm) | 65,8 ± 2,3 | 71,1 ± 2,3 | 69,8 ± 3,2 | 69,8 ± 2,3 |
| Kopfumfang (cm) | 43,7 ± 1,3 | 45,8 ± 1,3 | 43,0 ± 1,3 | 45,3 ± 1,3 |

Die weiteren Studien mit der Zielgruppe Säuglinge werden in Kapitel 5 vorgestellt.

3.2.3. Weitere Sicherheitsparameter von *L. fermentum* CECT5716

- Das Genom von *L. fermentum* CECT5716 ist charakterisiert und vollständig entschlüsselt. Die Sequenzierung des Genoms liefert zusätzliche Informationen zur Sicherheit und probiotischen Eigenschaft des Keims (Jiménez E et al. 2010).
- Die EFSA (European Food Safety Association) hat 2007 dem Milchsäurebakterium *L. fermentum* CECT5716 einen sicheren Status verliehen, bezeichnet mit QPS (qualified presumption of safety) (EFSA 2007). Bei der QPS-Bewertung handelt es sich um eine von der EFSA durchgeführte Sicherheitsbewertung, der Mikroorganismen unterzogen werden, wenn sie Lebensmitteln/Futtermitteln zugesetzt werden. Ihre Verwendung darf kein Gesundheitsrisiko darstellen.
- *Lactobacillus fermentum* CECT5716 erhielt im Jahr 2015 den GRAS-Status (Substances Generally Recognized As Safe), Notice No. GRN 000531 (FDA 2015). Bei dieser Bezeichnung handelt es sich um eine Unbedenklichkeitserklärung der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration), die nur verliehen wird, wenn entsprechende Studien zur Sicherheit vorliegen.
- Auch die WHO bescheinigt Lactobacillen und somit auch *L. fermentum* CECT5716 eine sichere Verwendung als Probiotikum (FAO/WHO Expert Consultation 2001).

3.3. Wirksamkeitsstudien zu *L. fermentum* CECT5716

L. fermentum CECT5716 wurde unter der Verwendung umfangreicher biochemischer, molekularer und genetischer Techniken identifiziert und charakterisiert. Diese Verfahren sind wichtige Voraussetzungen dafür, dass eine entsprechende Sicherheitsbewertung durchgeführt werden kann und eine sichere Verwendung für den Menschen möglich ist. Es wurden zahlreiche Untersuchungen zur Sicherheit sowie zu funktionellen und technologischen Eigenschaften durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse zu den Studien, vor allem zu den probiotischen Eigenschaften und zur sicheren Verwendung, finden Sie nachfolgend aufgelistet.

3.3.1. *L. fermentum* CECT5716 ist in der Lage, den menschlichen Darm zu kolonisieren

L. fermentum CECT5716 überlebt im Vergleich zu anderen Lactobazillen zu einem hohen Anteil die Magen-Darm-Passage (74 % Überlebensrate) (**Abbildung 6**). Das Überleben der gastrointestinalen Bedingungen ist eine wesentliche Anforderung an ein Probiotikum.

Bei gesunden Erwachsenen ist *L. fermentum* CECT5716 nach oraler Aufnahme in der Stuhlmikrobiota zu finden. 92 % der Fäkalproben enthielten *L. fermentum* CECT5716, im Vergleich zu nur 12 % in der Kontrollgruppe ohne *L. fermentum* CECT5716 (Olivares M et al. 2007).

Darüber hinaus zeigt *L. fermentum* CECT5716 eine hohe Adhäsionsrate an Darmzellen (Martín R et al. 2005). Infolgedessen kann die Adhäsion pathogener Bakterien an die Darmzellen behindert werden (Severin AL et al. 2004).

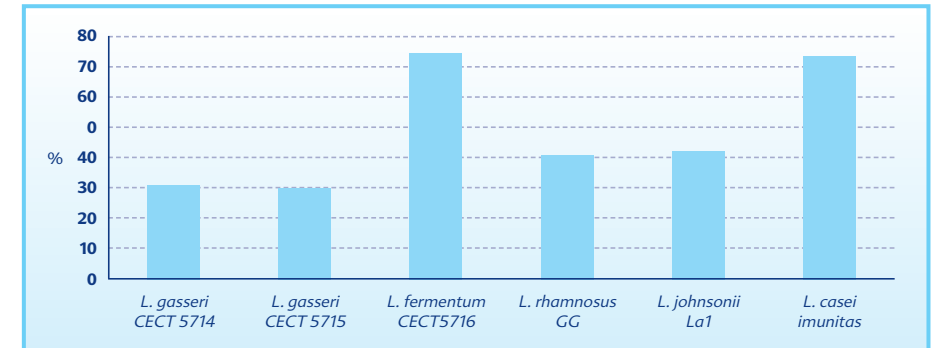


Abb. 6: Überlebensrate (%) der Magen-Darm-Passage verschiedener Lactobazillen (modifiziert nach Martín R et al. 2005)

3.3.2. *L. fermentum* CECT5716 unterstützt die Darmschleimhaut in ihrer Integrität

L. fermentum CECT5716 ist in der Lage, eine Vielzahl von Kohlenhydraten im Darm zu fermentieren und **kurzkettige Fettsäuren (KKFS)** zu produzieren, die eine wichtige Energiequelle für Darmzellen darstellen (Peran L et al. 2006). KKFS erhöhen z. B. die Absorption von Wasser und Salz im Darm, beteiligen sich aktiv am Stoffwechsel der Kolon-Epithelzellen und reduzieren den pH-Wert, wodurch sie das Wachstum gesunder Bakterien unterstützen und das Wachstum pathogener Keime hemmen. Darüber hinaus werden die KKFS Propionsäure und Essigsäuren zu verschiedenen Organen wie Muskeln, Gehirn und Herz transportiert, wo sie als Energiequelle verwendet werden.

L. fermentum CECT5716 induziert die Produktion von **Mucinen** (Glykoproteinen) durch Becherzellen und schützt somit das Darmepithel vor physikalischen, chemischen und bakteriologischen Schäden (Olivares M et al. 2006).

L. fermentum CECT5716 produziert **Glutathion**, ein natürliches Antioxidans, das z. B. den Darm vor oxidativen Schäden schützt (Peran L et al. 2006).

3.3.3. *L. fermentum* CECT5716 schützt vor intestinalen Infektionen

L. fermentum CECT5716 zeigt *in vitro* Schutz gegen Magen-Darm-Infektionen, belegt in zwei experimentellen Modellen mit dem enteropathogenen Stamm *Salmonella choleraesuis*. Die Zugabe von *L. fermentum* CECT5716 in eine *S. choleraesuis* enthaltende Nährlösung führte zu einer signifikanten Abnahme des Pathogenwachstums im Vergleich zu Kontrollmedien.

Bei der Untersuchung der antibakteriellen Wirkung von *L. fermentum* CECT5716 *in vivo* mit einem mit *S. choleraesuis* infizierten Mausmodell überlebten signifikant mehr Tiere (60 %), die *L. fermentum* CECT5716 erhielten, im Vergleich zu Kontrolltieren (10 %). Das deutet darauf hin, dass *L. fermentum* CECT5716 *in vivo* und *in vitro* **antagonistische Effekte** gegen Salmonella-Infektion ausüben kann (Olivares M et al. 2006).

L. fermentum CECT5716 produziert **antimikrobielle Substanzen**, die das Wachstum pathogener Stämme wie *E. coli* 433, *Salmonella choleraesuis* spp., *Listeria Scott A* und *Staphylococcus aureus* hemmen. Ein möglicher Mechanismus ist die Produktion großer Mengen an Milchsäure durch *L. fermentum* CECT5716 und folglich die Absenkung des pH-Wertes im Darm, wodurch das Wachstum von pathogenen Mikroorganismen gestört wird. *L. fermentum* CECT5716 erhöht auch die Membranpermeabilität von gramnegativen Bakterien, wodurch deren Lebensfähigkeit verringert und die Einwirkung von Bakterizid-Verbindungen auf sie erhöht wird (Olivares M et al. 2006).

L. fermentum CECT5716 induziert die **Produktion von Mucinen**, die die erste Barriere des Darmepithels bilden, um Infektionen zu verhindern. Von den verschiedenen Klassen an Mucinen erhöht *L. fermentum* CECT5716 speziell die Genexpression von MUC2 und MUC5B. Somit verbessert *L. fermentum* CECT5716 die Schutzschicht des Darmepithels gegen Infektionen (Olivares M et al. 2006).

L. fermentum CECT5716 **hemmt die Adhäsion von Pathogenen** an die Darmschleimhaut und begünstigt damit die Eliminierung von Pathogenen mit dem Stuhl. Sobald ein pathogener Erreger die Darmmukosa erreicht, ist seine Anhaftung an Komponenten der extrazellulären Matrix des Wirts eine Voraussetzung für die Bakterienbesiedlung und -invasion. Eine derartige Anhaftung an Epithelien bewirkt, dass das Pathogen nicht aus dem Darm eliminiert wird. *L. fermentum* CECT5716 kann sich mit den Darm-Pathogenen verbinden und verhindert dadurch, dass diese die Darmschleimhaut erreichen, sich dort anheften und von den Epithelzellen aufgenommen werden (Olivares M et al. 2006).

3.3.4. *L. fermentum* CECT5716 trägt zu einer Modulation der Immunantwort bei

Es konnte gezeigt werden, dass *L. fermentum* CECT5716 je nach Immunstatus eine stärkende bzw. anti-inflammatorische Wirkung ausüben kann.

L. fermentum CECT5716 stärkt die Immunantwort nach Influenza-Impfung. Nach einer Impfung wurde ein Anstieg der NK-Zellen (erste Barriere gegen Pathogene) und des Antikörpers IgA gezeigt; ein Effekt, der in der Placebogruppe ausblieb (Olivares M et al. 2007).

L. fermentum CECT5716 stärkt die natürliche und erworbene Immunantwort, indem neben einer Aktivierung der NK-Zellen auch ein Effekt auf verschiedene T-Zellen gezeigt werden konnte (Perez-Cano FJ et al. 2010).

3.3.5. *L. fermentum* CECT5716 hat Einfluss bei der Behandlung mütterlicher Mastitis

Zur Behandlung von infektiöser Mastitis scheint die Gabe von *L. fermentum* CECT5716 eine wirksame Alternative zur Verwendung von allgemein vorgeschriebenen Antibiotika während der Laktation zu sein. Frauen mit infektiöser Mastitis hatten unter der Gabe von *L. fermentum* CECT5716 signifikant weniger pathogene Bakterien (Staphylokokken, Streptokokken, Korynebakterien) in ihren Milchproben als unter der Gabe von Antibiotika, sie erholten sich schneller, hatten weniger Schmerzen und eine Wiedererkrankung trat seltener auf (**Abbildung 7**).

