

Los probióticos orales reducen la incidencia y la gravedad de la enterocolitis necrosante en los recién nacidos con muy bajo peso al nacimiento

Hung-Chih Lin^a, Bai-Horng Su^a, An-Chyi Chen^a, Chang-Hai Tsai^{a,b}, Tsu-Fuh Yeh^a y William Oh^c

OBJETIVO: Valorar la eficacia de los probióticos para reducir la incidencia y la gravedad de la enterocolitis necrosante en los recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento.

PACIENTES Y MÉTODOS: Se llevó a cabo un ensayo controlado y prospectivo, de carácter ciego y distribución aleatoria, para valorar los efectos beneficiosos de los probióticos en cuanto a reducir la incidencia y gravedad de la enterocolitis necrosante en los recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento (< 1.500 g). Para el ensayo fueron elegibles los recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento que iniciaron la alimentación enteral y sobrevivieron más allá del séptimo día posnatal. Se distribuyó aleatoriamente a los pacientes en 2 grupos, tras obtener el consentimiento informado de los padres. Los niños del grupo de estudio recibieron Infloran (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis*) con leche de mujer 2 veces al día, hasta que fueron dados de alta. Los niños del grupo de control recibieron únicamente leche de mujer. Los clínicos que asistían a los niños ignoraban a qué grupo pertenecían éstos. El parámetro evolutivo que se investigó fue el fallecimiento o la enterocolitis necrosante.

RESULTADOS: Participaron 367 recién nacidos, 180 en el grupo de estudio y 187 en el grupo de control. Las variables demográficas y clínicas fueron similares en ambos grupos. La incidencia de fallecimientos o enterocolitis necrosante fue significativamente inferior en el grupo de estudio (9/180 frente a 24/187). La incidencia de ECN fue también significativamente más baja en el grupo de estudio, en comparación con el de control (2/180, frente a 10/187). Hubo 6 casos de enterocolitis necrosante grave (estadio 3 de Bell) en el grupo de control, y ninguno en el grupo de estudio. En ninguno de los hemocultivos positivos se aislaron especies de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*.

CONCLUSIÓN: Infloran, como probiótico administrado enteralmente con leche de mujer, reduce la inci-

dencia y la gravedad de la enterocolitis necrosante en los recién nacidos con muy bajo peso al nacimiento.

La enterocolitis necrosante (ECN) supone un problema mundial en los recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento (MBPN), y su incidencia es muy variable, pues afecta del 2,6 al 28% de estos niños¹. Se desconoce la patogenia exacta del proceso, aunque generalmente se considera multifactorial. Se han propuesto 3 factores principales a este respecto: la presencia de gérmenes patógenos, la exposición a la alimentación enteral y un trastorno en la integridad de la mucosa intestinal². Estos factores pueden combinarse para ocasionar una lesión intestinal². Aunque las tasas de mortalidad en los lactantes con ECN pueden haber descendido por los avances en la asistencia de apoyo y quirúrgica, se carece de estrategias preventivas eficaces. Recientemente se han explorado diversos métodos preventivos nuevos, como el uso de esteroides prenatales³, la alimentación con leche de mujer⁴, el refuerzo de la actividad de la acetilhidrolasa como factor activador plaquetario⁵, el empleo de antagonistas de los receptores del factor activador plaquetario⁶ y los probióticos⁷⁻¹¹.

Se han empleado *Lactobacillus acidophilus*⁹ y *Bifidobacterium infantis*¹⁰ como probióticos para reducir la incidencia de ECN; sin embargo, existe debate sobre la dosis, la duración, la inocuidad y la eficacia de los probióticos^{9,10}.

Nuestra hipótesis es que la administración oral de probióticos en forma de Infloran (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis*) puede reducir la incidencia y la gravedad de la ECN en los recién nacidos de MBPN.

