

Zaznělo na VI. kongrese pediatriů a dětských sester

Hradec Králové, 31. května – 1. června 2019



Význam synbiotik při prevenci alergií

MUDr. Nabil El-Lababidi

Centrum dětské gastroenterologie, hepatologie a výživy, Klinika dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK, Praha

Vývoji a změnám střevní mikrobioty v souvislosti s rozvojem alergií u dětí se ve své přednášce na VI. kongresu pediatrie pro praxi na přelomu května a června 2019 věnoval Dr. El-Lababidi. Připomněl význam plného kojení v prvních 4 měsících života v prevenci alergií a ukázal, že u dětí, kde je nutná umělá mléčná výživa, je přínosem podávání parciálních hydrolyzátů, jejichž ochranný efekt před rozvojem alergií potencují synbiotika. Podle posledních poznatků by synbiotika mohla také zmírňovat projevy již vytvořené alergie na bílkovinu kravského mléka nebo atopického ekzému.

Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty

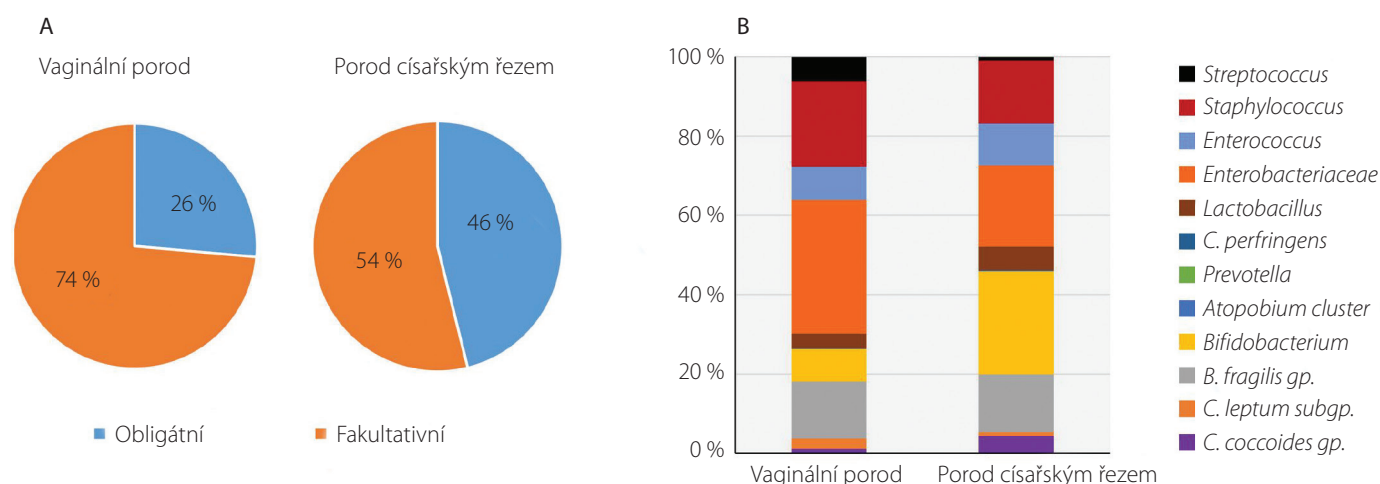
Plocha sliznice gastrointestinálního traktu (GIT) u člověka představuje 250–400 m². Jde o jednu z největších ploch interakce mezi jedincem a antigeny. V průběhu života projde GIT v průměru 60 tun stravy, která rozhodně není sterilní. Počet mikroorganismů ve střevě je odhadován na > 10¹⁴ (1). Počet bakterií

ve střevě zhruba odpovídá počtu lidských buněk (2).