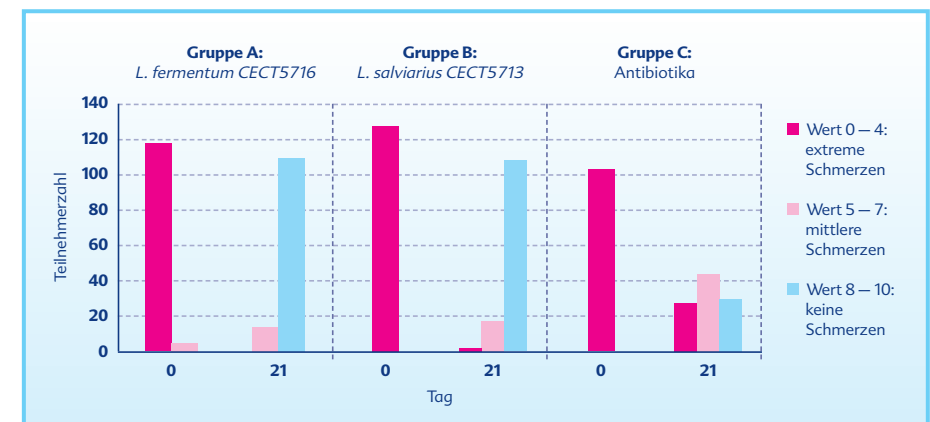


Abb. 7: Schmerzbericht der Frauen mit infektiöser Mastitis in Abhängigkeit von der Behandlung zum Zeitpunkt 0 und 21 Tage nach Intervention (Arroyo R et al. 2010)

4. Galacto-Oligosaccharide – bewährte Präbiotika

Galacto-Oligosaccharide (GOS) zählen zu den Kohlenhydraten, die von den menschlichen Verdauungsenzymen nicht abgebaut werden können. Man bezeichnet sie auch als Präbiotika. Sie gelangen in die tieferen Darmabschnitte, in den Dickdarm, und können dort von den „guten“ Bakterien (Lactobazillen und Bifidobakterien) verstoffwechselt werden.

Humane Milch-Oligosaccharide sind sehr komplex aufgebaut. Aufgrund der Fortschritte auf den Gebieten der Biotechnologie und der chemischen Synthese können heute schon einige wenige konkrete Strukturen *in vivo* untersucht und Säuglingsmilchnahrungen zugesetzt werden. Aktuell sind industriell genutzte Oligosaccharide größtenteils einfacher aufgebaut und unterscheiden sich aufgrund der enthaltenen Grundsubstanz. Fructo-Oligosacchariden (FOS) und Inulin dient Fructose als Grundsubstanz, welche nur in pflanzlichen Lebensmitteln, wie z. B. Chicorée, Lauch, Zwiebeln, Bananen vorkommt. Galacto-Oligosaccharide (GOS) werden aus Milchzucker (Lactose) gewonnen und schon seit über 30 Jahren in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Galactose ist das einzige Monosaccharid, welches derzeit sowohl in humanen als auch in industriellen Oligosacchariden (GOS) zu finden ist (**Tabelle 4**).

Tab. 4: Vorkommen Monosaccharide in Muttermilch

(Kunz C, Rudloff S 2006)

| Monosaccharid | Muttermilch | Präbiotika |
|-----------------------|-------------|------------|
| Glucose | Spuren | + |
| Galactose | + | + |
| N-Acetylglucosamine | + | – |
| Fucose | + | – |
| N-Acetylneuraminsäure | + | – |
| Fructose | – | + |
| Xylose | – | + |
| Arabinose | – | + |
| Andere | – | + |

+ kommt vor / – kommt nicht vor

Bei der Auswahl einer präbiotischen Substanz für die Verwendung in Säuglingsanfangs- und Folgenahrungen von HiPP fiel die Entscheidung auf Galacto-Oligosaccharide, weil diese Substanzen den Milch-Oligosacchariden, die in Muttermilch vorkommen, näher sind als pflanzliche Fructo-Oligosaccharide (FOS), deren Grundstruktur Fructose in Muttermilch nicht vorkommt.

GOS werden enzymatisch aus Lactose synthetisiert. GOS bestehen aus einer Kette von Galactosemonomeren, gewöhnlich mit Glucose am reduzierenden Ende. Die Kettenlänge weist bis zu sieben Molekülbausteine auf.

Die Forderungen der ESPGHAN nach einem wissenschaftlichen Nachweis für die sichere Verwendung sind bei GOS selbstverständlich erfüllt.

Studien mit Säuglingen, die mit GOS angereicherte Säuglingsnahrungen erhielten, zeigen, dass die Nahrungen gut vertragen wurden, die Gabe sicher ist und das Wachstum an Bifidobakterien und Lactobazillen gefördert wird (bifidogener Effekt). Galacto-Oligosaccharide wurden in der Konzentration 0,24 g/100 ml (Ben XM et al. 2004 und 2008), 0,4 g/100 ml (Ashley C et al. 2012, Giovannini M et al. 2014), 0,44 g/100 ml (Sierra C et al. 2015) und 0,5 g/100 ml (Fanaro S et al. 2009, Sierra C et al. 2015) getestet.

Die wesentlichen Ergebnisse zur Sicherheit und Effektivität sind nachfolgend zusammengefasst.

4.1. GOS sind für Säuglinge sicher, gut verträglich und haben präbiotische Effekte

Reif geborene, gesunde Säuglinge wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten entweder mit einer **Säuglingsanfangsnahrung** ohne präbiotische Zusätze (n=52) oder mit einer Säuglingsanfangsnahrung mit GOS (0,24 g/100 ml) (n=69) ernährt (Ben XM et al. 2004). Als Referenzgruppe dienten gestillte Kinder. Nach drei- und sechsmonatiger Intervention zeigte sich ein signifikanter Anstieg an Bifidobakterien und Lactobazillen im Stuhl in der mit GOS supplementierten Gruppe gegenüber der Gruppe, die eine Säuglingsmilchnahrung ohne GOS erhielt. Zwischen der GOS-Gruppe und der Gruppe der gestillten Kinder ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Anstieg an Bifidobakterien war ähnlich dem bei gestillten, reifgeborenen Säuglingen. Darüber hinaus zeigte die GOS-Gruppe einen signifikanten Anstieg an kurzkettigen Fettsäuren (KKFS) sowie einen geringeren pH-Wert im Stuhl als die Kontrollgruppe.

Eine weitere Publikation von Ben XM et al. 2008 unterstützt die Resultate der o.g. Studie (**Abbildung 8**).

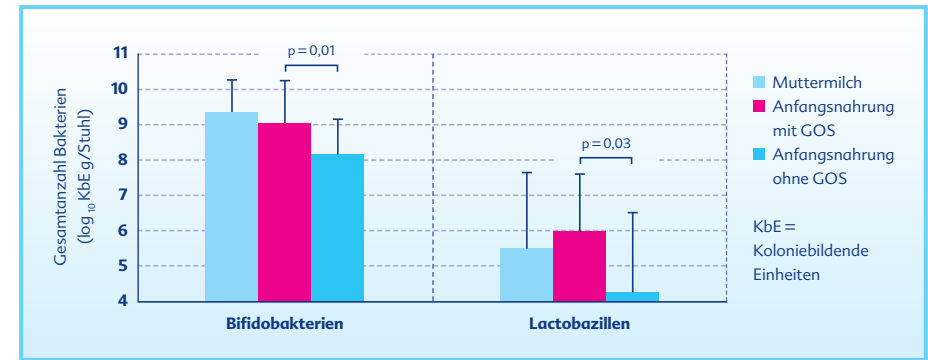


Abb. 8: Anzahl Lactobazillen und Bifidobakterien im Stuhl von Säuglingen nach drei Monaten Fütterung in Abhängigkeit von der Nahrung (Ben XM et al. 2008)

Die Anreicherung einer **Folgenahrung** mit GOS (0,5 g/100 ml) führte zu einem verbesserten Bifiduswachstum während des Interventionszeitraums. Im Rahmen der multizentrischen, randomisierten Studie wurden vier bis sechs Monate alte, gesunde Kinder (n=159) über einen Zeitraum von 18 Wochen entweder mit einer Kontrollnahrung oder der mit GOS angereicherten Folgenahrung ernährt. Während des Interventionszeitraums wurde Beikost eingeführt. Nach sechswöchiger Intervention war in der Verumgruppe die Anzahl der Bifidobakterien im Stuhl signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Der Anstieg blieb bis zum Ende der Studie, also über weitere zwölf Wochen, erhalten. Die Studie zeigt, dass auch unter der Beikosteinführung ein bifidogener Effekt durch die Gabe von GOS erzielt werden kann (**Abbildung 9**).

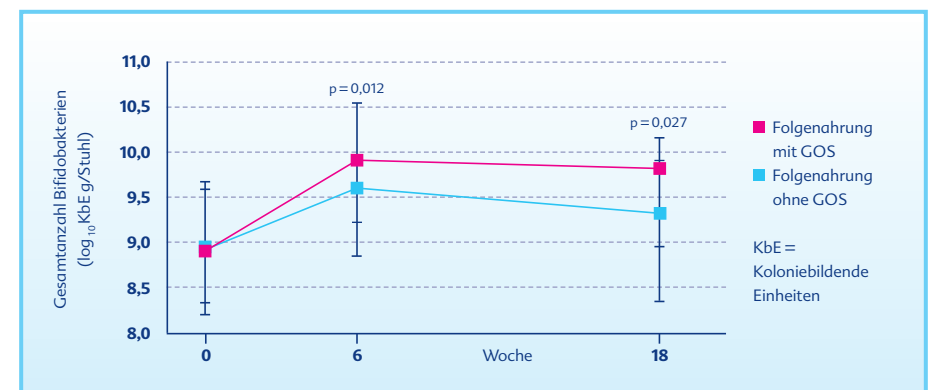


Abb. 9: Anzahl Bifidobakterien im Stuhl von Säuglingen in Abhängigkeit von der Nahrung zum Zeitpunkt 0, 6, 18 Wochen nach Intervention (Fanaro S et al. 2009)

In einer multizentrischen, doppelblinden, placebo-kontrollierten prospektiven Studie wurde der präbiotische Effekt von GOS bei gesunden Säuglingen (n=365) im ersten Lebensjahr bestätigt. Es wurde eine mit GOS angereicherte **Anfangsnahrung** (0,44 g/100 ml) und **Folgenahrung** (0,5 g/100 ml) verwendet. Kinder der Studiengruppe hatten eine erhöhte Anzahl an Bifidobakterien, einen geringeren pH-Wert im Stuhl, eine erhöhte Stuhlfrequenz und eine weichere Stuhlkonsistenz (Sierra C et al. 2015).

Ashley C et al. 2012 untersuchten im Rahmen einer multizentrischen, doppelblinden prospektiven Studie die Sicherheit und Toleranz der präbiotischen Galacto-Oligosaccharide (mit und ohne Polydextrose (PDX)) an 419 Kindern von Geburt an. Die Säuglinge wurden entweder mit einer **Anfangsnahrung** ohne Präbiotika (n = 142), einer Anfangsnahrung mit 0,4 g/100 ml GOS (n = 138) oder einer 1:1-Mischung von 0,4 g/100 ml GOS/PDX (n = 139) ernährt. Anthropometrische Daten wurden nach 14, 30, 60, 90 und 120 Tagen gemessen. Zwischen den Gruppen gab es weder Unterschiede im Wachstum noch bezüglich der Nahrungsaufnahme, Toleranz und dem Auftreten von Nebenwirkungen.

4.2. GOS beeinflussen die Stuhlfrequenz

Die Zugabe von GOS führte zu weicheren Stühlen (Ben XM et al. 2008, Fanaro S et al. 2009, Sierra C et al. 2015, Ashley C et al. 2012) (**Abbildung 10**) sowie erhöhter Stuhlfrequenz (Ben XM et al. 2008, Sierra C et al. 2015). Die Stuhleigenschaften entsprechen somit mehr dem gestillten Säugling.