PACIENTES Y MÉTODOS

Desde el 1 de julio de 1999 hasta el 31 de diciembre de 2003 se efectuó un ensayo controlado y prospectivo, de carácter ciego y con distribución aleatoria, en la Neonatal Intensive Care Unit (UCIN) del China Medical University Hospital, el centro de neonatología de nivel III en la región central de Taiwán. El estudio fue aprobado por nuestro Institutional Review Board. Fueron elegibles para el ensayo los recién nacidos de MBPN (peso al nacimiento < 1.500 g) que iniciaron la alimentación enteral y sobrevivieron más allá del séptimo día posnatal. Después de obtener el consentimiento informado de los padres, se distribuyó aleatoriamente a los niños entre el grupo de estudio y el grupo

^aDepartment of Pediatrics, China Medical Children Hospital Taichung, Taiwán. ^bTaichung Healthcare and Management University, Taichung, Taiwán. ^cDepartment of Pediatrics, Brown Medical School, Providence, Estados Unidos.

de control, mediante una tabla secuencial de números aleatorios. Las asignaciones se introdujeron en sobres opacos, numerados secuencialmente y sellados. Los niños del grupo de estudio recibieron Infloran (*Lactobacillus acidophilus* [mínimo de 1.000 millones, 4.356, obtenidos de la American Type Culture Collection en 1973], y *Bifidobacterium infantis* [mínimo de 1.000 millones, 15.697, obtenidos de la American Type Culture Collection en 1973]; Swiss Serum and Vaccine Institute, Berna, Suiza), 125 mg/kg/dosis, 2 veces al día con leche de mujer, hasta que fueron dados de alta. El grupo de control se alimentó con leche de mujer, sin adición de probióticos. El Infloran se guardó en el frigorífico a una temperatura de 4-8 °C y se mezcló con la leche de mujer antes de la alimentación. La leche procedía de la propia madre del niño o del banco de leche de mujer. La adición de Infloran a la leche la llevó a cabo el personal del banco de leche de mujer, que no intervenía en la asistencia del niño y siguió las instrucciones del sobre sellado. Así, las únicas personas que conocían el grupo asignado al niño eran los investigadores y el equipo del banco de leche, que no intervenía en la asistencia de los niños.

La alimentación se inició cuando las constantes vitales eran estables, existían sonidos de actividad intestinal, sin distensión abdominal, con ausencia de bilis o sangre en el aspirado de la sonda nasogástrica, y sin que el niño fuera portador de un catéter umbilical arterial o venoso durante al menos 24 h. Se siguió un estricto protocolo de alimentación en todos los niños estudiados. Según el peso al nacimiento y la edad gestacional, se inició la administración de una cierta cantidad de leche de mujer si el niño toleraba un intento con agua destilada. La cantidad de alimento se aumentó lentamente si había tolerancia, sin incrementar cada día más de 20 ml/kg/día. Se suspendió la alimentación si se observaba algún signo de intolerancia, es decir, presencia en 2 ocasiones de restos gástricos en cantidad superior a la mitad de la toma anterior, con distensión abdominal. Los niños que pesaban menos de 1.000 g recibieron nutrición parenteral total (NPT) hasta que se aportó la mitad de las calorías por vía oral. Un mismo médico se ocupó de la asistencia de los niños durante su estancia hospitalaria. Los residentes que rotaron por la UCIN proporcionaron asistencia según los protocolos establecidos en la unidad. Durante el período de estudio no se produjeron modificaciones en la unidad con respecto a los protocolos de tratamiento, las prácticas clínicas, el equipo y la infraestructura (como el personal de enfermería).

