



ARTIGO ORIGINAL

A double-blinded randomized trial on growth and feeding tolerance with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in formula-fed preterm infants[☆]



Lingfen Xu^a, Yun Wang^b, Yang Wang^a, Jianhua Fu^a, Mei Sun^a, Zhiqin Mao^{a,*}
e Yvan Vandenplas^c

^a Departamento de Pediatria, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang, China

^b Departamento de Pediatria, Qingdao Women and Children's Hospital, Qingdao, China

^c UZ Brussel, Departamento de Pediatria, Vrije Universiteit Brussel, Bruxelas, Bélgica

Recebido em 21 de maio de 2015; aceito em 10 de agosto de 2015

KEYWORDS

Feeding
(in)tolerance;
Growth;
Necrotizing
enterocolitis;
Preterm infant;
Probiotic;
Sepsis

Abstract

Objective: The use of probiotics is increasingly popular in preterm neonates, as they may prevent necrotizing enterocolitis (NEC) sepsis and improve growth and feeding tolerance. There is only limited literature on *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (*S. boulardii*) in preterm infants.

Method: A prospective, randomized, case-controlled trial with the probiotic *S. boulardii* (50 mg/kg twice daily) was conducted in newborns with a gestational age of 30 to 37 weeks and a birth weight between 1,500 to 2,500 g.

Results: 125 neonates were enrolled; 63 in the treatment and 62 in the control group. Weight gain (16.14 ± 1.96 vs. 10.73 ± 1.77 g/kg/day, $p < 0.05$) and formula intake at maximal enteral feeding (128.4 ± 6.7 vs. 112.3 ± 7.2 mL/kg/day, $p < 0.05$) were significantly higher in the intervention group. Once enteral feeding was started, the time needed to reach full enteral feeding was significantly shorter in the probiotic group (0.4 ± 0.1 vs. 1.7 ± 0.5 days, $p < 0.05$). There was no significant difference in sepsis. NEC did not occur. No adverse effects related to *S. boulardii* were observed.

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.08.013>

[☆] Como citar este artigo: Xu L, Wang Y, Wang Y, Fu J, Sun M, Mao Z, et al. A double-blinded randomized trial on growth and feeding tolerance with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in formula-fed preterm infants. J Pediatr (Rio J). 2016;92:296–301.

* Autor para correspondência.

E-mail: maozq@sj-hospital.org (Z. Mao).

PALAVRAS-CHAVE

(In)Tolerância de alimentação;
Crescimento;
Enterocolite necrosante;
Neonato prematuro;
Probiótico;
Sepse

Conclusion: Prophylactic supplementation of *S. boulardii* at a dose of 50 mg/kg twice a day improved weight gain, improved feeding tolerance, and had no adverse effects in preterm infants > 30 weeks old.

© 2016 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Ensaio duplo-cego randomizado sobre crescimento e tolerância de alimentação com a *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 em neonatos prematuros alimentados com fórmula

Resumo

Objetivo: O uso de probióticos está cada vez mais popular em neonatos prematuros, já que podem prevenir a enterocolite necrosante (ECN) e a sepse e aumentar o crescimento e a tolerância de alimentação. Há apenas uma literatura limitada sobre a *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (*S. boulardii*) em neonatos prematuros.

Método: Um ensaio de caso-controle prospectivo randomizado com o probiótico *S. boulardii* (50 mg/kg duas vezes por dia) foi feito com recém-nascidos com idade gestacional de 30 a 37 semanas e peso ao nascer entre 1.500 e 2.500 g.

Resultados: Foram incluídos 125 neonatos, 63 no grupo de tratamento e 62 no de controle. O ganho de peso ($16,14 \pm 1,96$ em comparação com $10,73 \pm 1,77$ g/kg/dia, $p < 0,05$) e a ingestão de fórmula com nutrição enteral máxima ($128,4 \pm 6,7$ em comparação com $112,3 \pm 7,2$ mL/kg/dia, $p < 0,05$) foram significativamente maiores no grupo de intervenção. Assim que a nutrição enteral foi iniciada, o tempo necessário para atingir a nutrição enteral completa foi significativamente menor no grupo probiótico ($0,4 \pm 0,1$ em comparação com $1,7 \pm 0,5$ dia, $p < 0,05$). Não houve diferença significativa em sepse. Não ocorreu ECN. Não foi observado efeito colateral relacionado à *S. boulardii*.