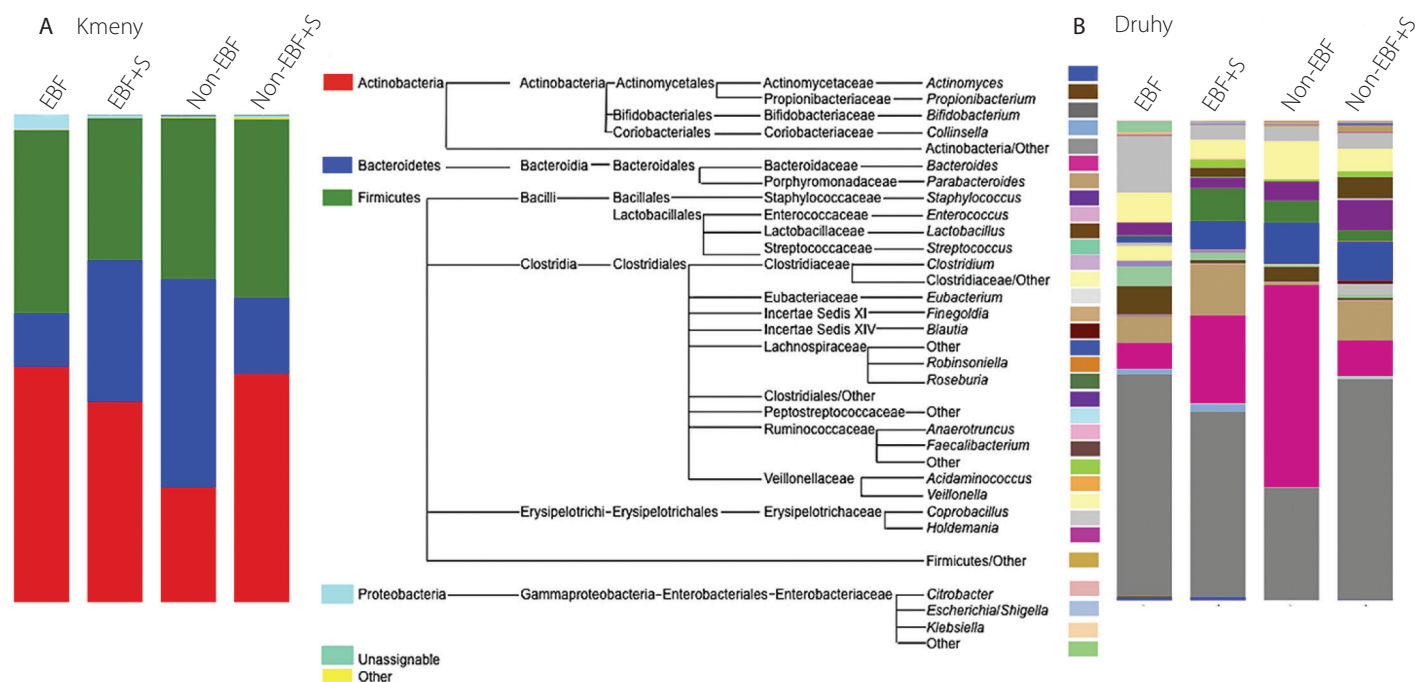
Složení střevní mikrobioty se mění v průběhu života (3). K osídlování dochází již v průběhu těhotenství, postupně se zvyšuje množství a počet druhů. Kolem 3. roku věku dítěte je dosaženo množství a pestrosti střevních bakteriálních kmenů jako u dospělých. Složení střevní mikrobioty je dáno způsobem porodu, gestačním stářím plodu

při porodu, kojení, zeměpisnou oblastí, počtem členů domácnosti, věkem při zavedení příkrmů aj. (4). U poševně narozených dětí bylo v mekoniu zjištěno větší množství fakultativních kmenů bakterií než u dětí narozených císařským řezem (Graf 1) (5). Podle způsobu porodu se liší i složení mikrobioty v ústech novorozenců. Příznivější je u vaginálně narozených dětí (6). Složení střevní mikrobioty je jiné u výhradně kojených dětí

Graf 1. Porovnání střevní mikrobioty novorozence v mekoniu dle způsobu narození. Převzato a modifikováno z Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T et al.: Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term infants Born Vaginally or by Cesarean Section, *Front Microbiol* 2016; 7:1997