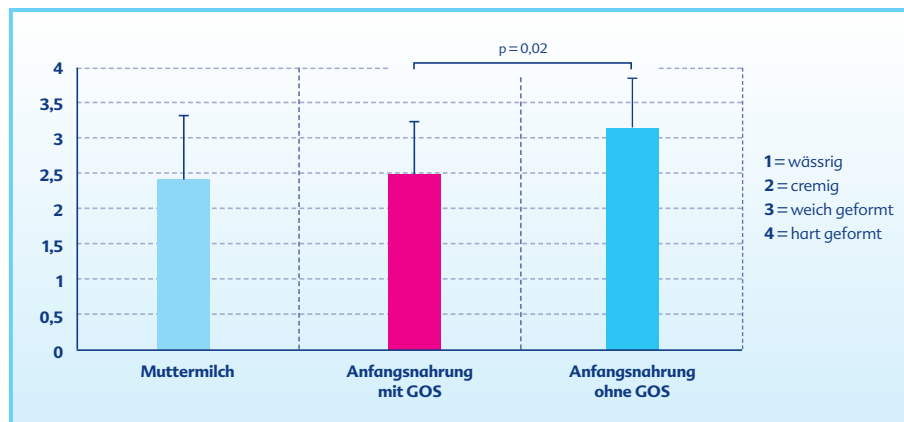


Abb. 10: Stuhlkonsistenz von Säuglingen nach drei Monaten Fütterung in Abhängigkeit von der Nahrung (Ben XM et al. 2008)

4.3. GOS zeigen positiven Effekt bei infantiler Kolik

Eine multizentrische, doppelblinde kontrollierte Studie (Giovannini M et al. 2014) zeigte, dass eine mit GOS angereicherte Anfangsnahrung (0,4 g/100 ml) einen positiven Einfluss auf das Auftreten infantiler Kolik hat. In der Studiengruppe (n=83) wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe (Anfangsnahrung ohne GOS) (n=80) durch die Förderung des Wachstums an Bifidobakterien sowie Lactobazillen und gleichzeitig geringerer Anzahl an Clostridien im Stuhl das Auftreten infantiler Kolik signifikant reduziert. Die durch das Clostridium-Wachstum induzierte Gasproduktion scheint somit mit Säuglingskoliken im Zusammenhang zu stehen.

4.4. Weitere Sicherheitsaspekte von GOS

Die von HiPP verwendete GOS-Mischung erhielt im Jahr 2007 den GRAS-Status (Substances Generally Recognized As Safe), Notice No. GRN 000236 (FDA 2008). Bei dieser Bezeichnung handelt es sich um eine Unbedenklichkeitserklärung der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration), die nur verliehen wird, wenn entsprechende Studien zur Sicherheit vorliegen.

5. Studien zu Sicherheit und Nutzen der Kombination von *L. fermentum* CECT5716 und GOS bei Säuglingen

Die europäische Fachgesellschaft ESPGHAN fordert, dass Sicherheit und Nutzen für jedes Präbiotikum und Probiotikum sowie für jede Kombination einzeln in wissenschaftlichen Studien belegt werden. Zudem werden Langzeitdaten gefordert, die zeigen, welchen Einfluss die frühe Gabe von Probiotika auf die weitere Gesundheit hat (Braegger C et al. 2011).

Diese Forderung wurde für die Kombination aus dem Präbiotikum Galacto-Oligosaccharide (GOS) und dem Probiotikum *L. fermentum* CECT5716 in klinischen Studien – sowohl für Anfangs- als auch für Folgenahrungen – erfolgreich erfüllt (**Tabelle 5**).

Tab. 5: Übersicht klinischer Studien zum Einsatz von Galacto-Oligosacchariden (GOS) und *L. fermentum* CECT5716 bei Säuglingen

| GOLF* 1: Sicherheit und Nutzen bei Säuglingen von 6 bis 12 Monaten | |
|--|--|
| Design | doppelblind, randomisiert, placebo-kontrolliert |
| Teilnehmerzahl | 188 Säuglinge im Alter von 6 Monaten |
| Interventionszeitraum | 6 Monate |
| Kontrollgruppe | Folgenahrung mit GOS (0,4 g/100 ml) |
| Studiengruppe | Folgenahrung mit GOS (0,4 g/100 ml) und <i>L. fermentum</i> (2×10^8 Kbe/Tag) |
| primärer Zielparameter | Inzidenz von Infektionen |
| sekundäre Zielparameter | Wachstum und Entwicklung, Fieber, Antibiotikagabe, Stuhlparameter |

(Maldonado J et al. 2012)

*GOLF = Abkürzung für die Kombination von GOS und *L. fermentum*

GOLF* 2: Sicherheit und Nutzen bei Säuglingen zwischen Geburt und 6 Monaten

| | |
|--------------------------------|---|
| Design | doppelblind, randomisiert, placebo-kontrolliert |
| Teilnehmerzahl | 121 Säuglinge zwischen 21 Tagen und Ende 1. Lebensmonat |
| Interventionszeitraum | 6 Monate |
| Kontrollgruppe | Anfangsnahrung mit GOS (0,3 g/100 ml) |
| Studiengruppe | Anfangsnahrung mit GOS (0,3 g/100 ml) und <i>L. fermentum</i> (10 ⁷ KbE/g) |
| primärer Zielparameter | durchschnittliche Gewichtszunahme von Studienbeginn bis Ende 4. Lebensmonat |
| sekundäre Zielparameter | Größe/Kopfumfang, Stuhlparameter, Akzeptanz und Verträglichkeit |

(Gil-Campos M et al. 2012)

GOLF* 2 Follow-up: Langzeitsicherheit von Anfangsnahrungen

| | |
|--|---|
| Teilnehmerzahl | 91 Kinder |
| Alter der Kinder Finalmessung | 3 Jahre |
| Datenerhebung | 0,5, 1, 2, 3 Lebensjahre |
| Zielparameter | <p>Primär: Wachstum anhand von Gewicht, Länge und Kopfumfang im Alter von 3 Jahren</p> <p>Sekundär: Infektionshäufigkeit, Allergien und nicht-infektiöse Erkrankungen, Krankenhausaufenthalte, chirurgische Eingriffe, Stuhlparameter (Mikrobiota, KKFS, IgA), Verdauung (Stuhlgang, Blähungen, Bauchschmerzen)</p> |

(Maldonado-Lobón JA et al. 2015)

*GOLF = Abkürzung für die Kombination von GOS und *L. fermentum*

5.1. Die Kombination aus *L. fermentum* CECT5716 und GOS ist sicher

Die beiden doppelblinden, randomisierten placebo-kontrollierten Studien für Anfangs- und Folgenahrungen zeigen, dass Wachstum und Entwicklung der Säuglinge im Normalbereich waren.

Am Ende der **GOLF 1 Studie (Folgenahrung)** gab es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede bei den Wachstumsparametern Körpergewicht, Körpergröße und Kopfumfang (Maldonado J et al. 2012) (**Abbildung 11**).

Auch in der **GOLF 2 Studie (Anfangsnahrung)** wurden in Bezug auf das Gewicht und den Kopfumfang keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Bezüglich Länge gab es im Alter von vier Monaten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Am Studienende (im Alter von sechs Monaten) waren die Kinder der Studiengruppe jedoch signifikant größer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Längenzuwachs (cm/Tag) der Kinder war allerdings gleichwertig und es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Gil-Campos M et al. 2012) (**Abbildung 11**).

Die **GOLF 2 Follow-up Studie (Langzeitsicherheit von Anfangsnahrung)** zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Studiengruppe. Im Alter von drei Jahren waren die Mittelwerte von Gewicht, Größe und Kopfumfang zwischen den Gruppen ähnlich (**Abbildung 11**). Keine Unterschiede wurden auch bei der Inzidenz von Infektionen, nicht infektiösen Erkrankungen sowie intestinalen Beschwerden festgestellt. Auch die im Stuhl gefundenen Darmbakterien waren zwischen den Gruppen vergleichbar. Das Follow-up der klinischen Studie mit Anfangsnahrung bestätigt somit die Langzeitsicherheit des frühen Einsatzes von *L. fermentum* CECT5716 (Maldonado-Lobón JA et al. 2015).

5.2. Die Kombination aus *L. fermentum* CECT5716 und GOS ist gut verträglich

GOLF 2 Studie (Anfangsnahrung): Verträglichkeit und Compliance (Verwendung der Nahrung wie im Studienprotokoll vorgesehen) waren gut. In beiden Gruppen waren die nahrungsbedingten Verhaltensmuster wie Stuhlfarbe, -frequenz, -konsistenz, Flatulenz, Aufstoßen, Schlafverhalten und Stimmung vergleichbar (Gil-Campos M et al. 2012).

GOLF 1 Studie (Folgenahrung): Verträglichkeit und Compliance waren gut. Es wurden keine unerwünschten Eigenschaften (wie z. B. Ausspucken der Nahrung) berichtet. Bei der täglichen Trinkmenge gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Maldonado J et al. 2012).

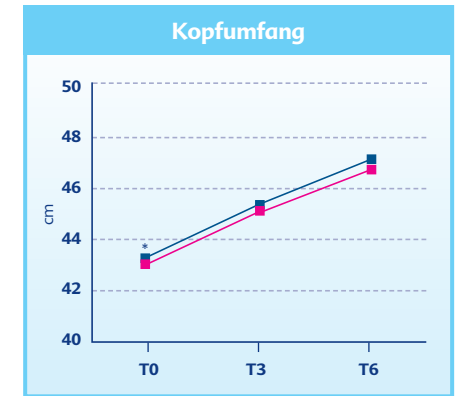
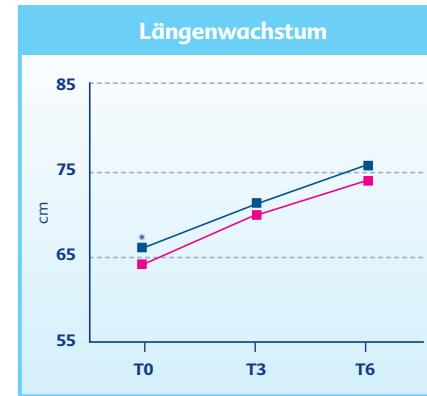
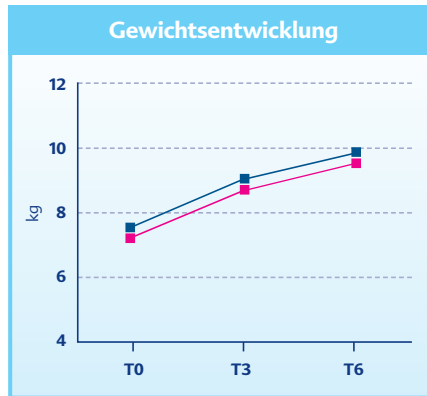
Sicherheit Folgenahrung (GOLF 1)

(Maldonado J et al. 2012)

- Kontrollgruppe: nur Präbiotika (GOS)
- Studiengruppe: Präbiotika + Probiotika (GOS + *L. fermentum*)