La ECN se cataloga según la clasificación modificada de Bell¹². El diagnóstico y la clasificación de la ECN la llevaron a cabo de forma independiente 2 neonatólogos de plantilla con experiencia, que ignoraban el grupo asignado al niño. En caso de discordancia en la clasificación, un tercer neonatólogo de plantilla arbitró la diferencia. Las variables demográficas y clínicas que constituían potenciales factores de riesgo para la ECN se resumieron de forma prospectiva de la historia clínica, mediante las siguientes definiciones. Los corticoides prenatales indican la administración de 2 dosis de betametasona o dexametasona a la madre, 24 h o más antes del parto. Los niños cuyo peso de nacimiento se encontraba a más de 2 desviaciones estándar por debajo de la media para su edad gestacional se consideraron pequeños para la edad de gestación. La rotura precoz de membranas se definió como la rotura de la membrana amniótica > 18 h antes del parto. La corioamnionitis se definió como la presencia de fiebre materna, líquido amniótico maloliente, desviación a la izquierda de la fórmula leucocitaria y confirmación por el obstetra. La asfixia se definió mediante los siguientes criterios: a) pH ≤ 7,0 en la sangre umbilical o del cuero cabelludo; b) puntuación de Apgar ≤ 3 a los 5 min; c) manifestaciones neurológicas con hipotonía, convulsiones o encefalopatía hipoxicoisquémica, y d) fallo multiorgánico. Se empleó el factor tensioactivo para el SDR 2 h después del nacimiento en los niños ventilados que requerían suplementos de oxígeno con una fracción inspiratoria de oxígeno ≥ 0,40 y signos radiológicos típicos de síndrome de distrés respiratorio. Se administró indometacina en los niños con PCA y cortocircuito de izquierda a derecha visualizado por ecocardiografía. La sepsis se definió como todo niño que presentara signos clínicos sépticos tras la distribución aleatoria, con demostración por hemocultivo positivo. Este hecho no se limitó a la asociación con el falleci-

TABLA 1. Características clínicas maternas y características demográficas y clínicas del niño

| | Grupo | |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------|
| | Estudio (n = 80) | Control (n = 187) |
| Rotura prolongada de membranas | 53 (29,4) | 43 (23,0) |
| Preeclampsia | 26 (14,4) | 24 (12,8) |
| Corticoides prenatales | 121 (67,2) | 114 (61,0) |
| Cesárea | 104 (57,8) | 100 (53,5) |
| Embarazo múltiple | 34 (18,9) | 33 (17,6) |
| Corioamnionitis | 9 (5,0) | 10 (5,3) |
| Varones | 84 (46,7) | 100 (53,5) |
| Pequeño para la edad gestacional | 42 (23,3) | 41 (22,8) |
| Gestación (semanas) | 28,5 ± 2,5 ^a | 28,2 ± 2,5 |
| Peso de nacimiento (g) | 1.104 ± 242 | 1.071 ± 243 |
| Apgar (5 min) < 3 | 41 | 44 |
| 4-6 | 41 | 49 |
| > 7 | 98 | 93 |
| Asfixia | 4 (2,2) | 6 (3,2) |
| pH | 7,29 ± 1 | 7,29 ± 11 |

^aMedia ± DE (%).

Ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa (p > 0,05).

miento o la ECN. El parámetro evolutivo primario a valorar fue la incidencia de fallecimientos o de ECN (≥ estadio 2). El fallecimiento se incluyó como parámetro evolutivo primario, al ser una variable competitiva de la ECN.

Cálculo del tamaño de la muestra y estadísticas

Nuestros datos históricos mostraban que la incidencia combinada de ECN o fallecimientos era aproximadamente del 23%. Estableciendo un error $\alpha < 0,05$, un error $\beta < 0,2$ (bilateral) y una reducción absoluta de un 50% en la incidencia de ECN o muerte, el número total necesario para verificar nuestra hipótesis era de 338, o 169 por grupo.

Se utilizó la prueba de la χ^2 para analizar los datos por categorías, junto a la prueba exacta de Fisher cuando era aplicable. Se empleó la prueba de la t de Student para los datos continuos. El modelo de regresión logística se usó para analizar los efectos del tratamiento sobre las variables evolutivas primarias y secundarias (muerte, ECN y sepsis).

RESULTADOS

Hubo 417 recién nacidos de MBPN ingresados en nuestra UCIN durante los 4 años y medio del período de estudio. De ellos, 50 fallecieron (n = 42), presentaron ECN antes de los 7 días de vida (n = 6) o la familia no otorgó el consentimiento informado para el estudio (n = 2). Participaron en el ensayo 367 niños: 180 en el grupo de estudio y 187 en el grupo de control. Cincuenta y seis niños del grupo de estudio y 61 del grupo de control se alimentaron con leche del banco. Las características clínicas de la madre y las características demográficas y clínicas del niño no difirieron entre los 2 grupos (tabla 1). Las variables clínicas del niño tampoco difirieron entre ambos grupos (tabla 2). Ninguno de los niños con asfixia presentó ECN.