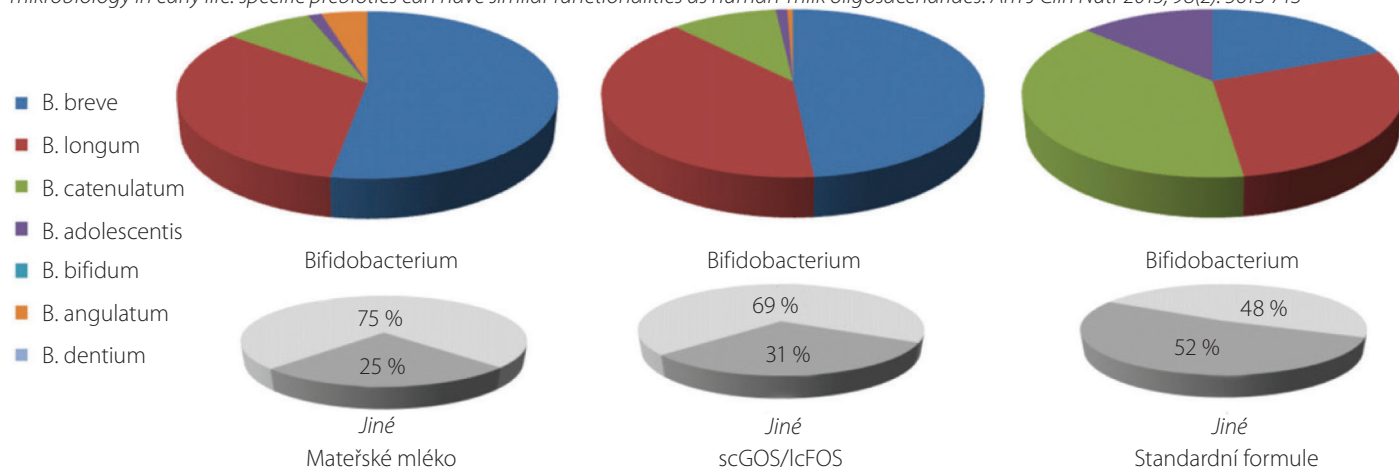


Graf 2. Porovnání složení střevní mikrobioty kojence dle způsobu výživy. Převzato a modifikováno z Thompson AL, Monteagudo-Mera A, Cadenas MB et al.: Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. *Front Cell Infect* 2015; 5:3



EBF – vylučné kojení, EBF+ S – kojení + příkrmy, Non-EBF – výživa formulí, Non-EBF + S – výživa formulí + příkrmy

Graf 3. Efekt přidání prebiotik do formulí na složení střevní mikrobioty kojence. Převzato a modifikováno z Oozer R, van Limpt K, Ludwig T et al. *Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides*. *Am J Clin Nutr* 2013; 98(2): 561S-71S



scGOS – galaktooligosacharidy s krátkým řetězcem
lcFOS – fruktooligosacharidy s dlouhým řetězcem

a u dětí s mléčnými příkrmy či na umělé mléčné výživě (Graf 2). K výrazné změně střevní mikrobioty dochází po zavedení nemléčného příkrmu – klesá počet kmenů Firmicutes a aktinobakterií a stoupá zastoupení bakterií rodu Bacteroides (7). Porovnání střevní mikrobioty evropských dětí a dětí z africké vesnice Burkina Faso, kde převažuje rostlinná strava, ukázalo významně vyšší zastoupení Firmicutes u evropských dětí a naopak převažující zastoupení Bacteroides u dětí z Afriky (8). Tento fakt má klinický dopad. Africké děti jsou v důsledku toho mnohem méně náchylné ke

střevním infekcím (vyvolaných kmeny *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*) než evropské děti. Bylo rovněž zjištěno, že objem i diverzitu střevní mikrobioty významně zvyšuje pobyt dítěte v jeslích (7). Tento příznivý vliv je dán kontaktem s větším počtem osob.

Vytvořenou rovnováhu střevní mikrobioty může ovlivnit řada faktorů. Na prvním místě stojí antibiotika, která snižují množství i diverzitu střevních bakterií (9, 10). Velmi nežádoucí dopad na střevní mikrobiotu má opakované podávání antibiotik (11). Nepříznivě na střevní

mikrobiotu působí také léčba inhibitory protonové pumpy, které snižují kyselost žaludku (12). Rovnováhu střevní mikrobioty narušuje také nadměrný příjem cukrů, bílkovin a nasycených mastných kyselin. Důsledkem mohou být záněty střev, průjemy, inzulinová rezistence, zvýšené kardiovaskulární riziko či pokles kognitivních funkcí. Naopak příjem vlákniny a probiotik působí na střevní mikrobiotu příznivě. Výsledkem je snížené riziko infekcí, lepší metabolismus tuků, zvýšení inzulinové senzitivity či menší riziko střevních zánětů (12).

