

PREBIOTIKA, PROBIOTIKA A SYNBIOTIKA

doc. MUDr. Jiří Nevoral, CSc.

Pediatrická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha

Během posledních 20–30 let byla věnována značná pozornost možnosti zlepšení zdravotního stavu člověka modulací střevní mikroflóry. Střevní mikroflóra má velkou metabolickou aktivitu, mění se během života a je významným faktorem, který ovlivňuje zdraví jedince. Význam těchto mikroorganismů byl dlouhou dobu opomíjen a zájem se soustřeďoval téměř výhradně na patogenní mikroorganismy, které jsou příčinou různých poruch trávicího ústrojí.

Klíčová slova: střevní mikroflóra, prebiotika, probiotika, synbiotika.

PREBIOTICS, PROBIOTICS AND SYNBIOTICS

Major attention was paid within last 20–30 years to the possibility of improving a health status of man by a modulation of intestinal microflora. Intestinal microflora has a great metabolic activity, it changes during life and is an important factor influencing individual's health. The significance of these microorganisms was omitted for a long time and the interest was nearly solely focus on pathogenic microorganisms, which are causes of different gastrointestinal disorders.

Key words: intestinal microflora, prebiotics, probiotics, synbiotics.

Vývoj a složení střevní mikroflóry

Složení střevní mikroflóry je významně ovlivňováno způsobem výživy. U novorozenců, kteří jsou výlučně kojeni, je intestinální flóra složena z laktobacilů a bifidobakterií. Chybí fakultativně anaerobní *E. coli* a striktně anaerobní *Bacteroides fragilis* a *Clostridium species*. Převaha bifidobakterií je způsobena

látkami, které jsou obsaženy v mateřském mléce a selektivně příznivě působí na růst bifidobakterií a laktobacilů (bifidogenní faktor). Tento bifidogenní faktor je v mateřském mléce tvořen převážně oligosacharidy (třetí, kvantitativně největší složka mateřského mléka po laktóze a tucích) a glykoproteiny. Vlivem jejich účinku je mikroflóra s převahou laktobacilů

a bifidobakterií vytvořena během jednoho měsíce. Tvorba kyseliny mléčné jako konečného produktu metabolismu těchto bakterií spolu s působením specifických živin v mateřském mléce, jako jsou laktoferin, kasein a nukleotidy, přispívají k vytvoření prostředí, ve kterém laktobacily a bifidobakterie dobře rostou. Osídlení pokračuje během prvních dnů a týd-

Tabulka 1. Vlastnosti prebiotik

Procházejí horní částí trávicího ústrojí v nezměněné formě, kde se nehydrolyzují ani nevstřebávají
Slouží selektivně určitým bakteriím tlustého střeva jako substrát, který zvyšuje metabolickou aktivitu těchto bakterií nebo podporuje jejich růst
Pozitivně ovlivňují složení střevní mikroflóry tlustého střeva
Mají celkově pozitivní vliv na zdraví a pohodu jedince

Tabulka 3. Nejdůležitější charakteristiky probiotik

Prospěšnost pro zdraví
Schopnost kolonizace a adherence
Antagonistický vliv na patogenní flóru
Schopnost tvorby antimikrobiálních substancí
Schopnost imunomodulace
Měřitelná a klinicky dokumentovatelná užitečnost pro zdraví příjemce
Mikrobiologické bezpečnostní požadavky
Možnost přesného taxonomického zařazení
Humánní původ
Netoxické a nepatogenní
Geneticky stabilní
Schopnost přežít, růst a být metabolicky aktivní v trávicím ústrojí příjemce
Potencionálně resistentní proti antimikrobiálním substancím původní mikroflóry příjemce
Resistentní proti žaludeční kyselině a žlučovým kyselinám
Průmyslové parametry
Stabilita žádaných vlastností během výroby, transportu a skladování
Příznivé organoleptické vlastnosti

nů, stabilizuje se během výlučného kojení do odstavení a zavedení příkrmů nebo použití přípravků kojenecké mléčné výživy. U dětí uměle živěných se vyvíjí mnohem pestřejší střevní mikroflóra, která obsahuje vedle bifidobakterií bakteroidy, enterobakterie, enterokoky a klostidia. Dospělý typ střevní mikroflóry je dosažen ve věku 1–2 let.

