



ELSEVIER

Jornal de
Pediatria

www.jpmed.com.br



ARTIGO DE REVISÃO

Effectiveness of probiotics in the prophylaxis of necrotizing enterocolitis in preterm neonates: a systematic review and meta-analysis[☆]**Wanderley Marques Bernardo^{a,*}, Felipe Toyama Aires^b, Renata Mota Carneiro^b, Fernando Pereira de Sá^c, Vera Esteves Vagnozzi Rullo^d e Dennis Alexander Burns^e**^a *Coordenador Científico do Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.*^a *Professor de Medicina Baseada em Evidências, Faculdade de Ciências Médicas de Santos (UNILUS), Santos, SP, Brasil*^b *Acadêmicos, UNILUS, Santos, SP, Brasil*^c *Especialista, Sociedade Brasileira de Pediatria. Professor, Clínica Pediátrica, UNILUS, Santos, SP, Brasil*^d *Pós-doutorado, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil. Professora, Clínica Pediátrica, UNILUS, Santos, SP, Brasil*^e *Diretor da Sociedade Brasileira de Pediatria e Presidente da Sociedade de Pediatria do Distrito Federal, Brasília, DF, Brasil*

Recebido em 29 de agosto de 2012; aceito em 11 de setembro de 2012

KEYWORDSNecrotizing
enterocolitis;
Probiotics;
Premature**Abstract****Objective:** To elucidate the benefits of using probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis (NEC) and its complications in preterm newborns.**Method:** This was a systematic review of randomized controlled trials, which included studies retrieved from three databases (MEDLINE, Embase, and LILACS), using a combination of the terms (necrotizing enterocolitis) AND (probiotics).**Results:** 11 randomized trials were included, totaling 2,887 patients, 1,431 in the probiotic group and 1,456 in the control group. There was a reduction in the incidence of NEC (NNT = 25), overall death (NNT = 34), and neonatal sepsis (NNT = 34) in the probiotic group compared to the control group. Patients that received probiotic supplementation had lower food reintroduction time ($p < 0.001$) and hospitalization time ($p < 0.001$) when compared to those not receiving probiotics. There was no difference in mortality caused by NEC.**Conclusion:** In premature newborns, the use of probiotics is effective as a prophylaxis for NEC and its complications.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2013.02.004>[☆] Como citar este artigo: Bernardo WM, Aires FT, Carneiro RM, Sá FP, Rullo VE, Burns DA. Effectiveness of probiotics in the prophylaxis of necrotizing enterocolitis in preterm neonates: a systematic review and meta-analysis. J Pediatr (Rio J). 2013;89:18-24.

*Autor para correspondência.

E-mail: wmbernardo@usp.br (W.M. Bernardo).

PALAVRAS-CHAVE

Enterocolite
necrosante;
Probióticos;
Prematuros

Eficácia dos probióticos na profilaxia de enterocolite necrosante em recém-nascidos prematuros: revisão sistemática e meta-análise

Resumo

Objetivo: Elucidar os benefícios do uso de probióticos na prevenção de enterocolite necrosante (ECN) e de suas complicações em recém-nascidos prematuros.

Método: Revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados, que incluiu pesquisas efetuadas em três bases de dados (MEDLINE, EMBASE e LILACS), utilizando a combinação dos termos (*necrotizing enterocolitis*) AND (*probiotics*).

Resultados: Foram incluídos 11 ensaios clínicos randomizados, totalizando 2.887 pacientes, sendo 1.431 no grupo Probiótico e 1.456 no grupo Controle. Houve redução na incidência de ECN (NNT = 25), de morte global (NNT = 34) e sepse neonatal (NNT = 34) no grupo Probiótico em relação ao grupo Controle. Pacientes alimentados com suplementação de probióticos tiveram tempo de reintrodução alimentar ($p < 0,001$) e de hospitalização ($p < 0,001$) menor quando comparados aos que não receberam. Não houve diferença na mortalidade causada por ECN.

Conclusão: Em recém-nascidos prematuros, o uso de probióticos é eficaz na profilaxia de ECN e de suas complicações.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

A enterocolite necrosante (ECN) é patologia multifatorial que resulta da interação entre perda da integridade da mucosa intestinal e da resposta do hospedeiro a este dano. É determinada por isquemia intestinal, lesão de mucosa, edema, ulceração e passagem de ar ou bactérias pela parede, culminando em necrose de mucosa e de parede intestinal.