Conclusão: A suplementação profilática de *S. boulardii* em uma dose de 50 mg/kg duas vezes por dia melhorou o ganho de peso, aumentou a tolerância de alimentação e não teve efeito colateral em neonatos prematuros > 30 semanas de idade.

© 2016 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A função da barreira gastrointestinal (GI), a motilidade intestinal, a imunidade da mucosa e a capacidade digestiva/de absorção são significativamente subdesenvolvidas no neonato prematuro.¹ Os neonatos prematuros apresentam um risco maior de desenvolver crescimento deficiente, infecções hospitalares e enterocolite necrosante (ECN) e de desenvolver uma microbiota intestinal diferente de neonatos amamentados de forma saudável.^{1,2} Essa está relacionada a uma maior incidência de parto cesáreo, redução da exposição à microbiota materna, aumento da exposição a organismos que colonizam unidades de terapia intensiva neonatais (UTINs), (várias rodadas de) antibióticos e atraso na nutrição enteral.³ É debatida uma função dos probióticos no cuidado de recém-nascidos prematuros. Os probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, concedem benefícios à saúde do hospedeiro".⁴ Embora os relatos de aumento do crescimento e redução da incidência de ECN sejam animadores, muitos aspectos sobre os mecanismos de ação ainda não são claros.^{5,6} Os estudos usam diferentes cepas e dosagens, dificultam conclusões baseadas em evidências.⁵⁻⁷

Até agora, os pesquisadores normalmente selecionaram cepas pertencentes a espécies bacterianas naturalmente presentes na flora intestinal, como os lactobacilos ou bifidobactérias.⁸ A *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (*S. boulardii*) é uma levedura probiótica isolada da casca de frutas como lichias, produzidas na Indochina.⁹ A *S. boulardii* foi mal estudada em neonatos prematuros e com baixo peso ao nascer. O objetivo deste estudo foi avaliar se a *S. boulardii* administrada em recém-nascidos prematuros alimentados com fórmulas com menos de 30 semanas de idade gestacional melhoraria o ganho de peso e o resultado clínico.

Métodos**Inclusão de pacientes**

Neonatos prematuros estáveis alimentados com fórmula e internados na UTIN do Hospital Shengjing da Universidade de Medicina da China em Shenyang (China) foram incluídos nesse estudo prospectivo duplo-cego randomizado controlado feito de abril a julho de 2013. O consentimento informado foi obtido dos responsáveis pelos neonatos. O

protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário.

O tamanho da amostra havia sido calculado antes do início do estudo para um nível de significância $p < 0,05$ (bilateral) com uma potência de 80% ($\beta = 0,2$) para estimar o tamanho da amostra necessário, com desvio padrão de ganho de peso de 9 g/dia em ambos os grupos e uma diferença no ganho de peso de 5 g/dia entre os dois grupos. Isso resultou em um tamanho da amostra de 125 neonatos, considerando uma taxa de desistência de 20%.

Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram neonatos nascidos no hospital alimentados com fórmula com idade gestacional de 30 a 37 semanas e peso ao nascer entre 1.500 e 2.500 g.