Fyziologická funkce normální střevní mikroflóry je součástí obranného mechanismu, který spočívá v kompetitivní inhibici bakteriální adheze patogenních bakterií na sliznici zažívacího ústrojí, v syntéze sloučenin, které inhibují a ničí patogenní bakterie, a v kompetitivní konzumaci živin potřebných pro růst patogenních mikroorganismů.

Fyziologická mikroflóra moduluje rovněž imunitní systém, když působí efektivní stimulaci mikrobiálními antigeny. Ovlivňuje humorální, buněčnou i nespecifickou imunitu, může mít vliv na produkci cytokinů a genovou transkripci.

Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné látky obsažené v potravinách, které **podporují selektivně růst** nebo aktivitu jedné bakterie nebo omezeného počtu střevních bakterií a tím pozitivně ovlivňují složení střevní mikroflóry tlustého střeva, čímž mají celkově pozitivní vliv na zdraví a celkovou pohodu příslušného jedince. Požadavky na prebiotika jsou souhrnně uvedeny v tabulce 1. Oligosacharidy tvoří třetí kvantitativně největší složku mateřského mléka, jejich koncentrace kolísá od 6–12 g/l.

Ve většině případů jsou odvozeny od laktózy. Oligosacharidy mohou chránit kojence živěné mateřským mlékem před bakteriálními a virovými infekcemi, toxiny a plísněmi (20). Tyto rozpustné sacharidy jsou schopné působit jako analoga receptorů na epitelálních buňkách hostitele a tím blokují vazebná místa pro patogenní mikroorganismy. Existují rovněž pozorování, že oligosacharidy v mateřském mléce podporují růst bifidobakterií a omezují růst nevhodných bakterií, hovoříme o jejich bifidogenním účinku. Byl studován bifidogenní účinek směsí oligosacharidů a v této souvislosti byla největší pozornost věnována derivátům inulinu (frukto-oligosacharidy), galakto-oligosacharidům, laktulóze a sojovým oligosacharidům. Na základě výzkumu oligosacharidů v mateřském mléce byla sestavena směs, která obsahuje 90 % galaktooligosacharidů o nízké molekulové hmotnosti a 10 % fruktooligosacharidů o vysoké molekulové hmotnosti. Tato směs byla přidána do mléčného přípravku pro kojence. Donošené děti živěné obohaceným přípravkem měly ve stolici vysoce významně vyšší množství bifidobakterií a laktobacilů ve srovnání s placebem (11). Podobné pozorování bylo učiněno u nedonošených dětí (2). Obohacení kojeneckých přípravků směsí oligosacharidů může proto přispět k dosažení střevní mikroflóry, která se svým složením blíží střevní mikroflóře kojených dětí.

Probiotika

Probiotika jsou mono- nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které po aplikaci

Tabulka 2. Nejčastěji používaná probiotika

Lactobacily
L. acidophilus
L. casei, spec. rhamnosus (Lactobacillus GG)
L. casei Shirota
L. delbrueckii subsp. bulgaricus
L. reuteri
L. brevis
L. cellobiosus
L. curvatus
L. fermentum
L. plantarum 299v
Gram pozitivní koky
Lactococcus lactis subsp. cremoris
Streptococcus salivarius subsp. thermophilus
Enterococcus faecium
S. diacetylactis
S. intermedius
E. coli (sérotyp O83:K24:H1)
Bifidobakterie
B. bifidum
B. adolescentis
B. animalis
B. infantis
B. longum
B. thermophilum
Kvasinkovité mikroorganismy
Saccharomyces boulardii

prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikroflóry. Mezi probiotika jsou v současné době řazeny laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, enterokoky a saccharomyces. Nejčastěji používaná probiotika jsou uvedena v tabulce 2.