En la tabla 3 se muestran las evoluciones del estudio mediante el análisis de regresión logística. La incidencia de fallecimientos o de ECN fue significativamente menor en el grupo de los probióticos que en el de control (9 de 180 [5%] frente a 24 de 187 [12,8%], respectivamente; p = 0,009). La incidencia de ECN fue, asimismo, más baja en el grupo probiótico, en comparación con el de control (2/180 [1,1%] frente a 10/187 [5,3%], respectivamente; p = 0,04). Hubo 6 casos de ECN grave (esta-

TABLA 2. Variables clínicas en los niños estudiados

| | Grupo | |
|---|-------------------|-------------------|
| | Estudio (n = 180) | Control (n = 187) |
| Edad al incorporarse al ensayo | 7,7 ± 2,0 | 7,9 ± 2,9 |
| Ayuno (días) ^a | 4,3 ± 3,5 | 4,4 ± 4,2 |
| Nutrición parenteral total (días) ^b | 14,7 ± 5,7 | 13,9 ± 5,0 |
| Cantidad de alimento a los 14 días ^c | 79,7 ± 47,2 | 86,0 ± 49,3 |
| Cantidad de alimento a los 21 días | 108,6 ± 51,3 | 114,1 ± 49,1 |
| Cantidad de alimento a los 28 días | 120,0 ± 42,4 | 121,1 ± 45,4 |
| Empleo del factor tensioactivo (n) | 100 (55,6) | 94 (50,2) |
| Catéter arterial umbilical (días) | 0,7 ± 1,3 | 0,7 ± 1,4 |
| Catéter venoso umbilical (días) | 0,8 ± 1,4 | 0,8 ± 1,5 |
| Ventilación mandatoria intermitente (días) | 9,6 ± 17,7 | 12,0 ± 21,0 |
| Neumotórax | 4 (2,2) | 3 (1,6) |
| O ₂ (días) | 33,9 ± 31,7 años | 34,0 ± 34,6 años |
| Uso de dopamina | 110 (61,1) | 100 (53,5) |
| Dopamina (días) | 3,5 ± 5,5 | 3,7 ± 6,1 |
| Indometacina (n) | 122 (67,8) | 117 (62,6) |
| Edad al comienzo de la ECN | 19,5 ± 13,4 | 16,4 ± 11,7 |
| Hemorragia intraventricular grados 3-4 (n) | 9 (5,0) | 14 (7,5) |
| UCIN (días) | 46,7 ± 27,1 | 46,5 ± 26,1 |

^aDías desde el nacimiento hasta el comienzo de la alimentación enteral.

^bDuración de la nutrición parenteral.

^cml/kg/día; media ± DE (%).

Ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa (p > 0,05).

dio 3 de Bell) en el grupo de control, y ninguno en el grupo probiótico (p = 0,03 por análisis de bivarianza). La incidencia de sepsis demostrada por cultivo fue significativamente menor en el grupo de estudio (p = 0,03). En ninguno de los hemocultivos positivos crecieron especies de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. La incidencia de ECN o sepsis fue menor en el grupo probiótico (24 de 180 [13,3%] frente a 46 de 187 [24,6%], respectivamente; p < 0,03). La incidencia de fallecimientos o ECN o sepsis fue significativamente más baja en el grupo probiótico (31 de 180 [17,2%] frente a 60 de 187 [32,1%], respectivamente; p < 0,009).

DISCUSIÓN

Nuestro estudio mostró que el Infloran reduce la incidencia y la gravedad de la ECN en los recién nacidos de MBPN. También observamos que el grupo de estudio presentó una menor incidencia de ECN y de sepsis. Según nuestros datos, el número que es necesario tratar para prevenir 1 caso de ECN es de 27, y para prevenir 1 fallecimiento por ECN, de 31.