Os principais fatores preexistentes que acarretam risco aumentado para desenvolvimento de ECN são prematuridade, nutrição enteral e colonização por micro-organismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermidis* e *Rotavirus*.¹

Trata-se da emergência mais prevalente do trato gastrointestinal no período neonatal.² Sua incidência é bastante variável, afetando 2-22% dos recém-nascidos de muito baixo peso (< 1.500 g).^{2,3}

A ocorrência da ECN é inversamente proporcional à idade gestacional do nascimento, devido à imaturidade fisiológica intestinal dos prematuros. Desta forma, os probióticos, um grupo de organismos capaz de melhorar este quadro, vêm sendo estudado a fim de combater a progressão da doença.

Probióticos foram descritos pela primeira vez na literatura por Lilly e Stillwell, em 1965, como fatores de promoção do crescimento produzidos por certos micro-organismos. Recentemente, são descritos como organismos vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas na alimentação, conferem benefício à saúde do hospedeiro.⁴ Por serem micro-organismos capazes de colonizar o trato digestivo por aderência ao epitélio intestinal, produzindo substâncias antimicrobianas, modulando a resposta imune e o metabolismo do hospedeiro, os probióticos ganharam espaço em discussões sobre sua utilidade em prematuros.^{5,6}

O objetivo do presente estudo é elucidar os reais benefícios dos probióticos na prevenção de enterocolite necrosante e de suas complicações em recém-nascidos prematuros.

Método**Identificação e seleção dos estudos**

Para realizar a análise sistemática da evidência disponível sobre a eficácia dos probióticos na profilaxia de enterocolite necrosante, foi utilizada uma estratégia de busca à literatura, que incluiu pesquisas efetuadas nas bases de dados MEDLINE, EMBASE e LILACS. As buscas foram finalizadas em maio de 2012.

A pesquisa no MEDLINE foi realizada através do PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), e foi adaptada pelo uso dos termos (*necrotizing enterocolitis*) AND (*probiotics*). A mesma estratégia foi utilizada na base EMBASE. No LILACS utilizou-se a estratégia (*enterocolite*) AND (*probióticos*).

Ainda realizou-se busca manual através das referências dos estudos pré-selecionados e de revisões publicadas sobre o tema.

Critérios de inclusão e exclusão

Desenho de estudo: Foram incluídos apenas ensaios clínicos controlados e randomizados (estudos Fase III).

Pacientes: Recém-nascidos prematuros (< 34 semanas de idade gestacional) e/ou de muito baixo peso (< 1.500 g ao nascer), independentemente da idade gestacional. Estudos que incluíram pacientes com mais de 34 semanas de idade gestacional e com mais de 1.500 g ao nascimento e aqueles em que não foi possível estabelecer estes limites foram excluídos da análise.

Intervenção: Recém-nascidos que receberam suplementação com probióticos (independentemente da natureza, modo de preparo e dosagem) adicionados à nutrição enteral com leite humano e/ou fórmulas.

Controle: Recém-nascidos que receberam nutrição enteral com leite humano e/ou fórmulas apenas.

Desfechos analisados

Os desfechos analisados foram: incidência de enterocolite necrosante estágio ≥ 2 de Bell,⁷ mortalidade global, mortalidade por enterocolite necrosante, incidência de sepse, tempo para realimentação oral e tempo de hospitalização.

Qualidade metodológica e validade interna

Procedeu-se um exame detalhado da qualidade dos estudos, com o objetivo de avaliar a força da evidência e a validade de sua inclusão nesta revisão. Para isso, utilizou-se a escala de Jadad.⁸ Apenas trabalhos com pontuação igual ou maior que três foram incluídos nesta revisão.

As características individuais de cada estudo incluído foram analisadas através da recomendação CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*).⁹

Análise estatística

Todos os dados foram analisados por intenção de tratamento, o que significa que os participantes dos estudos foram analisados nos grupos para os quais foram randomizados, independentemente do tratamento e de irregularidades do protocolo. As possíveis perdas de seguimento foram consideradas como desfecho clínico desfavorável.

As medidas de efetividade ou de danos expressas em números absolutos foram analisadas através da diferença de risco absoluto, adotando-se intervalo de confiança de 95%. Para todos os resultados estatisticamente significativos, foram calculados os números necessários para tratar (NNT) e os números necessários para causar danos (NNH).

Para a análise dos dados contínuos, utilizou-se a diferença de média ponderada entre os grupos. Os estudos que não apresentaram dados em média e seus respectivos desvios-padrão não foram incluídos nas análises.