Pro zařazení mezi probiotika musí jednotlivé bakteriální kmeny splňovat několik základních požadavků. Bakteriální kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele a musí být zdravotně nezávadné, izolované ze stejného živočišného druhu, jako je předpokládán příjemce, nesmí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je probiotikum do trávicího ústrojí aplikováno, musí obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií, které musí mít schopnost přežít v trávicím ústrojí a být metabolicky aktivní. Bakterie musí být životaschopné během skladování, důležité jsou i chuťové vlastnosti potraviny nebo potravinového doplňku, ve kterých jsou obsaženy. Nejdůležitější charakteristiky probiotik jsou uvedeny v tabulce 3. Kombinace prebiotika s probiotikem se nazývá **synbiotikum**. V synbiotiku je probiotikum kombinováno s prebiotikem, které je pro něj specifické, např. frukto-oligosacharid s kmenem bifidobakterie. Tato kombinace potom přispívá k prodloužení přežití probiotika, pro které je prebiotikum specifickým substrátem vhodným k fermentaci.

Tabulka 4. Mechanizmy možného působení probiotik

Stabilizace střevní flóry kompeticí s patogenními mikroorganismy o vazebná místa na receptorech a o živiny
Produkce mastných kyselin s krátkými řetězci (zvl. kyselina máselná)
Pokles pH střevního obsahu
Zvýšení rozpustnosti minerálních látek
Omezení zpětné resorpce žlučových kyselin
Stabilizace střevní slizniční bariéry, úprava střevní permeability
Produkce antimikrobiálních substancí
Modifikace toxinů a toxinových receptorů
Stimulace imunitní odpovědi na patogeny (zvýšená produkce sekrečních IgA, IgG, IgM, protizánětlivě působících cytokinů IL-10, TGF- β ; snížená produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α , Interferonu- γ stejně jako mediátorů zánětu např. matrix metallopeptidáz).

Mechanismus působení

Probiotika produkují substance, kterými mohou inhibičně působit na G+ a G- bakterie. Mezi tyto látky patří organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny. Snižují nejen počet živých buněk, ale ovlivňují metabolismus bakterií a produkci toxinů.

Některé probiotické kmeny mají schopnost adherovat na střevní epitel a tak kompetitivně

inhibičně blokují adhezni místa pro potencionálně patogenní bakterie. Předpokládá se, že probiotické kmeny mohou také využívat živiny, které by jinak byly spotřebovávány patogenními mikroorganismy. Některá probiotika mají schopnost degradovat receptory pro toxiny na střevní sliznici. Pro preventivní a terapeutické použití probiotik je důležitá jejich schopnost stimulovat specifickou i ne-

specifickou imunitu. Mechanizmy možného působení probiotik jsou shrnuty v tabulce 4.

Probiotika v prevenci a léčbě onemocnění zažívacího ústrojí

Při použití probiotik v prevenci a léčbě různých onemocnění jsou oblasti, ve kterých je jejich účín považován za prokázaný, v jiných oblastech prokázaný není a považuje se za možný. Existuje hodně různých studií, ale není příliš mnoho dobrých dvojité slepých randomizovaných prospektivních studií, které jedinečně mohou prokázat účinek zkoušeného probiotika.

Akutní průjemové onemocnění

Mechanismus, kterým probiotika působí preventivně nebo léčebně, může být prostřednictvím stimulace imunitního systému kompeticí o vazebná místa na střevní sliznici nebo tvorbou bakteriocinů, jako je nisin. Tyto a další mechanismy jsou závislé na typu průjemového onemocnění, a proto mohou být různé u virového průjmu, antibiotiky způsobeného průjmu a u průjmu cestovatelů.