Střevní dysbióza

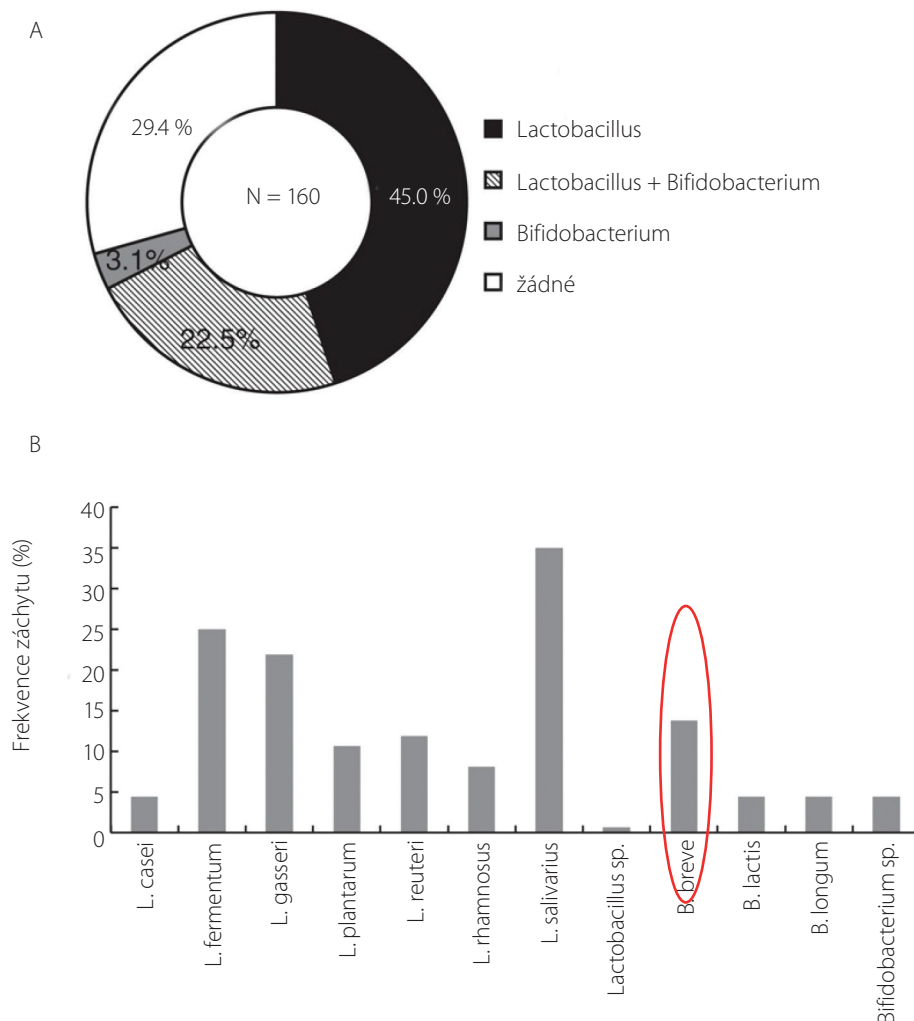
Při poruše rovnováhy střevní mikrobioty hovoříme o střevní dysbióze. Bakteriální osídlení střeva lze rozdělit na kmeny žijící s makroorganismem v symbióze, na komenzály a na patogenní mikroorganismy (13). Poslední výzkum ukazuje odlišné složení střevní mikrobioty u zdravého člověka a u osob s různými chorobami, jako jsou nespecifické střevní záněty (15), diabetes 2. typu či nekrotizující enterokolitida (14). Z těchto poznatků vychází i terapeutické využití transplantace střevní mikrobioty. Podobná zjištění byla učiněna i u výskytu plicních chorob, jako je astma, chronická obstrukční plicní nemoc nebo cystická fibróza, v souvislosti se změnou mikrobiálního osídlení dýchacích cest (16). Je rovněž známo, že složení střevní mikrobioty se liší také u štíhlých a u obézních osob (17).

Prebiotika, probiotika a synbiotika

Prebiotika představují substrát, který využívá mikrobiota ke svému růstu. Mají pozitivní efekt na GIT, kardiovaskulární systém, mentální zdraví, kosti aj. (18). Probiotika jsou živé mikroorganismy, jejichž přítomnost ve střevě má příznivý zdravotní vliv na makroorganismus (19, 20). Synbiotika pak představují kombinaci prebiotik a probiotik. Zlepšují přežití a implantaci mikrobiálních nutričních přísad za účelem stimulace růstu nebo aktivace metabolismu vybraného kmene nebo úzce vymezené skupiny bakterií prospěšných pro zdraví (21). Mezi prokázané přínosy prebiotik patří prevence maligních nádorů, zvýšení pocitu sytosti, zvýšení dostupnosti minerálů, laxativní účinek a imunomodulace. Probiotika zlepšují zdraví střev, zmírňují intoleranci laktózy, mají protizánětlivý a imunomodulační efekt, zvyšují hladinu HDL cholesterolu, působí preventivně proti maligním nádorům a pomáhají v boji s infekcí (21).

Studie, (22) která hodnotila složení střevní mikrobioty u kojenců podle typu konzumovaného mléka, ukázala zastoupení bifidobakterií 75 % u plně kojených dětí a pouze 48 % u dětí na umělé mléčné výživě. Přidání prebiotik do umělé mléčné stravy (galaktooligosacharidy s krátkým řetězcem [scGOS] a fruktooligosacharidy s dlouhým řetězcem [lcFOS]) vedlo ke zvýšení zastoupení bifidobakterií na 69 %, což se blíží plně kojeným dětem (Graf 3). scGOS a lcFOS se velikostí, vazbami a prebiotickými funkcemi nejvíce přibližují lidským oligosacha-

Graf 4. Zastoupení bifidobakterií a laktobacilů v mateřském mléce. Převzato a modifikováno z Soto A, Martín V, Jimenez E et al. *Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk: Influence of Antibiotherapy and Other Host and Clinical factors.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2014; 59(1): 78–88



ridům mateřského mléka. Jejich směs v poměru 9 : 1 přibližuje konzistenci stolice uměle živěných kojenců stolici plně kojených dětí (23), snižuje incidenci kolik u uměle živěných kojenců (24), u zvířecích modelů prokázala ochranný účinek proti rotavirům (25, 26) a rovněž příznivě působí na rozvoj fyziologické mikrobioty batolat zvýšením množství bifidobakterií (27).