Aunque muchas variables se asocian con el desarrollo de ECN, sólo la prematuridad¹³ y el bajo peso al nacimiento¹⁴ se han identificado de modo uniforme en los estudios de casos y controles. Otros factores que se han asociado con un mayor riesgo de ECN son el parto vaginal, la necesidad de ventilación mecánica, la exposición a glucocorticoides e indometacina en la primera semana de vida, la ausencia de un catéter umbilical arterial y la puntuación de Apgar baja a los 5 min¹⁴. Dado que el presente estudio se diseñó como un ensayo controlado de distribución aleatoria, estos factores de riesgo se distribuyeron también de forma aleatoria y no mostraron diferencias entre los 2 grupos estudiados.

Un componente principal en la patogenia propuesta de la ECN es la interacción de las bacterias con el intestino prematuro¹⁵. El hecho de que la ECN no ocurra *in utero* a pesar del estrés y de la ingestión fetal de 150 ml/kg/día de un líquido amniótico que contiene proteí-

TABLA 3. Variables evolutivas a valorar tras la administración de los probióticos orales (análisis de regresión logística)

| | Grupos | | P |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------|
| | Estudio (n = 180) | Control (n = 187) | |
| Fallecimiento | 7 (3,9) | 20 (10,7) | 0,009 |
| Fallecimiento o ECN | 9 (5) | 24 (12,8) | 0,009 |
| ECN grados 2 o 3 | 2 (1,1) | 10 (5,3) | 0,04 |
| Sepsis (cultivo +) | 22 (12,2) | 36 (19,3) | 0,03 |
| ECN o sepsis | 24 (13,3) | 46 (24,6) | 0,03 |
| Fallecimiento o ECN o sepsis | 31 (17,2) | 60 (32,1) | 0,009 |

nas, hidratos de carbono, grasas, inmunoglobulinas y electrolitos, sugiere que la colonización bacteriana es un factor importante en la patogenia de esta enfermedad^{16,17}. El modelo animal de la ECN también demostró la necesidad de la colonización bacteriana para el desarrollo de la ECN^{18,19}.

La flora microbiológica intestinal es un importante factor en los mecanismos de defensa del huésped frente a las infecciones bacterianas. Lawrence et al²⁰ demostraron que la colonización intestinal con un número limitado de especies bacterianas es tardía en un ambiente estéril. Estos autores especularon con que la ausencia de un ambiente aséptico en la UCIN daba lugar a la colonización intestinal, con absorción de toxinas bacterianas intactas, lo que puede lesionar el íleon inmaduro y provocar el desarrollo de la ECN. Hoy²¹ y Millar²² observaron un cambio cuantitativo y cualitativo en la flora fecal antes del comienzo de la ECN, con un descenso en la variedad de especies y un predominio de *Enterobacteriaceae*. Gewolb et al informaron de que *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se hallaban en las heces en menos del 5% de los recién nacidos con peso de nacimiento extremadamente bajo durante el primer mes de vida²³. Estos datos sugieren que la baja colonización de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en los recién nacidos de MBPN puede servir como factor predisponente para la infección microbiana.

Los mecanismos potenciales de los probióticos para proteger a los niños de alto riesgo frente al desarrollo de la ECN son los siguientes: aumento de la barrera que se opone a la translocación de las bacterias y sus productos a través de la mucosa^{24,25}, exclusión competitiva de los patógenos potenciales²⁶, modificación de la respuesta del huésped a los productos microbianos^{27,28} y favorecimiento de la nutrición enteral²⁹, que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos^{30,31} como *Klebsiella pneumoniae*³², *Escherichia coli*³³ y *Candida albicans*³⁴.

Los datos experimentales apoyan la teoría de la invasión microbiana como causa que contribuye a la ECN. Esta observación sugiere que la modificación de la flora microbiana mediante la administración enteral de probióticos puede ser beneficiosa. Sin embargo, son escasos los ensayos clínicos que confirman esta hipótesis⁹⁻¹¹.