Virové průjemové onemocnění

Metaanalytická studie zaměřená na randomizované kontrolované terapeutické studie s laktobacilem u dětí hodnotila celkem devět studií a ukázala, že při léčbě probiotikem se zkrátí doba průjemového onemocnění v průměru o 0,7 dne (0,3–1,2 dne) a počet stolic se druhý den léčby zmenšil v průměru o 1,6 stolice denně (0,7–2,6) u dětí, které byly léčeny laktobacilem (18). Pozitivní účinek probiotik lze vysvětlit stabilizací střevní mikroflóry a kratším vylučováním rotavirů. Studie ukázaly, že podávání probiotik vede k významnému vzestupu IgA specifických protilátek proti rotavirům v séru pacientů, což naznačuje, že humorální imunita hraje důležitou roli v mechanismu účinku probiotik.

Probiotika byla také použita v prevenci akutní gastroenteritidy u dětí. Specifická IgA odpověď může vysvětlit preventivní účinek probiotik na průjemové onemocnění. V dvojité slepé kontrolované studii hospitalizovaných dětí, které dostávaly normální přípravek kojenecké mléčné výživy a mléko obohacené o *Bifidobacterium bifidum* a *Streptococcus thermophilus*, se ukázalo během více než 17měsíčního sledování, že ve skupině bez probiotik 31 % dětí mělo průjemové onemocnění, zatímco ve skupině s probiotiky pouze 7 % dětí (15). *Lactobacillus casei* GG působil také preventivně proti průjemovým onemocněním u hospitalizovaných dětí (17).

Průjmy cestovatelů

Příčinou průjmu cestovatelů jsou různá agens, ale většinou enterotoxická *E. coli*. Incidence průjemových onemocnění u dospělých cestovatelů do cizích zemí se odhaduje na 20–

40%, záleží na původu cestovatele, způsobu cestování a cíli cesty. K prevenci průjmových onemocnění cestovatelů bylo vyzkoušeno několik probiotik s různými výsledky. *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus fermentum* byly neúčinné, stejně neúčinný byl však i *Lactobacillus casei* GG (12), v jiné studii však účinný byl (5). Existuje studie, ve které bylo použito několik různých kmenů laktobacilů a rozdíl byl statisticky signifikantní ve prospěch jedinců, kteří dostávali probiotika (1).

Průjmová onemocnění po léčbě antibiotiky

Hodnocení pomocí metaanalýzy devíti randomizovaných, dvojité slepých, placebem kontrolovaných studií (dvě byly provedeny na dětech) ukázalo, že probiotika mohou být použita k prevenci průjmového onemocnění při léčbě antibiotiky. *S. boulardii* a laktobacily byly účinné (3). Další studie by však měly brát v úvahu také cenu a skutečnou potřebu použití probiotik v rutinní praxi.

Potravinové alergie

Racionální jádro probiotické terapie u alergických onemocnění je ve vytvoření

mikrobiálního stimulu pro imunitní systém hostitele pomocí živého organismu, který je charakteristický pro střevní mikroflóru zdravého kojence. Smysl léčby probiotiky spočívá v přesměrování imunologické paměti od Th2 fenotypu ještě dříve, než je ustavena imunitní odpověď na antigeny z okolního prostředí. Schopnost probiotik preventivně bránit v rozvoji atopického onemocnění byla nedávno demonstrována v dvojité slepé placebem kontrolované studii, ve které se ukázalo, že u dětí s vysokým rizikem atopického onemocnění, kterým byla probiotika podávána po dobu 6 měsíců se prevalence onemocnění zmenšila na polovinu (23%) v porovnání se skupinou s placebem (46%) (8). Nicméně podávání probiotik nemělo preventivní vliv na alergii na bílkovinu kravského mléka.

Probiotika byla použita také léčebně. Do studie bylo zařazeno 27 kojenců s projevy atopického ekzému, který se manifestoval při plném kojení. Tyto děti v průměrném věku 4,6 měsíce byly převedeny na vysoce hydrolyzovaný preparát, který byl obohacen probiotikem nebo na stejný přípravek bez probiotika. Po dvou měsících děti, které dostávaly probio-

tikum měly výrazné zlepšení ekzému oproti dětem, které dostávaly stejný vysoce hydrolyzovaný přípravek bez probiotik (7).