T0: Studienbeginn
T3: nach 3 Monaten
T6: nach 6 Monaten

*p<0,05



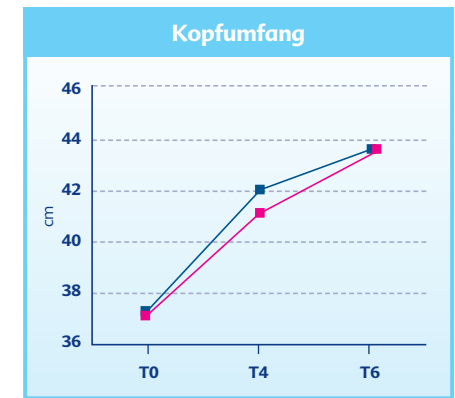
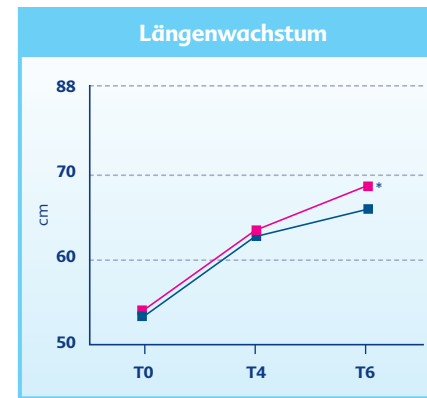
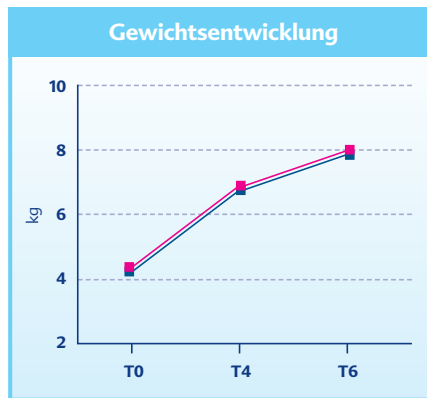
Sicherheit Anfangsnahrung (GOLF 2)

(Gil-Campos M et al. 2012)

- Kontrollgruppe: nur Präbiotika (GOS)
- Studiengruppe: Präbiotika + Probiotika (GOS + *L. fermentum*)

T0: Studienbeginn
T4: nach 4 Monaten
T6: nach 6 Monaten

*p<0,05



Langzeitsicherheit Anfangsnahrung (GOLF 2 Follow-up)

(Maldonado-Lobón JA et al. 2015)

- Kontrollgruppe: nur Präbiotika (GOS)
- Studiengruppe: Präbiotika + Probiotika (GOS + *L. fermentum*)

*p<0,05

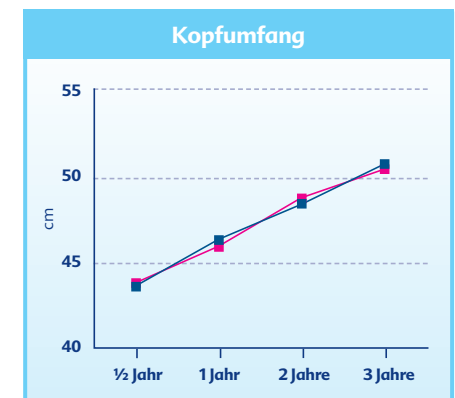
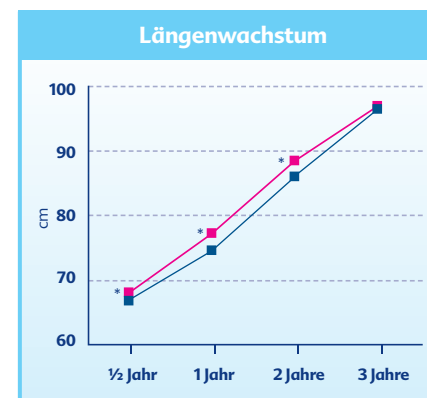
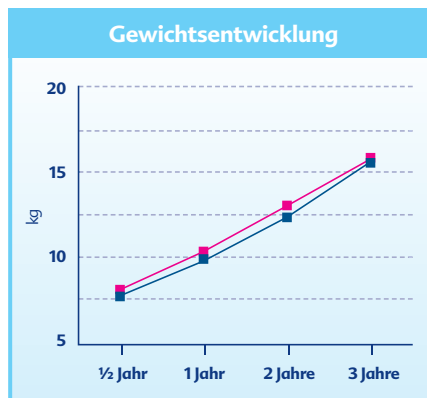


Abb. 11: Anthropometrische Messwerte Körpergewicht, Körpergröße, Kopfumfang in Abhängigkeit von der Nahrung

(Werte sind Mittelwerte)

5.3. Die Kombination aus *L. fermentum* CECT5716 und GOS verändert die Mikrobiota

Eine Analyse der Stuhlproben am Studienende zeigte, dass sowohl bei der Studie mit der Anfangsnahrung (GOLF 2 Studie) als auch mit der Folgenahrung (GOLF 1 Studie) ein signifikanter Anstieg der Lactobazillen und Bifidobakterien erfolgte. Im Stuhl der Säuglinge, die die Folgenahrung bekamen, konnte ein 78-prozentiger Anstieg der Lactobazillen sowie ein 70-prozentiger Anstieg der Bifidobakterien gemessen werden.

Diese Veränderungen (Vermehrung der positiven Bakterien), bedingt durch die Kombination aus Pro- und Präbiotikum, können möglicherweise das verringerte Auftreten gastro-intestinaler Infektionen erklären (Gil-Campos M et al. 2012; Maldonado J et al. 2012).

5.4. Die Kombination aus *L. fermentum* CECT5716 und GOS führt zu einer verringerten Infektionshäufigkeit

GOLF 2 Studie (Anfangsnahrung): Während des Studienzeitraums von sechs Monaten verringerte sich das Auftreten von Durchfallerkrankungen signifikant um 71 % (Abbildung 12).

GOLF 1 Studie (Folgenahrung): Während des Studienzeitraums von sechs Monaten verringerte sich die Infektionshäufigkeit sowohl von Atemwegsinfektionen als auch von Durchfallerkrankungen signifikant um 26 % bzw. 46 % (Abbildung 13). Betrachtet man alle auftretenden Infektionen, konnte in der Studiengruppe eine verringerte Infektionshäufigkeit von 30 % gemessen werden.

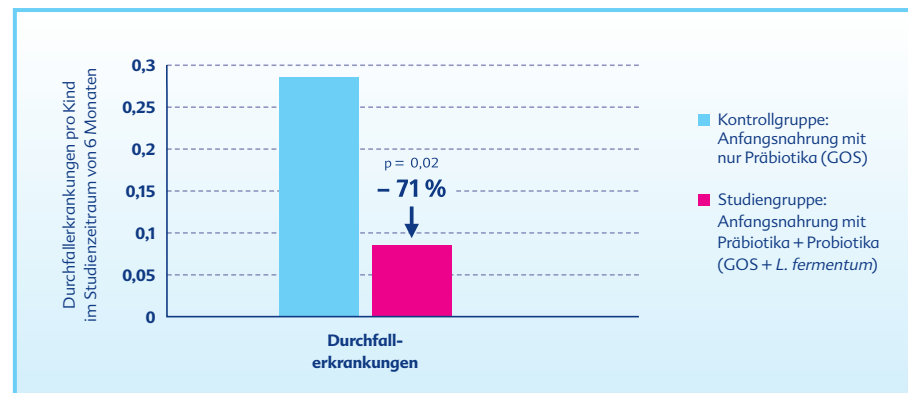


Abb. 12: Infektionshäufigkeit in Abhängigkeit der verwendeten Anfangsnahrung (Gil-Campos M et al. 2012)

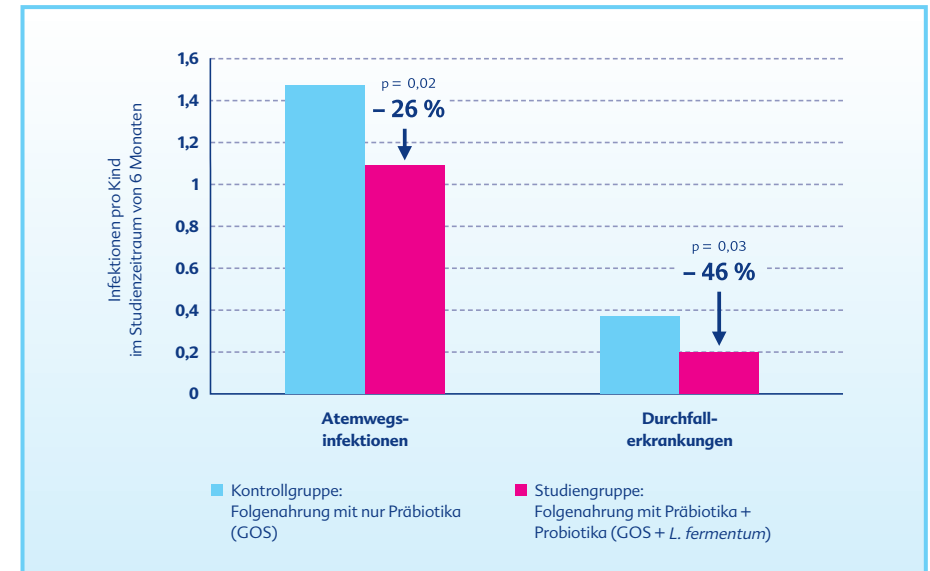


Abb. 13: Infektionshäufigkeit in Abhängigkeit der verwendeten Folgenahrung (Maldonado J et al. 2012)

6. Zusammenfassung und Fazit

Der Darm und insbesondere die intestinale Mikrobiota sind eine wichtige Voraussetzung für ein funktionierendes Immunsystem. Aus diesem Grund ist die Ausbildung und Stabilisierung einer ausgewogenen intestinalen mikrobiellen Besiedlung für die menschliche Gesundheit von entscheidender Bedeutung. Die Ausbildung startet bereits während der fetalen Entwicklung im Mutterleib und erfährt dann eine besondere Prägung in den ersten Lebensmonaten. So spielen die Art der Geburt, die Umgebung, Erkrankungen und deren Behandlung eine wichtige Rolle.

Natürlich kommt auch der Ernährung und somit der Zusammensetzung der Muttermilch bzw. der verwendeten Säuglingsnahrung eine immense Bedeutung zu. Denn je nach Zusammensetzung der Nahrung gelangen in ihr enthaltene Stoffe in die tieferen Darmabschnitte und können die dort vorhandenen Mikroorganismen in Qualität und Quantität beeinflussen. Eine Beeinflussung findet hauptsächlich durch exogen aufgenommene Bakterien sowie durch spezielle Substanzen statt, die als Energiequelle für die Bakterien dienen und diese somit mehr oder weniger stark zum Wachstum anregen.

Muttermilch fördert aufgrund ihrer Zusammensetzung auf ideale Weise die Ausbildung einer positiven Darmmikrobiota beim Säugling. Für die Ausbildung der „mikrobiellen Grundausstattung“ sind zwei Bausteine von wesentlicher Bedeutung: die in Muttermilch enthaltenen Bakterien sowie spezielle Kohlenhydrate, die Humanen Milch-Oligosaccharide (HMOs). Man spricht in diesem Zusammenhang von Pro- und Präbiotika.

Bei den enthaltenen Bakterien sind vor allem die Milchsäurebakterien von Bedeutung, die einen günstigen Einfluss auf das Darmmilieu ausüben können. Von den über tausend Kolonien an Milchsäurebakterien konnte aus Muttermilch unter anderem der Lactobazillenstamm *Lactobacillus fermentum* CECT5716 mit probiotischen Eigenschaften isoliert werden.

Der Schwerpunkt des vorliegenden Dossiers liegt auf der Beschreibung der Eigenschaften sowie der sicheren und effizienten Verwendung von *L. fermentum* CECT5716, einem Bakterium, das zu den Erstbesiedlern des Darmes gehört.