Os critérios de exclusão foram patologias neonatais graves, como complicações graves no nascimento, malformações GI, anomalias cromossômicas, imunodeficiência conhecida, hidropsia fetal, cateter venoso central, antifúngicos e probióticos. Todos os pacientes incluídos receberam nutrição parenteral e/ou fórmula para prematuros. Nenhum neonato recebeu leite materno. A nutrição enteral ou trófica mínima foi iniciada assim que possível, com 1 mL/kg/dia. A nutrição enteral mínima é a prática de fornecer como alimentação um pequeno volume de alimentos enterais para estimular o desenvolvimento do trato GI imaturo do neonato prematuro; isso melhora a atividade da enzima GI, a liberação de hormônios, o fluxo sanguíneo, a motilidade e a flora microbiana. Os benefícios clínicos incluem melhoria na tolerância ao leite, maior crescimento pós-natal, redução da sepse sistêmica e menor tempo de internação.¹⁰ Assim que a nutrição enteral mínima foi tolerada, o paciente foi aleatoriamente alocado para um de dois grupos à razão de 1/1 (*S. boulardii* ou grupo de controle). A randomização foi feita de acordo com uma ordem de alocação aleatória determinada por computador e levou em consideração o peso ao nascer. O volume da alimentação foi aumentado quando bem tolerado de acordo com o protocolo local.

Intervenção

O grupo de intervenção recebeu *S. boulardii* CNCM I-745, administrada duas vezes por dia como medicação separada, não misturada com a fórmula, a uma dose de 50 mg/kg (Bioflor®; CMS Shenzhen Kangzhe Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen, China, fabricado pela Biocodex, Paris, França); 50 mg são cerca de 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC)). A dose do probiótico foi obtida de estudos anteriores em neonatos.¹¹ Nada foi administrado no grupo de controle. O período do estudo se encerrava no 28º dia após o nascimento ou quando o neonato recebia alta hospitalar, caso fosse possível, mais cedo. Contudo, a duração mínima da intervenção era de pelo menos sete dias. Foram coletados dados observacionais e clínicos de rotina de todos os neonatos. O estudo cego foi possível porque a equipe de enfermagem que administrou a *S. boulardii* aos neonatos não estava envolvida no cuidado diário e a equipe de

atendimento neonatal não estava ciente das atribuições de randomização.

Resultado

Os resultados primários foram parâmetros de crescimento de curto prazo: ganho de peso (g/kg/dia) e crescimento linear (cm/semana). Os resultados secundários incluíam: dias de nutrição parenteral necessários para alcançar a nutrição enteral completa, volume tolerado de nutrição enteral máxima (mL/kg/dia) e duração da internação (dias). A intolerância de alimentação foi definida quando o vômito e os resíduos gástricos foram considerados muito importantes. As complicações foram definidas como incidência de ECN (definida como suspeita ou estágio de Bell positivo II ou superior) e sepse (definida como hemocultura positiva).⁹

Estatísticas – Registro

Os dados foram coletados e incluídos em uma base de dados estatística (SPSS, versão 16.0, IBM, Armonk, EUA). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados demográficos e variáveis de procedimento foram analisados com o teste *t* ou teste qui-quadrado. Foi considerado que um valor de $P < 0,05$ indica uma diferença estatisticamente significativa. Este estudo não foi financiado por fontes externas e foi registrado no website <https://clinicaltrials.gov> com o número NCT02310425.

Resultados

Descrição do paciente

Foram alimentados com fórmula 125 neonatos prematuros inscritos e aleatoriamente alocados; 63 pacientes receberam *S. boulardii* assim que puderam tolerar a nutrição enteral mínima e 62 neonatos foram incluídos no grupo de controle; 25 (20%) pacientes foram considerados desistentes (12 (19,1%) no grupo que recebeu *S. boulardii* e 13 (20,1%) no grupo de controle (fig. 1). Os motivos para desistência foram retirada do consentimento ($n=9$), perda no acompanhamento ($n=11$), cateter venoso central ($n=1$), sífilis congênita ($n=1$) e inclusões inadequadas (artresia intestinal congênita [$n=2$], trissomia do cromossomo 21 [$n=1$]); 51 indivíduos puderam ser analisados no grupo de intervenção e 49 no grupo de controle. As características de todos os neonatos na entrada do estudo estão listadas na tabela 1 e não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

A *S. boulardii* foi administrada pela primeira vez 2,63 dias após o nascimento (intervalo: um a seis dias; em 46 neonatos em três dias, apenas em cinco neonatos entre o dia quatro e o dia seis). O número total de dias de administração de *S. boulardii* foi, em média, 25,3 dias (intervalo: nove a 28 dias).