Hoyos ha utilizado Infloran como probiótico para reducir la incidencia de la ECN¹⁰. En su estudio, administró un cuarto de tableta de Infloran a todos los niños ingresados en la UCIN. El resultado mostró una disminución significativa en la incidencia de ECN y de los fallecimientos asociados con la ECN en los niños tratados con Infloran, en comparación con los antecedentes de control. En las conclusiones del estudio se apoyó la realización de un ensayo controlado de distribución aleatoria para verificar la eficacia de esta estrategia.

En un reciente estudio multicéntrico de carácter doble ciego, se distribuyó aleatoriamente a 585 recién nacidos con menos de 33 semanas de edad gestacional, o con un peso de nacimiento inferior a 1.500 g, que sobrevivieron más de 2 semanas, para recibir un placebo o *Lactobacillus rhamnosus* GG una vez al día, desde el comienzo de la alimentación hasta el momento de recibir el alta⁹. Los parámetros evolutivos valorados fueron la incidencia de infecciones del tracto urinario, la sepsis bacteriana y la ECN. No hubo diferencias significativas entre los grupos del probiótico y del placebo por lo que respecta a cualesquiera de las 3 variables evolutivas. Sin embargo, la tasa de acontecimientos de las 2 variables pertinentes para nuestro estudio fue baja en el grupo de control: ECN (1,4%) y sepsis (3,4%), lo que requería una muestra de tamaño mucho mayor para verificar su hipótesis. Existen otras diferencias entre ese ensayo y el nuestro. Nosotros empleamos Infloran, un probiótico vivo, cultivado a partir de heces neonatales, que contiene *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis*. Otra diferencia es la edad de los niños a su ingreso en el estudio: 1 semana en el nuestro y más de 2 en el suyo.

Nuestro estudio mostró que el grupo probiótico presentaba una menor incidencia de ECN o sepsis. El mecanismo responsable de la eficacia de los probióticos para reducir la incidencia de sepsis en los recién nacidos de MBPN es probablemente similar al de la ECN^{36,37} y posiblemente sea el resultado de una mayor colonización de la microflora beneficiosa, como *Streptococcus salivarius*³⁸.

Aunque Wagner sugirió que se deben plantear las cuestiones relativas a la inocuidad de los probióticos en los huéspedes inmunodeficientes, como el recién nacido³⁹, nosotros no observamos complicaciones debidas al Infloran, como la sepsis ocasionada por *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. Sin embargo, nuestro ensayo no tiene la suficiente potencia como para valorar la ino-

cuidad en cuanto al posible riesgo de sepsis por *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*.

Nosotros observamos 6 casos de ECN antes de su incorporación al estudio y a la alimentación enteral, 5 de ellos con pesos inferiores a 1.000 g. Los probióticos por sí solos no pueden eliminar la ECN, lo que confirma aún más la teoría de que la ECN es una enfermedad multifactorial, en la que la colonización intestinal por microorganismos desfavorables es tan sólo uno de los factores.

DISCUSIÓN

La administración oral de Infloran en los recién nacidos de MBPN reduce la incidencia y la gravedad de la ECN. Infloran, en calidad de probiótico, protege a estos recién nacidos frente a la ECN.

AGRADECIMIENTO

El presente estudio fue subvencionado por el Research Department of China Medical University Hospital, con la beca DMR90140.

Expresamos nuestro agradecimiento al Associate Prof Li Tsai-Chung por su ayuda con los datos estadísticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C. Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16:349-55.
2. Kosloske AM. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;396:2-7.
3. Bauer CR, Morrison JC, Poole WK, et al. A decreased incidence of necrotizing enterocolitis after prenatal glucocorticoid therapy. *Pediatrics.* 1984;73:682-8.
4. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet.* 1990;336:1519-23.
5. Caplan MS, Lickerman M, Adiler L, et al. The role of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 1997;42:779-83.
6. Ewer AK. Role of platelet-activating factor in the pathophysiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl.* 2002;91:2-5.
7. Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Szylit O. Oligofructose and experimental model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Br J Nutr.* 2002;87 Suppl 2:S213-9.
8. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology.* 1999;117:577-83.
9. Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Materli E, Rubaltelli FF. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. A prospective double-blind study. *Biol Neonate.* 2002;82:103-8.
10. Hoyos AB. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in a intensive care unit. *Int J Infect Dis.* 1999;3:197-202.
11. Miller M, Wilks M, Costeloe K. Probiotics for preterm infants? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003;88:F354-8.
12. Walsh MC, Kliegman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis: a practitioner's perspective. *Pediatr Rev.* 1988;9:219-26.
13. Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol.* 2003;8:449-59.