Heterogeneidade e análise de sensibilidade

Inconsistências entre os ensaios clínicos foram estimadas através do teste de Qui-quadrado (*Chi*²) de heterogeneidade e quantificadas usando o teste *I*². Um valor acima de 50% foi considerado substancial.

A análise de sensibilidade foi realizada incluindo apenas estudos que obtiveram resultados com poder maior que 80%.

Resultados

Seleção dos estudos

Através das buscas eletrônicas (MEDLINE = 190; EMBASE = 73 e LILACS = 5), 268 estudos foram recuperados. Destes, 18 ensaios clínicos controlados e randomizados foram selecionados para leitura do texto integral.¹⁰⁻²⁷ Quanto aos estudos, seis foram selecionados através de busca manual, pois não se enquadravam na estratégia utilizada^{28,29} ou estavam anexados em outra base de dados.³⁰⁻³³ Após esta fase, oito deles foram excluídos, pois não preenchiam critérios

de inclusão: cinco não avaliaram a população em estudo^{10,14,19,25,29}; um não avaliou os desfechos selecionados^{1,8} e dois foram classificados como Jadad < 3 .^{13,28} Quatro estudos não foram incluídos, pois foram publicados em língua chinesa, tornando impossível a compreensão e extração dos dados.³⁰⁻³³

Assim, esta revisão incluiu dados de 12 ensaios clínicos randomizados,^{11,12,15-17,20-24,26,27} totalizando 2.907 pacientes, sendo 1.441 no grupo Probiótico e 1.466 no grupo Controle.

Descrição dos estudos primários

Os dados das intervenções avaliadas em cada estudo primário estão descritos na Tabela 1.

Efeito dos probióticos na enterocolite necrosante

No grupo Probiótico, a incidência de ECN estágio ≥ 2 foi de 3,2%, enquanto no grupo Controle foi de 7,2%. Houve redução do risco absoluto de 4,0% (IC 95% 0,02 a 0,06; $p < 0,001$; $I^2 = 37\%$; Figura 1), necessitando tratar 25 pacientes para se obter este benefício.

Efeito dos probióticos na mortalidade

A taxa de mortalidade no grupo de estudo foi de 5,5%, enquanto no grupo Controle foi de 8,4%. Os probióticos reduziram o risco absoluto de morte em 3,0% (IC 95% 0,01 a 0,05; $p < 0,002$; $I^2 = 59\%$; Figura 1), necessitando tratar 34 pacientes para se obter este benefício.

Quando se exclui o estudo que gerou elevada heterogeneidade,¹² mantém-se o efeito atingido na análise anterior ($p < 0,002$ e $I^2 = 14\%$).

Apenas cinco estudos primários analisaram mortalidade causada por ECN.^{2,15,20,24,27} Não houve diferença estatística entre os grupos Probiótico e Placebo (2,6% vs. 3,0%; $p = 0,64$; $I^2 = 0\%$; Figura 1).

Efeito dos probióticos na sepse

Todos os estudos analisaram a ocorrência de sepse neonatal como desfecho. Os pacientes que receberam probióticos tiveram menor incidência de sepse quando comparados aos que não receberam, porém com diferença não significativa (17,9% vs. 20,6%; IC 95% 0,00 a 0,05; $p = 0,05$; $I^2 = 57\%$; Figura 1).

O mesmo efeito é obtido quando se exclui o estudo que gerou heterogeneidade significativa²¹ ($p = 0,32$ e $I^2 = 21\%$).

Efeito dos probióticos no tempo de realimentação oral

O total de oito estudos primários avaliou o tempo para realimentação oral integral.^{15,17,20,21,23,24,26,27} Os pacientes alimentados com suplementação de probióticos tiveram reintrodução alimentar, em média, três dias antes do que os do grupo Controle (IC 95% 2,78 a 3,69 dias; $p < 0,001$). Entretanto, este resultado está relacionado a uma heterogeneidade elevada ($I^2 = 94\%$).

Tabela 1 Dados das intervenções avaliadas nos estudos primários.