Tolerância de alimentação

A ingestão de fórmula na nutrição enteral máxima ($128,4 \pm 6,7$ em comparação com $112,3 \pm 7,2$ mL/kg/dia,

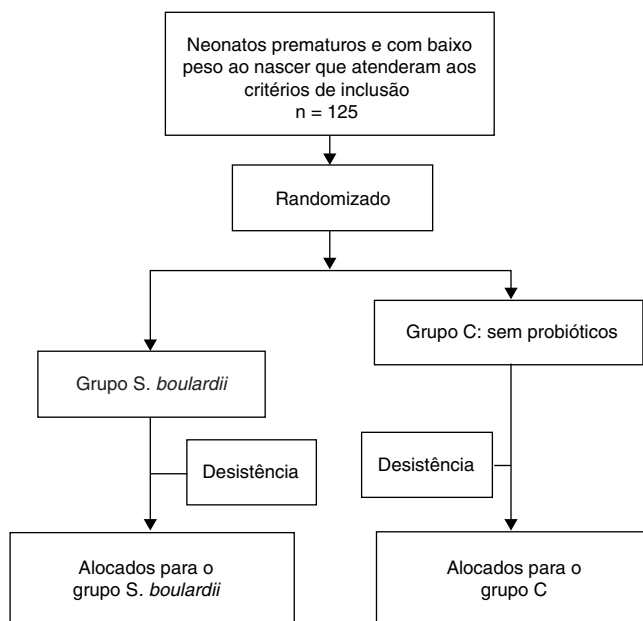


Figura 1 Fluxograma do estudo.

Tabela 1 Características (média + 1 DP) dos neonatos incluídos

	<i>S. boulevardii</i>	Controle
Peso ao nascer (g)	1947 ± 54	1957 ± 51
Idade gestacional (semanas)	33 + 0,72	33 + 1,04
Meninos/Meninas	27/24	24/25
Dificuldades respiratórias	5	6
Hiperbilirrubinemia (n° (%))	16 (31,4%)	14 (28%)
Bilirrubina máxima total (μmol/L)	18,5 ± 2,2	19,4 ± 2,8
Anemia (n° (%))	23 (45,1%)	25 (51,0%)
Tratamento com antibióticos (n° (%))	11 (21,6%)	9 (18,4%)

Dificuldades respiratórias: inclui síndrome do desconforto respiratório e síndrome do pulmão úmido.
S, *Saccharomyces*; p > 0,05 (todos)

Tabela 2 Comparação do peso de ganho, crescimento (média + 1 DP), tolerância de alimentação, eventos adversos (sepse, sintomas gastrointestinais) e duração da internação entre o *S. boulevardii* e o grupo de controle

	<i>S. boulevardii</i>	Controle	P
Ganho de peso (g/dia)	16,14 ± 1,96	10,73 ± 1,77 g	0,02
Nutrição enteral máxima (mL/kg/dia)	128,44 ± 6,67	112,29 ± 7,24	0,03
Quando a nutrição enteral iniciou, tempo necessário até a nutrição enteral completa (dia)	0,37 ± 0,13	1,70 ± 0,45	<0,01
Aumento da PC (cm/semana)	0,74 ± 0,03	0,72 ± 0,04	0,67
Crescimento linear (cm/semana)	0,89 ± 0,04	0,87 ± 0,04	0,17
Incidência de sepse (n° (%))	4 (7,8%)	6 (12,2%)	0,06
Incidência de sintomas GI (n° (%))	7/51 (13,7%)	10/49 (20,4%)	0,05
Tempo de internação (dias)	23,3 ± 1,6	28,0 ± 1,8	0,035

PC, perímetro cefálico; GI, sintomas gastrointestinais: regurgitação, vômito, resíduo gástrico; n° (%), número (percentual) de pacientes.

p < 0,05) foi maior no grupo que recebeu *S. boulevardii* do que no grupo de controle e o tempo necessário para atingir a nutrição enteral completa (0,4 ± 0,1 em comparação com 1,7 ± 0,5 dia, p < 0,05) foi menor no grupo de intervenção do que no grupo de controle (tabela 2).