Je potřeba si uvědomit, že mateřské mléko rozhodně není sterilní, přičemž mléko každé matky má unikátní bakteriální osídlení. V mateřském mléce byly prokázány stafylokoky, streptokoky, pseudomonády a další bakterie považované za patogeny (28). Zastoupeny jsou zde ale také probiotické kmeny. Analýza mateřského mléka prokázala u 45 % matek výskyt laktobacilů, u 22,5 % výskyt laktobacilů a bifidobakterií a u 3 % přítomnost bifidobakterií. Z laktobacilů byl nejvíce zastoupen *L. salivarius* a bifidobakterií *B. breve*, dále *B. adolescentis* a *B. bifidum* (Graf 4) (29).

Bifidobakterie jsou považovány za bezpečné probiotikum (30). Bylo prokázáno, že inhibují rotaviry in vitro a ochraňují buňky před infekcí (31). Významně zkracují dobu trvání průměrně vyvolaných antibiotiky u kojenců (32), snižují výskyt nekrotizující enterokolitidy u nedonošených dětí (narozených do 34. gestačního týdne a pravděpodobně i do 28. týdne), 34 zřejmě dokáží udržet ulcerózní kolitidu v remisi (35, 36) a upravují pravidelnost defekace (37, 38, 39).

B. breve je u zvířecích modelů nejsilnějším antialergickým kmenem (40). V experimentech u zvířat vedly kmeny této bakterie k potlačení imunitní reakce vyvolané Th2 lymfocyty, snížení tvorby IgE a modulaci rovnováhy Th1/Th2 (41). Nedávno provedená klinická studie prokázala, že perorální suplementace kojenců s alergií na bílkovinu kravského mléka (ABKM) a atopickým ekzémem bifidobakteriemi vede ke zvýšení jejich výskytu ve stolici a k možnému zmírnění alergických projevů (42).