L. fermentum CECT5716 wurde von der EFSA für den Einsatz in Lebensmitteln und Futtermitteln als sicher eingestuft (QPS, qualified presumption of safety) und es konnten folgende Eigenschaften wissenschaftlich nachgewiesen werden:

- ***L. fermentum* CECT5716 überlebt zu einem hohen Anteil die Magen-Darm-Passage und besitzt eine hohe Adhäsionsrate an Darmzellen;**
- **unterstützt die Darmschleimhaut in ihrer Integrität;**
- **schützt vor intestinalen Infektionen;**
- **trägt zu einer Modulation des Immunsystems bei;**
- **beeinflusst die mütterliche Mastitis;**
- **ist sicher und effizient für Säuglinge;**
- **weist ein gut charakterisiertes und vollständig entschlüsseltes Genom auf.**

Neben den probiotischen Milchsäurebakterien ist als zweiter wichtiger Baustein für die Ausprägung der intestinalen Mikrobiota die Verfügbarkeit präbiotischer Substanzen von Bedeutung. Ausgehend von den in der Muttermilch vorkommenden Humanen Milch-Oligosacchariden (HMOs) sind die Galacto-Oligosaccharide (GOS) für die Verwendung in Säuglingsanfangs- und Folgenahrungen gut geeignet. Denn sie werden aus Milchzucker (Lactose) gewonnen und schon seit über 30 Jahren bei der Herstellung von Lebensmitteln verwendet. Sie kommen den in der Muttermilch enthaltenen Oligosacchariden näher, da der Grundbaustein Galactose auch in Muttermilch zu finden ist. Der Grundbaustein Fructose für pflanzliche Fructo-Oligosaccharide (FOS) ist hingegen nicht in Muttermilch enthalten (Kunz C, Rudloff S 2006). GOS sind für den Einsatz in Lebensmitteln zugelassen (GRAS-Status der FDA) und es konnten folgende Eigenschaften wissenschaftlich nachgewiesen werden:

- **günstige Beeinflussung von Mikrobiota und Stuhlgewohnheiten**
- **präbiotischer Effekt**
- **gute Verträglichkeit und sichere Verwendung für Säuglinge**

Anhand von zwei randomisierten, kontrollierten klinischen Studien konnte für die Kombination aus GOS und *L. fermentum* CECT5716 sowohl in Folge- als auch in Anfangsnahrung eine sichere und gut verträgliche Anwendung belegt werden. Die Langzeitsicherheit der frühen Gabe von *L. fermentum* CECT5716 wurde in einem Drei-Jahres-Follow-up der klinischen Studie mit Anfangsnahrung bestätigt.

Darüber hinaus kam es zu einer positiven Veränderung der Mikrobiota (78-prozentiger Anstieg der Lactobazillen, 70-prozentiger Anstieg der Bifidobakterien) und zu signifikanten Verringerungen von Infektionshäufigkeiten. So kam es bei der Studie mit Anfangsnahrung zu einer Verringerung von Durchfallerkrankungen um 71 % und bei der Studie mit Folgenahrung zu einer Verringerung von Atemwegsinfektionen um 26 % bzw. von Durchfallerkrankungen um 46 %.

In Übereinstimmung mit der Forderung der europäischen Fachgesellschaft ESPGHAN für den Einsatz von Pro- und Präbiotika in Säuglingsnahrungen wurden Sicherheit und Nutzen von *L. fermentum* CECT5716 und GOS bei Säuglingen in drei Studien nachgewiesen (Maldonado J et al. 2012; Gil-Campos M et al. 2012; Maldonado-Lobón JA et al 2015). Die Sicherheit der Einzelsubstanzen wurde durch die EFSA bzw. FDA bestätigt, indem *L. fermentum* CECT5716 der QPS-Status sowie der GRAS-Status und GOS der GRAS-Status zugewiesen wurden.

7. Auswahl an Abstracts

7.1. *L. fermentum* CECT5716

In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk.

Immunobiology. 2010 Dec;215(12):996-1004.

Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P.

Commensal bacteria, including some species of lactobacilli commonly present in human breast milk, appear to colonize the neonatal gut and contribute to protection against infant infections, suggesting that lactobacilli could potentially modulate immunity. In this study, we evaluated the potential of two *Lactobacillus* strains isolated from human milk to modulate the activation and cytokine profile of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) subsets in vitro. Moreover, these effects were compared to the same probiotic species of non-milk origin. *Lactobacillus salivarius* CECT5713 and *Lactobacillus fermentum* CECT5716 at 10^5 , 10^6 and 10^7 bacteria/mL were co-cultured with PBMC (10^6 /mL) from 8 healthy donors for 24 h. Activation status (CD69 and CD25 expressions) of natural killer (NK) cells (CD56+), total T cells (CD3+), cytotoxic T cells (CD8+) and CD4+ T cells was determined by flow cytometry. Regulatory T cells (Treg) were also quantified by intracellular Foxp3 evaluation. Regarding innate immunity, NK cells were activated by addition of both *Lactobacillus* strains, and in particular, the CD8+ NK subset was preferentially induced to highly express CD69 (~90%, $p < 0.05$). With respect to acquired immunity, approximately 9% of CD8+ T cells became activated after co-cultivation with *L. fermentum* or *L. salivarius*. Although CD4+ T cells demonstrated a weaker response, there was a preferential activation of Treg cells (CD4+CD25+Foxp3+) after exposure to both milk probiotic bacteria ($p < 0.05$). Both strains significantly induced the production of a number of cytokines and chemokines, including TNF α , IL-1 β , IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , and GM-CSF, but some strain-specific effects were apparent. This work demonstrates that *L. salivarius* CECT5713 and *L. fermentum* CECT5716 enhanced both natural and acquired immune responses, as evidenced by the activation of NK and T cell subsets and the expansion of Treg cells, as well as the induction of a broad array of cytokines.

Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk.

J Bacteriol. 2010 Sep;192(18):4800.

Jiménez E, Langa S, Martín V, Arroyo R, Martín R, Fernández L, Rodríguez JM.

Lactobacillus fermentum is a heterofermentative lactic acid bacterium and is frequently isolated from mucosal surfaces of healthy humans. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is a well-characterized probiotic strain isolated from human milk and, at present, is used in commercial infant formulas. Here, we report the complete and annotated genome sequence of this strain.

Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk.

Clin Infect Dis. 2010 Jun 15;50(12):1551-8.

Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM.

Background: Mastitis is a common infectious disease during lactation, and the main etiological agents are staphylococci, streptococci, and/or corynebacteria. The efficacy of oral administration of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 or *Lactobacillus salivarius* CECT5713, two lactobacilli strains isolated from breast milk, to treat lactational mastitis was evaluated and was compared with the efficacy of antibiotic therapy.

Methods: In this study, 352 women with infectious mastitis were randomly assigned to 3 groups. Women in groups A (n = 124) and B (n = 127) ingested daily 9 log(10) colony-forming units (CFU) of *L. fermentum* CECT5716 or *L. salivarius* CECT5713, respectively, for 3 weeks, whereas those in group C (n = 101) received the antibiotic therapy prescribed in their respective primary care centers. Results. On day 0, the mean bacterial counts in milk samples of the 3 groups were similar (4.35-4.47 log(10) CFU/mL), and lactobacilli could not be detected. On day 21, the mean bacterial counts in the probiotic groups (2.61 and 2.33 log(10) CFU/mL) were lower than that of the control group (3.28 log(10) CFU/mL). *L. fermentum* CECT5716 and *L. salivarius* CECT5713 were isolated from the milk samples of women in the probiotic groups A and B, respectively. Women assigned to the probiotic groups improved more and had lower recurrence of mastitis than those assigned to the antibiotic group.

Conclusions: The use of *L. fermentum* CECT5716 or *L. salivarius* CECT5713 appears to be an efficient alternative to the use of commonly prescribed antibiotics for the treatment of infectious mastitis during lactation.

Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk.

J Dairy Res. 2009 May;76(2):216-21.

Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M.

Lactobacillus fermentum CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk, was characterized in a previous study. The objective of this study was to evaluate its sensitivity to antibiotics and its potential toxicity and translocation ability after oral administration to mice. For this purpose, 40 Balb/C mice were divided in two groups (n=20 per group). One group was treated orally with 10(10) colony forming units (cfu)/mouse/day of *Lb. fermentum* CECT5716 during 28 d. The other group only received the excipient and was used as control. Food intake, body weight, bacterial translocation and different biochemical and haematological parameters were analysed. Oral administration of *Lb. fermentum* CECT5716 to mice had no adverse effects on mice. There were no significant differences in body weight or food intake between control and probiotic-treated mice. No bacteraemia was observed and there was no treatment-associated bacterial translocation to liver or spleen. Stress oxidative markers were not different in control and probiotic-treated mice. These results suggest that the strain *Lb. fermentum* CECT5716 is non-pathogenic for mice even in doses 10,000 times higher (expressed per kg of body weight) than those normally consumed by humans.

Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice.

Br J Nutr. 2009 Jan;101(1):51-8.

Arribas B, Rodríguez-Cabezas ME, Comalada M, Bailón E, Camuesco D, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J.

The preventative effects of the probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 were evaluated in the lipopolysaccharide (LPS) model of septic shock in mice. The probiotic was administered suspended in drinking water at the final concentration of 108 colony-forming units/ml for 2 weeks before the induction of an endotoxic shock by an

intra-peritoneal injection of LPS (400 microg/200 microl per mouse). Blood and different organs were collected after 24 h to evaluate the severity of the endotoxic shock and the preventative effects of the probiotic. *L. fermentum* reduced TNF- α levels in blood, which promotes the major alterations observed during septic shock, as well as the infiltration of activated neutrophils into the lungs. Furthermore, free radical overproduction and oxidative stress were associated with a significant decrease in hepatic glutathione levels in septic mice, and with an excessive NO production attributed to the induction of the inducible isoform of NO synthase (iNOS). In fact, hepatic glutathione levels were significantly increased in the group of mice receiving the probiotic, and the increased iNOS expression both in the colon and lungs was down-regulated in those mice treated with *L. fermentum*. Finally, pre-treatment with *L. fermentum* may also exert its protective action modulating the expression of different cytokines in splenocyte-derived T cells such as IL-2, IL-5, IL-6 or IL-10. In conclusion, pre-treatment with *L. fermentum* may exert its protective action against LPS-induced organ damage in mice by a combination of several actions including its antioxidant properties and by reduction of the synthesis of the pro-inflammatory TNF- α and IL-6.

Oral tolerance studies of the human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716.

WCPGHAN 3-World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. p 163-167. Editors Fagundes-Neto U and Uauay R. Medimond International Proceedings 2008.

Maldonado J, Narbona E, Sempere L, Boza J, Olivares M, Lara-Villoslada F.

It has been suggested that human milk probiotics could be involved in the beneficial effects observed in breast-fed children. Thus, there is an increasing interest in the addition of probiotics to infant formula in order to mimic these functional effects. The objective of the present work is to evaluate the safety of the human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716. The administration of this strain to Balb/c mice in a dose 10000 times higher than that normally consumed by humans did not cause any adverse effect and there was no translocation of the strain from gut to other tissues. In a clinical trial in adult volunteers (22-35y), *L. fermentum* (10^{10} cfu/day) was well tolerated and no deleterious effects were reported. Finally an infant formula containing *L. fermentum* (2×10^8 cfu/day) was well tolerated by 6 months old children. Thus, it can be concluded that *L. fermentum* is safe for human consumption.

Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination.

Nutrition. 2007 Mar;23(3):254-60.

Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, Rodríguez JM, Xaus J.

Objective: We studied the adjuvant capability of oral consumption of the breast-milk-isolated strain *Lactobacillus fermentum* (CECT5716) for an anti-influenza vaccine.