Crescimento e tempo de internação

O ganho de peso no grupo que recebeu *S. boulevardii* foi de 16,14 ± 1,96 g/kg/dia em comparação com 10,73 ± 1,77 g/kg/dia (p < 0,05) no grupo de controle. Não houve diferença significativa em crescimento linear, crescimento do perímetro cefálico, incidência de distensão abdominal e incidência de sepse (tabela 2). O tempo de internação do grupo *S. boulevardii* foi mais curto (p = 0,035) (tabela 2). Nenhum neonato desenvolveu ECN.

Efeitos adversos

Nenhum prematuro desenvolveu fungemia. Nenhuma reação adversa à *S. boulevardii* foi relatada.

Discussão

Mostramos que a *S. boulevardii* pode ser administrada com segurança em neonatos prematuros e que melhora a tolerância de alimentação oral e o ganho de peso. Em neonatos a termo, provou-se que a fórmula complementada com *Lactobacillus (L.) rhamnosus* GG aumentou o ganho de peso, porém fórmulas complementadas com *Bifidobacterium (B.) longum*, *B. animalis subsp. lactis* e *L. reuteri* não causaram o mesmo efeito.¹¹⁻¹³ Em neonatos prematuros, a administração de *B. breve* também melhorou o ganho de peso.¹⁴ Os mecanismos por meio dos quais o ganho de peso é afetado ainda não estão claros.

A *S. boulevardii* é eficaz no tratamento de várias doenças GI relacionadas à presença de patógenos bacterianos e virais.¹⁵ Ela compete com patógenos por locais de ligação e produz uma ampla gama de substâncias antimicrobianas.¹⁶ A *S. boulevardii* tem capacidade de produzir poliaminas, substâncias essenciais ao crescimento e à diferenciação celular, e de melhorar a maturação, refletida em maiores níveis de expressão enzimática.¹⁷ A *S. boulevardii* é uma levedura

que aumenta de forma significativa a atividade das enzimas metabólicas na mucosa intestinal, estimula a secreção de enzimas hidrolisantes de dissacarídeos, participa no metabolismo e na absorção de carboidratos e estimula a produção de IgA secretório como resultado de um efeito trófico sobre a mucosa intestinal.¹⁸ Além disso, a *S. boulardii* promove a estabilidade do microbioma intestinal e reduz a possibilidade de má absorção causada por distúrbios GI.¹⁹ A translocação da *S. boulardii* não foi relatada; pelo contrário, foi relatado que a *S. boulardii* reduz a translocação bacteriana.²⁰ Com base nessas propriedades, trabalhamos com a hipótese de que a *S. boulardii* pode melhorar o crescimento e os resultados clínicos em neonatos prematuros ou com baixo peso ao nascer.

Apesar de vários ensaios clínicos sugerirem fortemente um lugar para a *S. boulardii* na prevenção e no tratamento de várias doenças GI em adultos e crianças, os dados em neonatos prematuros são limitados.¹⁸ A fórmula suplementada da *S. boulardii* mostrou-se bem tolerada por neonatos prematuros e apresentou efeitos benéficos sobre o microbioma GI, tornou-o parecido com o dos bebês amamentados.¹¹ Os ensaios clínicos em neonatos prematuros também sugeriram que a *S. boulardii* apresentou melhoria na tolerância de alimentação e reduziu o risco de sepse.^{21,22} A fim de atingir o crescimento ideal de um prematuro, o objetivo é imitar o crescimento intrauterino ao mesmo tempo em que se obtém um resultado funcional comparável a nascidos a termo.²³ Recomenda-se um ganho de peso de 15 a 20 g/kg/dia, de comprimento de 0,7 a 1,0 cm/semana e de perímetro cefálico de 0,7 cm/semana.^{24,25} No grupo *S. boulardii*, o ganho de peso médio foi de 16,14 g/kg/dia, crescimento linear de 0,9 cm/semana e aumento do perímetro cefálico de 0,7 cm/semana, respectivamente. O ganho de peso no grupo de controle foi de 10,73 g/kg/dia, abaixo da recomendação. O número de dias para alcançar a nutrição enteral completa foi menor no grupo *S. boulardii* do que no grupo de controle. O maior ganho de peso provavelmente está relacionado à melhoria da tolerância de alimentação. Observamos que a incidência de vômito, volume de resíduos gástricos e distensão abdominal ("sintomas GI", tabela 2) diminuíram no grupo de intervenção em comparação com o grupo de controle, embora não houvesse diferença estatística significativa. O tempo de internação total no hospital no grupo *S. boulardii* foi mais curto do que o do grupo de controle.