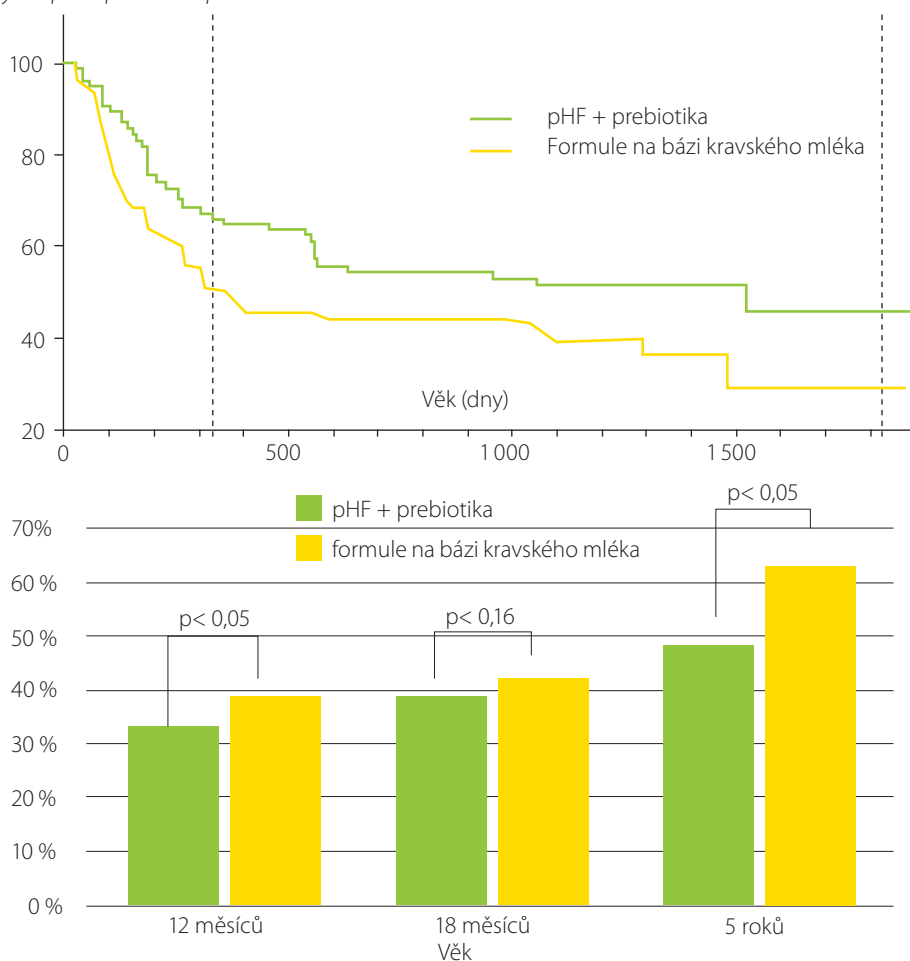
Prevence alergií u dětí

Počet příbuzných s alergií zvyšuje pravděpodobnost vzniku alergie u dítěte. Při prvním kontaktu makroorganismu s antigenem rozhoduje imunitní systém o tom, zda bude danou látku považovat za neškodnou (tolerance), nebo zda si vůči ní rozvine imunitní reakci (senzitivace). Z pásma tolerance je možné v průběhu života přejít do pásma senzitivace a naopak, což je snahou při léčbě alergií. Ideální prevencí rozvoje alergií u dětí je výlučné kojení po dobu prvních 4 měsíců života (43). Pokud dítě nemůže být kojeno, jsou doporučeny hypoalergenní formule umělé mléčné stravy (parciální hydrolyzáty, pHF) (43). Studie, která hodnotila efekt přidání prebiotik do pHF v prevenci rozvoje ekzému u rizikových dětí, zjistila, že pokud není nemléčný přírůstek podáván před ukončením 4. měsíce života, přidaná prebiotika významně snižují riziko výskytu alergií, zejména atopického ekzému, a to v 1 roce věku i v 5 letech věku (Graf 5) (44). V poslední době se také ukazuje, že je možné využít imunomodulačního efektu prebiotik a probiotik k navození tolerance.