Methods: A randomized, double-blinded, placebo-controlled human clinical trial including 50 volunteers (31 male and 19 female) was performed to address the immunologic effects of an intramuscular anti-influenza vaccine in adults (33.0 +/- 7.7 y old). Fifty percent of volunteers received an oral daily dose of methylcellulose (placebo) or probiotic bacteria (1×10^{10} colony-forming units/d) 2 wk before vaccination and 2 wk after vaccination.

Results: Two weeks after vaccination there was an increase in the proportion of natural killer cells in the probiotic group but not in the placebo group. The vaccination induced an increase in T-helper type 1 cytokine concentrations and in T-helper and T-cytotoxic proportions in both groups; however, the probiotic group showed a significant higher induction in some of these parameters. Regarding the humoral effects, induction of antibody response in the placebo group could not be detected. In the case of the probiotic group, a significant increase in antigen specific immunoglobulin A was detected. Although an increase in total immunoglobulin M was observed, changes in anti-influenza antigen specific immunoglobulin M were not observed. The incidence of an influenza-like illness during 5 mo after vaccination (October to February) was lower in the group consuming the probiotic bacteria.

Conclusion: Oral administration of the strain *L. fermentum* CECT5716 potentiates the immunologic response of an anti-influenza vaccine and may provide enhanced systemic protection from infection by increasing the T-helper type 1 response and virus-neutralizing antibodies.

A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis.

Br J Nutr. 2007 Jan;97(1):96-103.

Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailón E, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J.

The intestinal anti-inflammatory effects of two probiotics isolated from breast milk, *Lactobacillus reuteri* and *L. fermentum*, were evaluated and compared in the trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model of rat colitis. Colitis was induced in rats by intracolonic administration of 10 mg TNBS dissolved in 50% ethanol (0.25 ml). Either *L. reuteri* or *L. fermentum* was daily administered orally (5×10^8 colony-forming units suspended in 0.5 ml skimmed milk) to each group of rats (n 10) for 3 weeks, starting 2 weeks before colitis induction. Colonic damage was evaluated histologically and biochemically, and the colonic luminal contents were used for bacterial studies and for SCFA production. Both probiotics showed intestinal anti-inflammatory effects in this model of experimental colitis, as evidenced histologically and by a significant reduction of colonic myeloperoxidase activity ($P < 0.05$). *L. fermentum* significantly counteracted the colonic glutathione depletion induced by the inflammatory process. In addition, both probiotics lowered colonic TNF α levels ($P < 0.01$) and inducible NO synthase expression when compared with non-treated rats; however, the decrease in colonic cyclo-oxygenase-2 expression was only achieved with *L. fermentum* administration. Finally, the two probiotics induced the growth of *Lactobacilli* species in comparison with control colitic rats, but the production of SCFA in colonic contents was only increased when *L. fermentum* was given. In conclusion, *L. fermentum* can exert beneficial immunomodulatory properties in inflammatory bowel disease, being more effective than *L. reuteri*, a probiotic with reputed efficacy in promoting beneficial effects on human health.

***Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis.**

Int J Colorectal Dis. 2006 Dec;21(8):737-46.

Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J.

Background and aims: Inflammatory bowel disease is associated with intestinal oxidative stress. In the present study we test the preventative effect of *Lactobacillus fermentum*, a

probiotic that produces per se glutathione, in the trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model of rat colitis.

Methods: Colitis was induced in rats by intracolonic administration of 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol. *L. fermentum* was administered orally (5×10^8 CFU suspended in 0.5 ml of skim milk) to a group of rats for 3 weeks, starting 2 weeks before colitis induction. Colonic damage was evaluated both histologically and biochemically, and the colonic luminal contents were used for bacterial studies as well as for short chain fatty acid (SCFA) production.

Results: *L. fermentum* treatment resulted in an amelioration of the inflammatory response in colitic rats as evidenced histologically and by a significant reduction of colonic MPO activity ($P < 0.05$). The probiotic partially counteracted the colonic glutathione depletion induced by the inflammatory process. In addition, probiotic-treated colitic rats showed significant lower colonic tumour necrosis factor (TNF) α levels ($P < 0.01$) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression when compared to non-treated rats. Finally, the probiotic induced growth of *Lactobacilli* species and production of SCFA in colonic contents in comparison with control colitic rats.

Conclusions: Administration of the probiotic *L. fermentum* facilitates the recovery of the inflamed tissue in the TNBS model of rat colitis, an effect associated with increased levels of glutathione as well as with amelioration of the production of some of the mediators involved in the inflammatory response of the intestine, such as TNF α and NO.

Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk.

J Appl Microbiol. 2006 Jul;101(1):72-9.

Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J.

Aims: The antimicrobial potential of four *Lactobacilli* (*Lactobacillus salivarius* CECT5713, *Lactobacillus gasserii* CECT5714, *L. gasserii* CECT5715 and *Lactobacillus fermentum* CECT5716), isolated from fresh human breast milk, was evaluated in this study and compared with *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, a reuterin-producing strain isolated from an artisan goat's cheese.

Methods and results: Agar diffusion tests, competitive adhesion assays and mucin expression assays were carried out in order to value the antibacterial properties of the *Lactobacilli* strains. The antibacterial capability of the strains was tested in vivo by using

a murine infection model with *Salmonella choleraesuis*. The results revealed that all the strains studied, displayed antibacterial properties against pathogenic bacteria. However, the antibacterial potential varied among the lactobacilli tested and, in fact, *L. salivarius* CECT5713 showed not only the best in vitro antibacterial activity, but also the highest protective effect against a *Salmonella* strain in the murine infection model.

Conclusion: The four breast-milk lactobacilli, and particularly *L. salivarius* CECT5713, possess potent antibacterial activities that result in a higher protection against *S. choleraesuis* CECT4155 in a mouse infection model.

Significance and impact of the study: These results suggest that lactobacilli from breast milk could contribute to an anti-infective protection in neonates and would be excellent candidates for the development of infant probiotic products.

Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section.

Curr Microbiol. 2005 Oct;51(4):270-4.

Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM.

In a previous study, lactic acid bacteria were isolated from meconium obtained from healthy neonates born by cesarean section. Such a finding suggested that term fetuses are not completely sterile, and that a mother-to-child efflux of commensal bacteria may exist. Therefore, presence of such bacteria in umbilical cord blood of healthy neonates born by elective cesarean section was investigated. The blood samples were submitted to an enrichment step and then in-oculated onto agar plates. All the identified isolates belonged to the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, or *Propionibacterium*. Later, a group of pregnant mice were orally inoculated with a genetically labeled *E. faecium* strain previously isolated from breast milk of a healthy woman. The labeled strain could be isolated and polymerase chain reaction detected from the amniotic fluid of the inoculated animals. In contrast, it could not be detected in the samples obtained from a noninoculated control group.

Probiotic potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breast milk.

J Hum Lact. 2005 Feb;21(1):8-17; quiz 18-21, 41.

Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM.

Breast milk is an important factor in the initiation, development, and composition of the neonatal gut microbiota. In a previous study, the authors isolated lactic acid bacteria from milk of healthy mothers. Since some of the identified isolates belonged to the genus *Lactobacillus*, the objective of this work was to evaluate the probiotic potential of 2 *Lactobacillus gasseri* and 1 *Lactobacillus fermentum* strains. Different assays, including survival to conditions simulating those existing in the gastrointestinal tract, production of antimicrobial compounds, adherence to intestinal cells, production of biogenic amines, degradation of mucin, enzymatic profile, and pattern of antibiotic resistance, were performed. Globally, the results showed that the probiotic potential of lactobacilli isolated from milk of healthy mothers is, at least, similar to that of the strains commonly used in commercial probiotic products. This fact, together with the presence of prebiotic substances, indicates that breast milk is a natural synbiotic food.

Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut.

J Pediatr. 2003 Dec;143(6):754-8.

Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM.

Objectives: To investigate whether human breast milk contains potentially probiotic lactic acid bacteria, and therefore, whether it can be considered a synbiotic food. Study design Lactic acid bacteria were isolated from milk, mammary areola, and breast skin of eight healthy mothers and oral swabs and feces of their respective breastfed infants. Some isolates (178 from each mother and newborn pair) were randomly selected and submitted to randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction analysis, and those that displayed identical RAPD patterns were identified by 16S rDNA sequencing.

Results: Within each mother and newborn pair, some rod-shaped lactic acid bacteria isolated from mammary areola, breast milk, and infant oral swabs and feces displayed identical RAPD profiles. All of them, independently from the mother and child pair, were identified as *Lactobacillus gasseri*. Similarly, among coccoid lactic acid bacteria from these different sources, some shared an identical RAPD pattern and were identified as *Enterococcus faecium*. In contrast, none of the lactic acid bacteria isolated from breast skin shared RAPD profiles with lactic acid bacteria of the other sources.

Conclusions: Breast-feeding can be a significant source of lactic acid bacteria to the infant gut. Lactic acid bacteria present in milk may have an endogenous origin and may not be the result of contamination from the surrounding breast skin.

7.2. Galacto-Oligosaccharide (GOS)

Prebiotic effect of an infant formula supplemented with galacto-oligosaccharides: randomized multicenter trial.

J Am Coll Nutr. 2014; 33(5): 385–393.

Giovannini M, Verduci E, Gregori D, Ballali S, Soldi S, Ghisleni D, Riva E.

Objective: The objective of the study was to investigate the effects of a galacto-oligosaccharides (GOS)-supplemented formula on the intestinal microbiota in healthy term infants, with a specific consideration for gastrointestinal symptoms as colic, stool frequency and consistency, regurgitation.

Methods: This was a randomized, double-blind, controlled, parallel-group clinical trial performed simultaneously by 6 centers in Italy. Three groups were considered: breastfed, formula-fed, and GOS-supplemented formula-fed infants. Formula-fed infants were randomized to receive either the control or the study formula and consume the assigned formula exclusively until the introduction of complementary feeding. The nutritional composition of the 2 formulas were identical, apart from the supplemented GOS (0.4 g/100 mL) in the study formula. Four different types of bacteria were evaluated in order to assess the efficacy of GOS-supplemented formula on infants: Bifidobacterium, Lactobacillus, and Clostridium, Escherichia coli.

Results: A total of 199 breastfed infants and 163 formula-fed infants were recruited. When considering stool frequency and consistency, GOS-supplemented formula presented normal and soft stools in the majority of episodes (89%). In the supplemented group the incidence of colic was lower with respect to the control group. A significantly lower count of Clostridium and a higher count of Bifidobacterium were found when comparing study formula and control formula in infants with colic. In children with colic the ratio between Clostridium count and Bifidobacterium and Lactobacillus count was in favor of the latter two when considering the GOS-supplemented formula group with respect to the control one.

Conclusions: The prebiotic-supplemented formula mimicked the effect of human milk in promoting Bifidobacterium and Lactobacillus growth and in inhibiting Clostridium growth, resulting in a significantly lower presence of colic.

Prebiotic effect during the first year of life in healthy infants fed formula containing GOS as the only prebiotic: a multicentre, randomised, double-blind and placebo-controlled trial.

Eur J Nutr. 2015 Feb;54(1): 89-99.

Sierra C, Bernal MJ, Blasco J, Martínez R, Dalmau J, Ortuño I, Espín B, Vasallo MI, Gil D, Vidal ML, Infante D, Leis R, Maldonado J, Moreno JM, Román E.