Não observamos uma diferença significativa no crescimento linear e na evolução do perímetro cefálico, o que pode estar relacionado ao curto período de intervenção de um mês. Outras limitações deste estudo são a falta de informações sobre características clínicas pós-natais dos neonatos, que podem ser fatores que influenciam o resultado, como o índice de persistência do canal arterial, hemorragia intraventricular e outros. Faltam informações sobre o número de neonatos com fatores predisponentes para ECN, sepse ou outros problemas como pré-eclâmpsia, uso pré-natal de esteroides, ruptura prematura de membranas e parto cesáreo. A ausência de amamentação é outra fragilidade do estudo.

Uma recente revisão Cochrane relatou 24 ensaios clínicos sobre probióticos em neonatos prematuros e concluiu que os ensaios eram altamente variáveis no que diz respeito aos critérios de inclusão (peso ao nascer, idade gestacional), risco

básico de ECN, cronograma, dose, formulação dos probióticos e regimes de alimentação.⁸ A suplementação enteral com probióticos reduziu significativamente a incidência de ECN grave (estágio II ou superior) (risco relativo [RR] típico 0,43, intervalo de confiança [IC] de 95% 0,33 a 0,56; 20 estudos, 5.529 neonatos) e de mortalidade (RR típico de 0,65, IC de 95% 0,52 a 0,81; 17 estudos, 5.112 neonatos).⁸ De acordo com essa metanálise, não havia evidência de uma redução significativa de sepse hospitalar (RR típico de 0,91, IC de 95% 0,80 a 1,03; 19 estudos, 5.338 neonatos).⁸ Em nosso ensaio, nenhum prematuro desenvolveu ECN; isso provavelmente está relacionado ao fato de que a idade gestacional para inclusão era de 30-37 semanas e que o ECN ocorre com mais frequência em neonatos nascidos com uma idade gestacional menor. Ensaios clínicos anteriores mostraram que a suplementação com *S. boulardii* não reduziu a incidência de óbito nem de ECN em neonatos com muito baixo peso ao nascer, mas melhorou a tolerância de alimentação e reduziu o risco de sepse clínica, ao mesmo tempo em que não foram observados efeitos adversos relacionados à ingestão de *S. boulardii*.^{21,22}

A *S. boulardii* teve um efeito protetor contra vários patógenos entéricos por dois mecanismos principais: produção de fatores que neutralizam as toxinas bacterianas e modulação da célula hospedeira, o que sinaliza a via implicada na resposta pró-inflamatória durante a infecção bacteriana.^{18,19} Além disso, a *S. boulardii* pode aumentar a atividade das células T reguladoras e secreção de IgA de células do epitélio e das criptas intestinais e melhorar a proteção intestinal por meio de regulação imune.¹⁸ Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de sepse entre os dois grupos (4/51 em comparação com 6/49). Esse achado está de acordo com a análise de Cochrane, mostra que os ensaios clínicos incluídos não relataram infecção sistêmica com o organismo probiótico suplementar.⁸ A fungemia de *S. boulardii* foi relatada em pacientes com acesso venoso central.¹⁸ Neste ensaio clínico, não houve caso de fungemia e não ocorreu efeito colateral. Os autores da recente revisão Cochrane concluíram que a versão atualizada das evidências disponíveis justifica fortemente uma alteração na prática, o que significa que os probióticos devem ser administrados em neonatos prematuros para diminuir o risco de ECN e mortalidade.⁸