Přes tato fakta je třeba data podporující oprávněnost probiotické terapie v prevenci alergických onemocnění ještě doplnit. Je třeba získat více informací o dávkách a charakteristických vlastnostech jednotlivých bakteriálních kmenů u atopických onemocnění a potravinové alergie.

Intolerance laktózy

Asi 10–15% dospělé populace má výrazně sníženou aktivitu střevní laktázy a po požití již malého množství laktózy má zažívací potíže. Laktóza je metabolizována bakteriemi a výsledkem je flatulence, průjem, nevolnost, bolesti břicha. Tito lidé lépe snášejí fermentovaná mléka. Jejich efekt se vykládal delší pasáží zažívacím ústrojím a účinkem živých bakterií, které obsahují laktázu. Probiotikum pomocí laktázy, kterou obsahuje, pomáhá štěpit laktózu v tlustém střevě a tak zlepšuje toleranci laktózy. Laktázu produkují laktobacily jako je *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus* v jogurtech (16).

Nespecifická zánětlivá střevní onemocnění

Ačkoliv dlouholetý výzkum nebyl schopen prokázat přímý patogenní vliv infekčních agens, ukazuje se, že komenzální střevní mikroorganismy a jejich produkty působí jako zevní spouštěč, který vyvolává a udržuje nespecifické střevní zánětlivé onemocnění.

Probiotika byla úspěšně zkoušena v léčbě Crohnovy nemoci tlustého střeva. Počet relapsů onemocnění se zmenšil na polovinu ve srovnání s placebem, pokud se probiotikum podávalo během remise (10). V jiné studii byl popsán 6krát nižší výskyt relapsů Crohnovy nemoci u pacientů, kteří byli léčeni kombinací mesalazinu se *Saccharomyces boulardii* ve srovnání s pacienty, kteří byli léčeni samotným mesalazinem (4). Jiná studie však ukazuje, že podávání *Lactobacillus casei* GG nezabránilo recidivě Crohnovy nemoci po chirurgickém výkonu (13).

Existují dvojité slepé placebem kontrolované studie, které prokazují, že probiotika jsou stejně účinná jako mesalazin v udržování remise idiopatické proktokolitidy (9, 14). Probiotika byla zkoušena také u chronické pauchitis. Ve dvojité slepé placebem kontrolované studii bylo zjištěno, že probiotikum významným způsobem snížilo počet relapsů chronické pouchitis.

Použití probiotik v léčbě nespecifických zánětlivých střevních onemocnění není všelékem, ale nadějí ve formě adjuvantní terapie, zvláště k udržování remise onemocnění a přináší rovněž možnost dalšího pochopení patofysiologických mechanismů onemocnění.

Nekrotizující enterokolitida

Nekrotizující enterokolitida je příčinou velké morbidity i mortality nedonošených dětí.

Mechanismy vyvolávající nekrotizující enterokolitidu a její spojení s poškozením střeva nejsou jasné. V současné době se soudí, že ke vzniku nekrotizující enterokolitidy jsou potřeba tři faktory: nedonošenost, enterální výživa a bakteriální kolonizace.

Na základě povzbuzujících studií na zvířatech byla provedena studie na novorozencích, kterým byl podáván *L. acidophilus* a *B. infantis* a osud dětí byl porovnáván s osudem dětí jeden rok předtím, kterým nebyla podávána probiotika. Ve skupině bez probiotik onemocnělo 85 dětí nekrotizující enterokolitidou z nichž 35 zemřelo, zatímco ve skupině s probiotikem onemocnělo 34 dětí a zemřelo pouze 14 dětí (6). Specifický mechanismus účinku probiotik není znám, předpokládá se ovlivnění zánětlivé kaskády, aktivace střevního imunitního systému a zvýšení integrity střevní bariery.