Purpose: Currently, there is no consensus concerning the possible beneficial colonic and systemic effects of prebiotic-containing infant formula. This study assesses whether the feeding of a galactooligosaccharides (GOS)-containing infant formula (0.44 g/dl of GOS) and the subsequent feeding of a GOS-containing follow-on formula (0.50 g/dl of GOS) have a prebiotic effect on intestinal microbiota that helps to decrease infections and allergy manifestations in healthy infants during the first year of life.

Methods: A multicentre, randomised, double-blind and placebo-controlled trial was carried out on 365 healthy term infants enrolled before 8 weeks of age and randomly assigned to a formula with or without GOS, until 12 months of age. The incidence of infections and allergy manifestations, the antibiotics prescribed and faecal characteristics were recorded up to 12 months of age, while faecal samples were collected up to 4 months for the measurement of secretory immunoglobulin A, short-chain fatty acids and microbiota.

Results: A prebiotic effect on the faecal analysis was observed at 4 months of life. The GOS group showed a lower faecal pH ($P = 0.019$), a lower decreasing trend in secretory immunoglobulin A ($P = 0.078$), lower butyric acid concentration ($P = 0.040$) and an increase in Bifidobacterium counts ($P = 0.010$). Changes in faecal characteristics involved greater frequency ($P < 0.001$) and softer consistency ($P < 0.05$). The incidence of infections or allergic manifestations during the first year of life was similar in both groups, with no statistical differences ($P > 0.05$).

Conclusions: The feeding of GOS-containing infant formula produced a definite prebiotic effect consisting of changes in faecal composition and microbiota, and in faecal consistency and the frequency of defaecation. No changes in the incidence of infection or allergic manifestation during the first year of life were observed.

Galactooligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: a double-blind randomized multicenter study.

J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009 Jan;48(1):82-8.

Fanaro S, Marten B, Bagna R, Vigi V, Fabris C, Peña-Quintana L, Argüelles F, Scholz-Ahrens KE, Sawatzki G, Zelenka R, Schrezenmeir J, de Vrese M, Bertino E.

Objectives: The primary objective of this study was to determine the bifidogenic effect of galactooligosaccharides (GOS) in a follow-on formula and the effects on other intestinal bacteria. Secondary objectives were the effects on stool characteristics, growth, and general well-being.

Participants and methods: In a multicenter, double-blind study, 159 healthy infants, formula-fed at enrollment (at 4-6 months), were randomized to an experimental follow-on formula supplemented with 5 g/L (GOS) (77 infants), or to a standard follow-on formula (control, 82 infants). Infants were evaluated at enrollment (study day 1 = sd1), after 6 weeks (study day 2 = sd2), and after an additional 12 weeks (study day 3 = sd3). At each study day, a fresh stool sample for the bacterial counts was collected, and the growth parameters were measured. At sd2, urinary specimens were collected for the evaluation of urinary osmolarity.

Results: At sd2 and sd3, the GOS group had a higher median number (colony-forming units per gram of stool) of bifidobacteria than did the control group (sd2 GOS 9.2×10^9 vs control 4.4×10^9 , $P = 0.012$); (sd3 GOS 7.2×10^9 vs control 2.4×10^9 , $P = 0.027$). Other bacteria did not show any significant differences between the 2 groups at all study days. The GOS produced softer stools but had no effect on stool frequency. The urinary osmolarity (mOsm/L) at sd2 was comparable in both groups. Supplementation had no influence on the incidence of gastrointestinal side effects or on the growth of the infants.

Conclusions: These data indicate that the addition of GOS (5 g/L) to a follow-on formula positively influences the bifidobacteria flora and the stool consistency in infants during the supplementation period at weaning. No local or systemic side effects were recorded.

Low level of galactooligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal Bifidobacteria and Lactobacilli.

World J Gastroenterol. 2008 Nov 14;14(42):6564-8.

Ben XM, Li J, Feng ZT, Shi SY, Lu YD, Chen R, Zhou XY.

Aim: To investigate the effect of a new infant formula supplemented with a low level (0.24 g/100 mL) of galactooligosaccharide (GOS) on intestinal micro-flora (Bifidobacteria, Lactobacilli and E. coli) and fermentation characteristics in term infants, compared with human milk and a standard infant formula without GOS.

Methods: Term infants (n = 371) were approached in this study in three hospitals of China. All infants started breast-feeding. Those who changed to formula-feeding within 4 wk after birth were randomly assigned to one of the two formula groups. Growth and stool characteristics, and side effects that occurred in recruited infants were recorded in a 3-mo follow-up period. Fecal samples were collected from a subpopulation of recruited infants for analysis of intestinal bacteria (culture technique), acetic acid (gas chromatography) and pH (indicator strip).

Results: After 3 mo, the intestinal Bifidobacteria, Lactobacilli, acetic acid and stool frequency were significantly increased, and fecal pH was decreased in infants fed with the GOS-formula or human milk, compared with those fed with the formula without GOS. No significant differences were observed between the GOS formula and human milk groups. Supplementation with GOS did not influence the incidence of crying, regurgitation and vomiting.

Conclusion: A low level of GOS (0.24 g/100 mL) in infant formula can improve stool frequency, decrease fecal pH, and stimulate intestinal Bifidobacteria and Lactobacilli as in those fed with human milk.

Supplementation of milk formula with galactooligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants.

Chin Med J (Engl). 2004 Jun;117(6):927-31.

Ben XM, Zhou XY, Zhao WH, Yu WL, Pan W, Zhang WL, Wu SM, Van Beusekom CM, Schaafsma A.

Background: Oligosaccharides in human milk may protect infants by improving the intestinal micro-flora and fermentation. This study was to investigate effects of infant formula milk consisting of galactooligosaccharide (GOS) on intestinal microbial populations and the fermentation characteristics in term infants in comparison with that of human milk.

Methods: The test formula (Frisolac H, Friesland, Netherland) was supplemented with GOS at a concentration of 0.24 g/dl. Human milk and another formula without oligosaccharides (Frisolac H, Friesland, Netherland) were used as positive and negative control respectively. Growth, stool characteristics, and side effects of the recruited infants were recorded after 3 and 6 months' follow-up, and the fecal species were collected for the analysis of intestinal micro-flora, short chain fatty acid (SCFA) and pH.

Results: At the end of 3- and 6-month feeding period, intestinal Bifidobacteria and Lactobacilli were significantly increased in infants fed with GOS supplemented formula and human milk when compared with infants fed with negative control formula; however, there was no statistically significant difference between GOS supplemented formula and human milk groups. Stool characteristics were influenced by the supplement and main fecal SCFA (acetic), and stool frequency were significantly increased in infants fed with GOS supplemented formula and human milk, while the fecal pH was significantly decreased as compared with that of negative control ($P < 0.05$). Supplementation had no influence on incidence of side effects (including crying, regurgitation and vomiting).

Conclusions: Supplementing infant formula with GOS at a concentration of 0.24 g/dl stimulates the growth of Bifidobacteria and Lactobacilli in the intestine and stool characteristics are similar to in term infants fed with human milk.

7.3. Kombination *L. fermentum* CECT5716 und GOS

Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* CECT5716: A 3-year follow-up of a randomized controlled trial.

Pharmacol Res. 2015 May-Jun;95-96:12-9.

Maldonado-Lobón JA, Gil-Campos M, Maldonado J, López-Huertas E, Flores-Rojas K, Valero AD, Rodríguez-Benítez MV, Bañuelos O, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Olivares M.

Lactobacillus fermentum CECT5716 is a probiotic strain originally isolated from human breast milk. Previous clinical studies in infants showed that the early administration of a milk formula containing this probiotic strain was safe and may be useful for the prevention of community-acquired infections. This is a 3-year follow-up study aimed at evaluating the long-term effects produced by the early consumption of an infant formula supplemented with *L. fermentum* CECT5716 (experimental group, EG) compared with a control formula without the probiotic (control group, CG). The infants included in this

follow-up study had previously completed a 5-month randomized double-blind controlled trial (from 1 to 6 months of age), where the safety and tolerance of the probiotic formula was evaluated. The main outcome of the follow-up study was the growth of the children. The secondary outcomes included the incidence of infectious and non-infectious diseases, parameters related with intestinal function and faecal microbiota. At 3 years, the mean values of weight, length and head circumference were similar in children of the EG compared with those of the CG. No differences were observed in the incidence of infectious and non-infectious diseases or disorders related with intestinal function. The pattern of faecal microbiota was also similar between both groups. In conclusion, this 3-year study shows that the early administration of the probiotic of *L. fermentum* CECT5716 in an infant formula is safe and it does not produce measurable differences in children compared with a control formula.

Lactobacillus fermentum CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial.

Pharmacol Res. 2012 Feb;65(2):231-8.

Gil-Campos M, López MÁ, Rodríguez-Benítez MV, Romero J, Roncero I, Linares MD, Maldonado J, López-Huertas E, Berwind R, Ritzenthaler KL, Navas V, Sierra C, Sempere L, Geerlings A, Maldonado-Lobón JA, Valero AD, Lara-Villoslada F, Olivares M.

The objective of the study was to evaluate the safety and tolerance of an infant formula supplemented with *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from breast milk, in infants of 1-6 months of age. A randomized double blinded controlled study including healthy infants was conducted. One month aged infants received a prebiotic infant formula supplemented with *L. fermentum* (experimental group) or the same formula without the probiotic strain (control group) for 5 months. The primary outcome of the study was average daily weight gain between baseline and 4 months of age. Secondary outcomes were other anthropometric data (length and head circumference), formula consumption, and tolerance. Incidence of infections was also recorded by pediatricians. No significant differences in weight gain were observed between both groups, neither at 4 months of age (29.0 ± 7.8 vs 28.9 ± 5.7 g/day) nor at 6 months (25.1 ± 6.1 vs 24.7 ± 5.2 g/day). There were no statistically significant differences in the consumption of the formulae or symptoms related to the tolerance of the formula. The incidence rate of gastrointestinal infections in infants of the control group was 3 times higher than in the probiotic group ($p=0.018$). Therefore, consumption of a prebiotic infant formula enriched with the human milk probiotic strain *L. fermentum* CECT5716 from 1 to 6 months of life is well tolerated and safe. Furthermore, the consumption of this formula may improve the health of the infants by reducing the incidence of gastrointestinal infections.

Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants.

J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012 Jan;54(1):55-61.

Maldonado J, Cañabate F, Sempere L, Vela F, Sánchez AR, Narbona E, López-Huertas E, Geerlings A, Valero AD, Olivares M, Lara-Villoslada F.

Objectives: The aim of the study was to examine the effects of a follow-on formula containing *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (*L. fermentum*) on the incidence of infections in infants between the ages of 6 and 12 months.

Patients and methods: A randomized double-blinded controlled study including infants at the age of 6 months was conducted. Infants were assigned randomly to either follow-on formula supplemented with *L. fermentum* plus galactooligosaccharide (experimental group, EG), or the same formula supplemented with only galactooligosaccharide (control group, CG). The main outcome was the incidence of infections for the 6-month duration of the study.

Results: The EG showed a significant 46% reduction in the incidence rate (IR) of gastrointestinal infections (EG: 0.196 ± 0.51 , CG: 0.363 ± 0.53 , IR ratio 0.54, 95% confidence interval [CI] 0.307-0.950, $P=0.032$), 27% reduction in the incidence of upper respiratory tract infections (EG: 0.969 ± 0.96 , CG: 1.330 ± 1.23 , IR ratio 0.729, 95% CI 0.46-1.38, $P=0.026$), and 30% reduction in the total number of infections (EG: 1.464 ± 1.15 , CG: 2.077 ± 1.59 , IR ratio 0.70, 95% CI 0.46-1.38, $P=0.003$), at the end of the study period compared with CG.