Em conclusão, os resultados deste estudo mostram que o uso profilático de *S. boulardii* em neonatos prematuros acelera o ganho de peso e melhora a tolerância de alimentação. Esses dados confirmam uma análise retrospectiva recente que concluiu que os probióticos melhoram a tolerância de alimentação e levam a um crescimento geral melhor em neonatos prematuros.²⁶ Pela primeira vez, sugere-se maior ganho de peso em neonatos prematuros que receberam *S. boulardii*. São necessários futuros ensaios clínicos duplo-cegos controlados por placebo para confirmar esses dados.

Conflitos de interesse

Y. Vandenplas é consultor da United Pharmaceuticals e da Biocodex. Os demais autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Collado MC, Cernada M, Neu J, Pérez-Martínez G, Gormaz M, Vento M. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. *Pediatr Res*. 2015;77:726–31.
2. Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res*. 2003;54:393–9.
3. Chauhan M, Henderson G, McGuire W. Enteral feeding for very low birth weight infants: reducing the risk of necrotizing enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008;93:F162–6.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada: FAO, WHO; 2002.
5. Deshpande G, Rao S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet*. 2007;369:1614–20.
6. Wang Q, Dong J, Zhu Y. Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials. *J Pediatr Surg*. 2012;47:241–8.
7. Deshpande GC, Rao SC, Keil AD, Patole SK. Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. *BMC Med*. 2011;9:92.
8. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;4:CD005496.
9. Vendt N, Grünberg H, Tuure T, Malminiemi O, Wuolijoki E, Tillmann V, et al. Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial. *J Hum Nutr Diet*. 2006;19:51–8.
10. Senterre T. Practice of enteral nutrition in very low birth weight and extremely low birth weight infants. *World Rev Nutr Diet*. 2014;110:201–14.
11. Costalos C, Skouteri V, Gounaris A, Sevastiadou S, Triandafilidou A, Ekonomidou C, et al. Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii*. *Early Hum Dev*. 2003;74:89–96.
12. Puccio G, Cajozzo C, Meli F, Rochat F, Grathwohl D, Steenhout P. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. *Nutrition*. 2007;23:1–8.
13. Weizman Z, Alsheikh A. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *J Am Coll Nutr*. 2006;25:415–9.
14. 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.
15. Elmer GW. Probiotics: “living drugs”. *Am J Health Syst Pharm*. 2001;58:1101–9.
16. Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32:1854–8.
17. Buts JP. Polyamines in milk, in bioactive factors in milk. *Ann Nestle*. 1996;54:98–104.
18. Vandenplas Y, Salvatore S, Vieira M, Devreker T, Hauser B. Probiotics in infectious diarrhoea in children: are they indicated? *Eur J Pediatr*. 2007;166:1211–8.
19. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroenterol*. 2010;16:2202–22.
20. Villar-García J, Hernández JJ, Güerri-Fernández R, González A, Lerma E, Guelar A, et al. Effect of probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on microbial translocation and inflammation in HIV-treated patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015;68:256–63.
21. Serce O, Benzer D, Gursoy T, Karatekin G, Ovali F. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* on necrotizing enterocolitis or sepsis in very low birth weight infants: a randomised controlled trial. *Early Hum Dev*. 2013;89:1033–6.
22. Demirel G, Erdeve O, Celik IH, Dilmen U. *Saccharomyces boulardii* for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: a randomized, controlled study. *Acta Paediatr*. 2013;102:e560–5.
23. Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50:85–91.
24. Georgieff MK. Nutrition. In: MacDonald MG, Seshia MM, Mullet MD, editors. *Avery’s neonatology pathophysiology and management of the newborn*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p. 380–1.
25. Uhing MR, Das UG. Optimizing growth in the preterm infant. *Clin Perinatol*. 2009;36:165–76.
26. Dang S, Shook L, Garlitz K, Hanna M, Desai N. Nutritional outcomes with implementation of probiotics in preterm infants. *J Perinatol*. 2015;35:447–50.