Karcinotvorba

Střevní mikroflóra je schopna ovlivňovat tvorbu karcinomu produkcí enzymů, které mění ve střevě prekarcinogeny v karcinogeny. Tyto enzymy jsou beta-glukuronidáza, azoreduktáza, nitroreduktáza. Některé mikroorganismy jsou však schopny chránit hostitele tím, že tyto enzymatické aktivity tlumí. *Lactobacillus casei* GG, *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* významně snižují množství těchto enzymů ve stolici (nikoliv

jogurtové bakterie). Některé studie na zvířatech ukázaly, schopnost probiotik inhibovat růst nádorových buněk, určité bakterie mají schopnost vázat se na případné karcinogeny (19). Nicméně přehled desítek epidemiologických studií neprokázal významný vliv fermentovaných potravin na incidenci karcinomů. Nutné jsou studie s definovaným typem probiotika.

Bezpečnost probiotik

Dosud používaná probiotika jsou považována za bezpečná a většinou patří mezi nepatogenní komenzální mikroorganismy. Současné znalosti ukazují, že perorální podávání probiotik může být léčebně užitečné u několika onemocnění tím, že nastolí normální střevní mikroflóru. Za prokázaný se má jejich příznivý účín u rotavirových průjemových onemocnění, u průjemových onemocnění způsobených *Clostridium difficile*, u průjemových onemocnění spojených s léčbou antibiotiky a alergických onemocnění. Na druhé straně jejich léčebná užitečnost je dosud zkoumána u nespecifických střevních zánětů, nekrotizující enterokolitidy, cystické fibrózy, bakteriální kontaminace tenkého střeva a funkčních onemocnění trávicího ústrojí. Studium léčebného použití probiotik vyžaduje přísně randomizované, dvojité slepé placebem kontrolované studie.

Literatura

1. Black FT, Anderson PL, Orskov J, et al. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveler's diarrhea. Travel Med, 1989; 7: 333–335.
2. Boehm G, Lidestri M, Casetta, et al. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. Arch Dis Child, 2002; 86: F178–F181.
3. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, et al. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. BMJ, 324, 2002; č. 7350: 1361.
4. Guslandi M, Mezzi G, Dorghi M, et al. *Saccharomyces boulardii* on maintenance treatment of Crohn's disease. Dig. Dis Sci, 2000; 45: 1462–1464.

5. Hilton E, Kolakowski P, Smith M, et al. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrheal preventive in travelers. *J Travel Med*, 1997; 4: 41–43.
6. Hoyos AB. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int J Infect Dis*, 1999; 3: 197–202.
7. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, et al. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*, 2000; 30: 1605–1610.
8. Kalliomaki M, Salminen S, Kero P, et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2001; 357: 1076–1079.
9. Kruis W, Frič P, Stolte M. and the Mutaflor Study Group: Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with *Escherichia coli* Nissle 1917 and standard mesalamine. *Gastroenterology*, 2001; 120: A 127 (Suppl.).
10. Malchow HA. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A novel approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol*, 1997; 25: 653–658.
11. Moro G, Minoli I, Mosca M, et al. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructo-oligosaccharides in formula fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002; 34: 291–295.
12. Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, et al. Prevention of traveller's diarrhea by *Lactobacillus* GG. *Ann Med*, 1990; 22: 53–56.
13. Prantera C. Probiotic Therapy does not prevent Crohn's recurrence after surgery. *Gut*, 2002; 51: 405–409.
14. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey, PM, et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: A randomised trial. *Lancet*, 1999; 354: 635–639.
15. Saavedra JM, Bauman NA, Quang I, et al. Feeding of *bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*, 1994; 344: 1046–1049.
16. Saviano DA, SWmith DE, Lewitt MD. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus cultured milk in lactose-deficient individuals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1984; 40: 119–122.
17. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz J, et al. *Lactobacillus* GG in prevention of diarrhea in hospitalised children. *J Pediatr*, 2001; 138: 361–365.
18. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, et al. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*, 2002; 109: 678–684.
19. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr*, 2001; 73: S451–S455.
20. Zopf D, Roth S. Oligosaccharides anti-infective agents. *Lancet*, 1996; 347: 1017–1021.