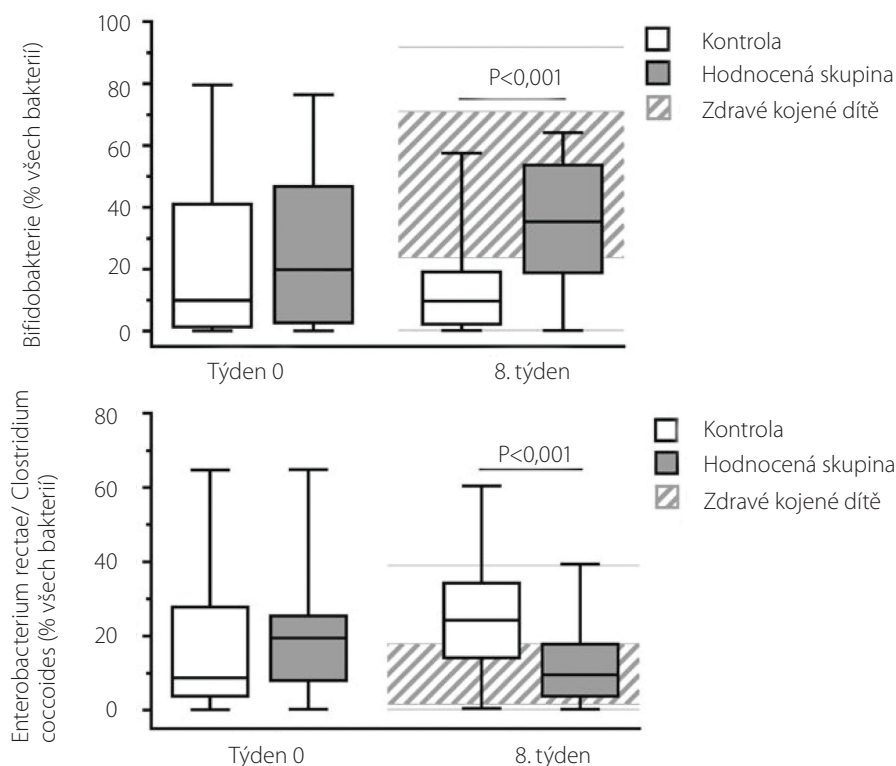
Alergie na bílkovinu kravského mléka

Prevalence alergie na bílkovinu kravského mléka (ABKM) činí celosvětově 2–5 % (45) a stále narůstá (46). U řady dětí dnes přetrvává až do školního věku i déle (47), přičemž závažnost alergických reakcí se zvyšuje (48). Podle doporučených postupů ESPGHAN (49) je u dětí s anafylaxií nebo jasnou časnou alergickou reakcí třeba nasadit eliminační dietu a stanovit protilátky IgE. Pokud jsou protilátky pozitivní, pokračuje eliminační dieta, pokud jsou negativní, přistoupí se po eliminaci ke standardizovanému expozičnímu testu. Jeho pozitivita je pak indikací k dodržování eliminační diety. U dětí bez jasné alergické reakce je na místě diagnostický eliminační test, který musí být dostatečně dlouhý. Jsou-li přítomny časné příznaky (zvracení, atopický ekzém), měl by test trvat 1–2 týdny, v případě pozdních příznaků (průjem, zácpa) pak 2–4 týdny. Pokud během testu příznaky ustoupí, pokračujeme standardizovaným expozičním testem. Pokud příznaky přetrvávají, eliminační dieta není na místě a problém zřejmě nespočívá v alergii na bílkovinu kravského mléka.

Graf 5. Porovnání procenta dětí bez ekzému v případě výživy formule na bázi kravského mléka a při výživě pHF s přidáním prebiotik



Graf 6. Efekt přidání synbiotik do formulí na bázi aminokyselin na zastoupení bifidobakterií, eubakterií a klostridií. Převzato a modifikováno z Candy DCA, Van Ampting MTJ, Oude Nijhuis MM et al. A synbiotic-containing amino-acid-based formula improves gut microbiota in non-IgE-mediated allergic infants. *Pediatr Res* 2018; 83(3): 677–686



Analýza složení střevní mikrobioty u dětí s ABKM a zdravých dětí ukázala výrazně nižší zastoupení bifidobakterií u dětí s alergií a více kmenů klostridií a eubakterií (50). Studie z roku 2018 prokázala, že přidání synbiotik do aminokyselinových formulí vede u dětí s ABKM po 8 týdnech ke zvýšení zastoupení bifidobakterií ve střevní mikrobiotě a ke snížení podílu eubakterií a klostridií (Graf 6) (51).

Závěr

Dle dnešních poznatků se zdá, že změny ve střevní mikrobiotě se podílejí na rozvoji řady neinfekčních onemocnění včetně alergií. Ideální prevencí vzniku alergie u dětí je výhradní kojení po dobu alespoň 4 měsíců. Pokud dítě nemůže být kojeno, jeví se jako nejlepší možnost parciální hydrolyzáty. Ochranný efekt parciálních hydroly-

zátů před rozvojem alergií by mohla potencionovat synbiotika. Dnes se jeví jako pravděpodobné, že synbiotika mohou urychlit odeznění alergických projevů včetně ABKM a atopického ekzému.

Tento článek vznikl s podporou grantu Ministerstva zdravotnictví ČR RVO VFN 64165/2012

LITERATURA

1. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut flora. *Biochem J*. 2017; 474(11): 1823–1836.
2. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016; 14(8): e1002533.
3. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, et al. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2: 104.
4. Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities and health Implications of the Infant Gut Microbiota. 2017; 81(4): e00036–17.
5. Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, et al. Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term Infants Born Vaginally or by Cesarean Section. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1997.
6. Li H, Wang J, Wu L, et al. The impacts of delivery mode on infant's oral microflora. *Sci Rep*. 2018; 8: 11938.
7. Thompson AL, Monteagudo-Mera A, Cadenas MB, et al. Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. *Front Cell Infect*. 2015; 5: 3.
8. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paolo M, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107(33): 14691–14696.
9. Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*. 2013; 62(11): 1591–1601.
10. Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Invest*. 2014; 124(10): 4212–4218.
11. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108(Suppl 1): 5665–5671.
12. Valdes AM, Walter J, Segal E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018; 361: k2179.
13. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(5): 313–323.
14. Blum HE. The human microbiome. *Adv Med Sci*. 2017; 62(2): 414–420.
15. Haberman Y, Tickle TL, Dexheimer PJ, et al. Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *J Clin Invest*. 2014; 124(8): 3617–3633.
16. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(12): 827–835.
17. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol*. 2015; 15: 100.
18. Pineiro M, Asp NG, Macfarlane S, et al. FAO Technical meeting on prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2008; 42 Suppl 3 Pt 2: S156–S159.
19. Macek DR. Probiotics-mixed messages. *Can Fam Physician*. 2005; 51: 1455–1457.
20. Fijan S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of recent Literature. *Int J Environ Res Pu-*