14. Guthrie SO, Gordon PV, Thomas V, Thorp JA, Peabody J, Clark RH. Necrotizing enterocolitis among neonates in the United States. *J Perinatol*. 2003;23:278-85.
15. Dai D, Walker WA. Role of bacterial colonization in neonatal necrotizing enterocolitis and its prevention. *Ahonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*. 1998;39:357-66.
16. Kligman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med*. 1984;310:1093-103.
17. La Gamma EF, Browne LE. Feeding practices for infants weighing less than 1500 g at birth and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol*. 1994;21:271-306.
18. Kosloske AM. A unifying hypothesis for pathogenesis and prevention of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 1990;11(1 pt 2):S68-74.
19. Musmeche CA, Kosloske AM, Bartow SA, Umland ET. Comparative effects of ischemia, bacteria, and substrate on the pathogenesis of intestinal necrosis. *J Pediatr Surg*. 1986;21:536-8.
20. Lawrence G, Bates J, Gaul A. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet*. 1982;1:137-9.
21. Hoy C, Millar MR, MacKay P, Godwin PG, Langdale V, Levene MI. Quantitative changes in faecal microflora preceding necrotizing enterocolitis in premature neonates. *Arch Dis Child*. 1990;65:1057-9.
22. Millar MR, MacKay P, Levene M, Langdale V, Martin C. Enterobacteriaceae and necrotizing enterocolitis. *Arch Dis Child*. 1992;67:53-6.
23. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1999;80:F167-73.
24. Orrhage K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breast-fed infants. *Acta Paediatr*. 1999;80:S47-57.
25. Mattar AF, Drongowski RA, Coran AG, Harmon CM. Effect of probiotics on bacterial translocation in vitro. *Pediatr Surg Int*. 2001;17:265-8.
26. Reid G, Howard J, Siang Gan B. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbio*. 2004;9:424-8.
27. Duffy LC. Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. *J Nutr*. 2000;130 Suppl 2S:432S-6S.
28. Schiffman EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr*. 1997;66:515S-20S.
29. Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, Yuki N, Takayama H, Fujimura M. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1997;76:F101-7.
30. Coconnier MH, Bernet MF, Chauviere G, Servin AL. Adhering heatkilled human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1993;11:235-43.
31. Coconnier MH, Bernet MF, Kerneis S, Chauviere G, Fourniat J, Servin AL. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol Lett*. 1993;110:299-305.
32. Kostiuk OP, Chernyshova LI, Slukvin II. Protective effect of *Lactobacillus acidophilus* on development of infection, caused by *Klebsiella pneumoniae* [in Russian]. *Fiziol Zh*. 1993;39:63-8.
33. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol*. 1999;276:G941-50.
34. Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K, Borenstein MT. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann Intern Med*. 1992;116:353-7.
35. Simchen MJ, Beiner ME, Strauss-Liviatan N, et al. Neonatal outcome in growth-restricted versus appropriately grown preterm infants. *Am J Perinatol*. 2000;17:187-92.
36. Butel MJ, Roland N, Hibert A, et al. Clostridial pathogenicity in experimental necrotizing enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J Med Microbio*. 1998;47:391-9.
37. Caplan MS, Jilting T. Neonatal necrotizing enterocolitis: possible role of probiotic supplementation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30 Suppl 2:S17-22.
38. Millar MR, Linton CJ, Cade A, Glancy D, Hall M, Jalal H. Application of 16S rRNA gene PCR to study bowel flora of preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2506-10.
39. Wagner RD, Warner T, Roberts L, Farmer J, Balish e. Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. *Infect Immun*. 1997;65:3345-51.