Conclusions: Administration of a follow-on formula with *L. fermentum* CECT5716 may be useful for the prevention of community-acquired gastrointestinal and upper respiratory infections.

7. Literaturverzeichnis

- Adlerberth I, Wold AE:
Establishment of the gut microbiota in Western infants.
Acta Paediatr 2009; 98: 229–238
- Ahrne S et al.:
Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants.
Microbes Infect. 2005; 7(11–12): 1256–1262
- Arribas B et al.:
Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice.
Br J Nutr 2009; 101(1): 51–8
- Arroyo R et al.:
Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk.
Clin Infect Dis 2010; 50(12): 1551–1558
- Arumugam M et al.:
Enterotypes of the human gut microbiome.
Nature 2011; 473: 174–180
- Ashley C et al.:
Growth and tolerance of infants fed formula supplemented with polydextrose (PDX) and/or galactooligosaccharides (GOS): double-blind, randomized, controlled trial.
Nutrition Journal 2012; 11: 38
- Backhed F et al.:
Host-bacterial mutualism in the human intestine.
Science 2005; 308: 1635–1638
- Bakardjiev AI et al.:
Listeria monocytogenes traffics from maternal organs to the placenta and back.
PLoS Pathog 2006; 2: 623–663
- Ben XM et al.:
Supplementation of milk formula with galactooligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants.
Chinese Medical Journal 2004; 117(6): 927–931
- Ben XM et al.:
Low level of galactooligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal bifidobacteria and lactobacilli.
World J Gastroenterol 2008; 14(42):6564–6568
- Bischoff SC:
Probiotika, Präbiotika und Synbiotika
Thieme Verlag 2009
- Blaut M:
Die intestinale Mikrobiota des Säuglings: Aufbau und Bedeutung
Kinderärztliche Praxis 82 (1/2011)
Sonderheft Prä und Probiotik
- Braegger C et al.:
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(2): 238–250
- Cabrera-Rubio R et al.:
The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery.
Am J Clin Nutr 2012; 96(3): 544–551
- Cho CE, Norman M.:
Cesarean section and development of the immune system in the offspring.
Am J Obstet Gy-necol. 2013; 208(4): 249–254
- Collado MC et al.:
Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative realtime PCR. Lett Appl Microbiol 2009; 48(5): 523–528

- Coppa GV et al.: Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatr Res* 2006; 59(3): 377–382
- DiGiulio DB et al.: Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 2008; 26, 3(8): 1–10
- Dominguez-Bello MG et al.: Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107 (26): 11971–11975
- EFSA: Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal* 2007; 587,1–16
- EFSA: Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2010 update). *EFSA Journal* 2010; 8(12): 1944
- ESPGHAN: Prebiotic oligosaccharides in dietetic products for infants. *J Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2004; 39: 465–473
- Fanaro S et al.: Galactooligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: a double-blind randomized multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; 48: 82–88
- Fanaro S et al.: Galactooligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: a review. *Acta Paediatr Suppl* 2005; 94: 22–26
- FAO/WHO: Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001
- FDA: Agency Response Letter GRAS Notice N. GRN 000236. 2008 www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153910.htm (Stand 11.03.2014; abgerufen am 05.04.2017)
- FDA: Agency Response Letter GRAS Notice N. GRN 000531. 2015 www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm443093 (Stand 04.20.2015; abgerufen am 05.04.2017)
- Fernández L et al.: The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013; 69(1): 1–10
- Gibson GR, Roberfroid MD: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995; 125(6): 1401–1412
- Gil-Campos M et al.: Prebiotic Effect of an Infant Formula Supplemented with Galacto-Oligosaccharides: Randomized Multicenter Trial. *J Am Coll Nutr.* 2014;33(5): 385–393
- Giovannini M et al.: Prebiotic Effect of an Infant Formula Supplemented with Galacto-Oligosaccharides: Randomized Multicenter Trial. *J Am Coll Nutr.* 2014;33(5): 385–393
- Gueimonde M et al.: Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* 2007; 92: 64–66
- Heikkila MP, Saris PE: Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol.* 2003; 95(3): 471–478
- Howie PW et al.: Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ* 1990; 300: 11–16
- Houghteling PD, Walker WA: Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60(3): 294–307
- Jiménez E et al.: Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol.* 2005; 51(4): 270–274
- Jiménez E et al.: Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *J Bacteriol* 2010; 192: 4800
- Jost T et al.: Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental Microbiology* 2014; 16(9): 2891–2904
- Kunz C et al.: Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr.* 2000; 20: 699–722
- Kunz C, Rudloff S: Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *Int Dairy J* 2006; 16: 1341–1346
- Langa S: Interactions between lactic acid bacteria, intestinal epithelial cells and immune cells. Development of in vitro models (Ph.D. thesis). Complutense University of Madrid, 2006
- Lara-Villoslada F et al.: Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr.* 2007; 98 Suppl 1: 96–100
- Lara-Villoslada F et al.: Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Dairy Res.* 2009; 76(2): 216–221
- Laubereau B et al. GINI Study Group: Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch Dis Child* 2004; 89(11): 993–997
- López-Alarón M et al.: Breast feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *J Nutr* 1997; 127: 436–443
- Maldonado J et al.: Oral tolerance studies of the human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716. WCPGHAN 3rd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 163–167. Editors Fagundes-Neto U and Uauay R. *Medimond International Proceedings* 2008.
- Maldonado J et al.: Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54(1): 55–61
- Maldonado-Lobón JA et al.: Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* CECT5716: a 3-year follow-up of a randomized controlled trial. *Pharmacol Res.* 2015; 95–96: 12–9
- Martín R et al.: Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003; 143(6): 754–8

- Martín R et al.:
The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics.
Trends in Food Science & Technology. 2004; 15: 121–127
- Martín R et al.:
Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk.
J Hum Lact 2005; 21: 8–17
- Martín R et al.:
Diversity of the lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut.
J Appl Microbiol 2007; 103: 2638–2566
- Martín R et al.:
Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR.
Appl Environ Microbiol 2009; 75: 965–969
- Martín V et al.:
Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces.
J Hum Lact 2012; 28: 36–44
- Matamoros S et al.:
Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health.
Trends Microbiol. 2013;21(4): 167–173
- Meier R:
Medizinische Bedeutung von Präbiotika und Synbiotika. In: Bischoff SC: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika;
Thieme Verlag 2009: 186–193
- McGuire M, McGuire M, Bode L:
Prebiotics and probiotics in human milk.
Elsevier Verlag 2017
- Olivares M et al.:
Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk.
J Appl Microbiol 2006; 101(1): 72–79
- Olivares M et al.:
Oral intake of Lactobacillus fermentum CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination.
Nutrition 2007; 23(3): 254–260
- Palmer C et al.:
Development of the Human Infant Intestinal Microbiota.
PLoS Biology 2007; 5(7): 1556–1573
- Pelzer ES et al.:
Microorganisms within human follicular fluid: effects on IVF.
PLoS One 2013; 8(3): e59062
- Peran L 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(8): 737–746
- Peran L et al.:
A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, Lactobacillus reuteri and Lactobacillus fermentum, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis.
Br J Nutr. 2007; 97(1): 96–103
- Perez-Cano FJ et al.:
In vitro immunomodulatory activity of Lactobacillus fermentum CECT5716 and Lactobacillus salivarius CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk.
Immunobiology 2010; 215(12): 996–1004
- Perez PF et al.:
Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells?
Pediatrics 2007; 119: 724–732
- Reid G et al.:
Microbes central to human reproduction.
Am J Reprod Immunol. 2015;73(1):1–11
- Renz-Polster H et al.:
Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood.
Clin Exp Allergy. 2005;35(11): 1466–1472
- Rescigno M et al.:
Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.
Nat Immunol 2001; 2: 361–367
- Rescigno M et al.:
Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers.
Immunobiol 2001; 204: 572–581
- Rodríguez JM et al.:
The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life.
Microbiol Ecol Health Dis 2015; 26: 26050
- Rudloff S, Kunz C:
Milk oligosaccharides and metabolism in infants.
Adv Nutr. 2012; 3(3): 398–405
- Rudloff S, Kunz C:
Oligosaccharide in Frauenmilch.
Monatsschr Kinderheilkd 2015; 163: 790–795
- Satokari R et al.:
Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta.
Lett Appl Microbiol. 2009; 48(1): 8–12
- Schulz J et al.:
Probiotika: Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte.
Hippokrates Verlag 2008
- Severin AL:
Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens.
FEMS Microbiol Rev. 2004; 28(4): 405–440
- Shoaf K et al.:
Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic Escherichia coli to tissue.
Infect Immun 2006; 74(12): 6920–6928
- Schulze J, Sonnenborn U, Ölschläger T, Kruis W:
Probiotika.
Thieme Verlag 2008
- Sierra C et al.:
Prebiotic effect during the first year of life in healthy infants fed formula containing GOS as the only prebiotic: a multicentre, randomised, double-blind and placebo-controlled trial.
Eur J Nutr 2015; 54(1):89–99
- Sinclair HR et al.:
Galactooligosaccharides (GOS) inhibit vibrio cholerae toxin binding to its GM1 receptor.
J Agric Food Chem 2009; 57(8): 3113–3119
- Sinkiewicz G et al.:
Occurrence of lactobacillus reuteri in human breast milk.
Microbiol Ecol Health Dis 2008; 20: 122–126
- Soto A et al.:
Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk: Influence of Antibiotherapy and Other Host and Clinical Factors.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014; 59: 78–88
- Thavagnanam S et al.:
A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma.
Clin Exp Allergy 2008; 38(4): 629–633
- Tremaroli V, Bäckhed F:
Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism.
Nature. 2012; 489(7415): 242–249
- Uhlig HH, Powrie F:
Dendritic cells and the intestinal bacteria flora: a role for localized mucosal immune responses.
J Clin Invest 2003; 112: 648–651
- Wright AL et al.:
Increasing breastfeeding rates to reduce infant illness at the community level.
Pediatrics 1998; 101(5): 837–44

Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|-----------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AOS | acidic oligosaccharides |
| CECT | Colección Española de Cultivos Tipo |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| ESPGHAN | European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FOS | Fructo-Oligosaccharide |
| GALT | gut-associated lymphatic tissue |
| GRAS | Generally Recognized As Safe |
| GOLF | Kombination von GOS und <i>L. fermentum</i> |
| GOS | Galacto-Oligosaccharide |
| HMO | Humane Milch-Oligosaccharide |
| IgA | Immunglobulin A |
| KbE | Koloniebildende Einheiten |
| KKFS | kurzkettige Fettsäuren |
| NK-Zellen | natürliche Killerzellen |
| PDX | Polydextrose |
| QPS | qualified presumption of safety |
| Tab. | Tabelle |
| WHO | World Health Organisation |

Herausgeber:

HiPP GmbH & Co. Vertrieb KG
Wissenschaftliches Marketing
Georg-Hipp-Straße 7
85276 Pfaffenhofen

hipp-fachkreise.de
hipp-fachkreise.at

Die neue Generation Säuglingsnahrung nach dem Vorbild der Natur:

HiPP Combiotik®



47836-05.2017

Wichtiger Hinweis:

Stillen ist die beste Ernährung für ein Baby.

Säuglingsanfangsnahrung sollte nur auf Rat von Kinderärzten
oder anderen unabhängigen Fachleuten verwendet werden.

hipp-fachkreise.de
hipp-fachkreise.at