- blic Health. 2014; 11(5): 4745–4767.
21. Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics – a review. *J Food Sci Technol*. 2015; 52(12): 7577–7587.
22. Oozar R, van Limpt K, Ludwig T, et al. Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. *Am J Clin Nutr*. 2013; 98(2): 561S–571S.
23. Herrera AR, Ludwig T, Bouritius H, et al. OP-18 The combination of scGOS/lcFOS and fermented infant formula softens stools of infants compared to unfermented infant formula without scGOS/lcFOS. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 61(4): 516–517.
24. Vanderplas Y, Ludwig T, Bouritius H, et al. Randomised controlled trial demonstrates that fermented infant formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides reduces the incidence of infantile colic. *Acta Paediatr*. 2017; 106(7): 1150–1158.
25. Rigo-Ardover M, Saldaña-Ruiz S, van Limpt K, et al. A combination of scGOS/lcFOS with Bifidobacterium breve M-16 V protects suckling rats from rotavirus gastroenteritis. *Eur J Nutr*. 2017; 56(4): 1657–1670.
26. Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Knipping K, et al. Supplementation With 2'-FL and scGOS/lcFOS Ameliorates Rotavirus-Induced Diarrhea in Suckling Rats. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8: 372.
27. Kosuwon P, Lao-Araya M, Uthaisangsook S, et al. A synbiotic mixture of scGOS/lcFOS and Bifidobacterium breve M-16 V increases faecal Bifidobacterium in healthy young children. *Benef Microbes*. 2018; 9(4): 541–552.
28. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*. 2011; 6(6): e21313.
29. Soto A, Martín V, Jimenez E, et al. Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk: Influence of Antibiotic Therapy and Other Host and Clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014; 59(1): 78–88.
30. Martín R, Jiménez E, Heilig H, 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(4): 965–969.
31. Picard C, Fioramonti J, Francois A, et al. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005; 22(6): 495–512.
32. Chenoll E, Rivero M, Codoñer FM, et al. Complete Genome Sequence of Bifidobacterium longum subsp. infantis Strain CECT 7210, a Probiotic Strain Active against Rotavirus Infections. *Genome Announc*. 2015; 3(2): e00105–e00115.
33. Corrêa NB, Péret Filho LA, Penna FJ, et al. A randomized formula controlled trial of Bifidobacterium lactis and Streptococcus thermophilus for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infant. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39(5): 385–389.
34. Patole SK, Rao SC, Keil AD, et al. Benefits of Bifidobacterium breve M-16 V Supplementation in Preterm Neonates – A Retrospective Cohort Study. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0150775.
35. Venturi A, Gionchetti P, Rozello F, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999; 13(8): 1103–1108.
36. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, et al. Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel disease. *J Gastro-*

- enterol Hepatol. 2000; 15(5): 489–493.
37. Marteau P, Cuillerier E, Meance S, et al. Bifidobacterium animalis strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002; 16(3): 587–593.
38. Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, et al. Effect of a fermented milk containing Bifidobacterium animalis DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 26(3): 475–486.
39. Meance S, Cayuela C, Turchet P, et al. A fermented milk with a Bifidobacterium probiotic strain DN-173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. *Microb Ecol Health, Dis*. 2011; 13: 217–222.
40. Hougee S, Vriesema AJ, Wijering SC, et al. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010; 151(2): 107–117.
41. Inoue Y, Iwabuchi N, Xiao JZ, et al. Suppressive effects of bifidobacterium breve strain M-16 V on T-helper type 2 immune responses in a murine model. *Biol Pharm Bull*. 2009; 32(4): 760–763.
42. Taniuchi S, Hattori K, Yamamoto A, et al. Administration of Bifidobacterium to infants with atopic dermatitis: Changes in fecal microflora and clinical symptoms. *J Appl Res*. 2005; 5(2): 387–396.
43. Host A, Koletzko B, Dreborn S, et al. Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. *Arch Dis Child*. 1999; 81: 80–84.
44. Boyle RJ, Tang ML, Chiang WC, et al. Prebiotic-supplemented partially hydrolysed cow's milk formula for the prevention of eczema in high-risk infants: a randomized controlled trial. *Allergy*. 2016; 71(5): 701–710.
45. Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010; 21 Suppl 21: 1–125.
46. Prescott SL, Pawankar R, Allen KJ, et al. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organ J*. 2013; 6(1): 21.
47. Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, et al. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120(5): 1172–1177.
48. Nocerino R, Leone L, Cosenza L, et al. Increasing rate of hospitalizations for food-induced anaphylaxis in Italian children: An analysis of the Italian Ministry of Health Database. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 135(3): 833–835.
49. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, et al. Diagnostic Approach and Management of Cow's-Milk Protein Allergy in infants and Children: ESPGHAN GI Committee Practical Guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012; 55: 221–229.
50. Thompson-Chagoyan OC, Vieites JM, Maldonado J, et al. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy – a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010; 21(2 Pt 2): e394–400.
51. Candy DCA, Van Ampting MTJ, Oude Nijhuis MM, et al. A synbiotic-containing amino-acid-based formula improves gut microbiota in non-IgE-mediated allergic infants. *Pediatr Res*. 2018; 83(3): 677–686.