Estudo	Probiótico	Dosagem e duração	Leite
Millar et al. ¹¹	Lactob GG	10 ⁸ UFC 2x por dia, por 14 dias	Humano e/ou fórmula
Dani et al. ¹²	Lactob GG	6x10 ⁹ UFC 1x dia até a alta	Humano e/ou fórmula
Bin-Nun et al. ¹⁵	Bifidobac infantis	3,5x10 ⁸ UFC de cada, 1x dia até idade corrigida de 36 semanas	Humano e/ou fórmula
Lin et al. ¹⁶	Bifidobac bifidum Strepto thermophilus Lactob acidophilus Bifidobac infantis	10 ⁶ organismos de cada, 2x ao dia do 7º dia até a alta	Humano
Manzoni et al. ¹⁷	Lactob casei	6x10 ⁹ UFC 1x dia, do 3o dia até 6 semanas ou até a alta	Humano
Lin et al. ²⁰	Lactob acidophilus Bifidobac bifidum	2x10 ⁹ UFC por dia até 6 semanas	Humano e fórmula
Manzoni et al. ²¹	Lactob rhamnosus	6x10 ⁹ UFC 1x dia, por 4-6 semanas ou até a alta	Humano e/ou fórmula
Rouge et al. ²²	Bifidobac longum Lactob rhamnosus	10 ⁸ UFC por dia até a alta	Humano e/ou fórmula
Samanta et al. ²³	Bifidobac infantis Bifidobac bifidu Bifidobac longum Lactob acidophilus	2,5x10 ⁹ UFC por dia até a alta	Humano
Mihatsch et al. ²⁴	Bifidobac lactis	1,2x10 ¹⁰ UFC/kg por dia, até 6 semanas	Humano e/ou fórmula
Braga et al. ²⁶	Bifidobac breve	3,5x10 ⁷ a 3,5x10 ⁹ UFC por dia, do 2º dia ao 30º dia ou até a alta	Humano
Sari et al. ²⁷	Lactob casei Lactob sporogenes	3,5x10 ⁸ UFC por dia, até a alta	Humano e/ou fórmula

Efeito dos probióticos no tempo de hospitalização

Seis estudos primários avaliaram o tempo de hospitalização em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.^{11,16,20,22,23,27} Dois estudos forneceram dados em forma de mediana e não foram incluídos na meta-análise.^{11,27} Os pacientes que receberam probióticos permaneceram hospitalizados, em média, seis dias a menos (IC 95% 5,12 a 7,09 dias; $p < 0,001$; $I^2 = 88\%$) quando comparados aos que não receberam.

Poder dos estudos primários

O poder estabelecido em cada estudo primário, referente a cada desfecho, está descrito na Tabela 2.

Análise de sensibilidade

Pela análise de sensibilidade, incluindo-se apenas estudos que apresentaram poder estatístico maior que 80%, os pacientes que receberam probióticos tiveram menor incidência de enterocolite necrosante (NNT = 13). Não houve diferença na mortalidade global, na mortalidade por ECN e na incidência de sepse entre os grupos.

Discussão

Embora a enterocolite necrosante ainda seja um dos grandes desafios da neonatologia, muitos conhecimentos têm

surgido para elucidar a sua etiopatogenia, permitindo melhor estudo do seu manejo e de sua prevenção. Especial atenção tem sido dada à suplementação com probióticos para os pacientes prematuros, principalmente os de muito baixo peso, na tentativa de reduzir a incidência desta patologia.

Probióticos são micro-organismos vivos oferecidos como suplemento alimentar que atuam no intestino do organismo hospedeiro regulando a flora bacteriana local. Dessa forma, agem melhorando a permeabilidade gastrointestinal e aumentando a resistência da mucosa contra a penetração bacteriana. Quanto aos mecanismos de proteção: (i) aumentam a resistência da barreira intestinal contra o trânsito de bactérias e suas toxinas; (ii) modificam a resposta do hospedeiro em relação aos produtos microbianos; (iii) aumentam a resposta das mucosas à IgA; (iv) produzem substâncias bactericidas; (v) excluem competitivamente os patógenos em potencial.^{5,6}

Esta revisão teve como princípio avaliar a melhor evidência disponível na literatura a fim de elucidar os benefícios dos probióticos em recém-nascidos prematuros. Foram incluídos apenas ensaios clínicos controlados e randomizados com protocolos bem definidos, tentando-se, ao máximo, controlar os possíveis vieses. A validade dos resultados obtidos pode ser potencialmente comprometida devido às diferentes dosagens e formas de preparo da intervenção em estudo. Deve-se considerar, também, a não inclusão dos quatro estudos publicados em língua chinesa em que não foi possível realizar análise crítica.

O conjunto de resultados mostrou com dados consistentes que a administração enteral de probióticos reduz a inci-

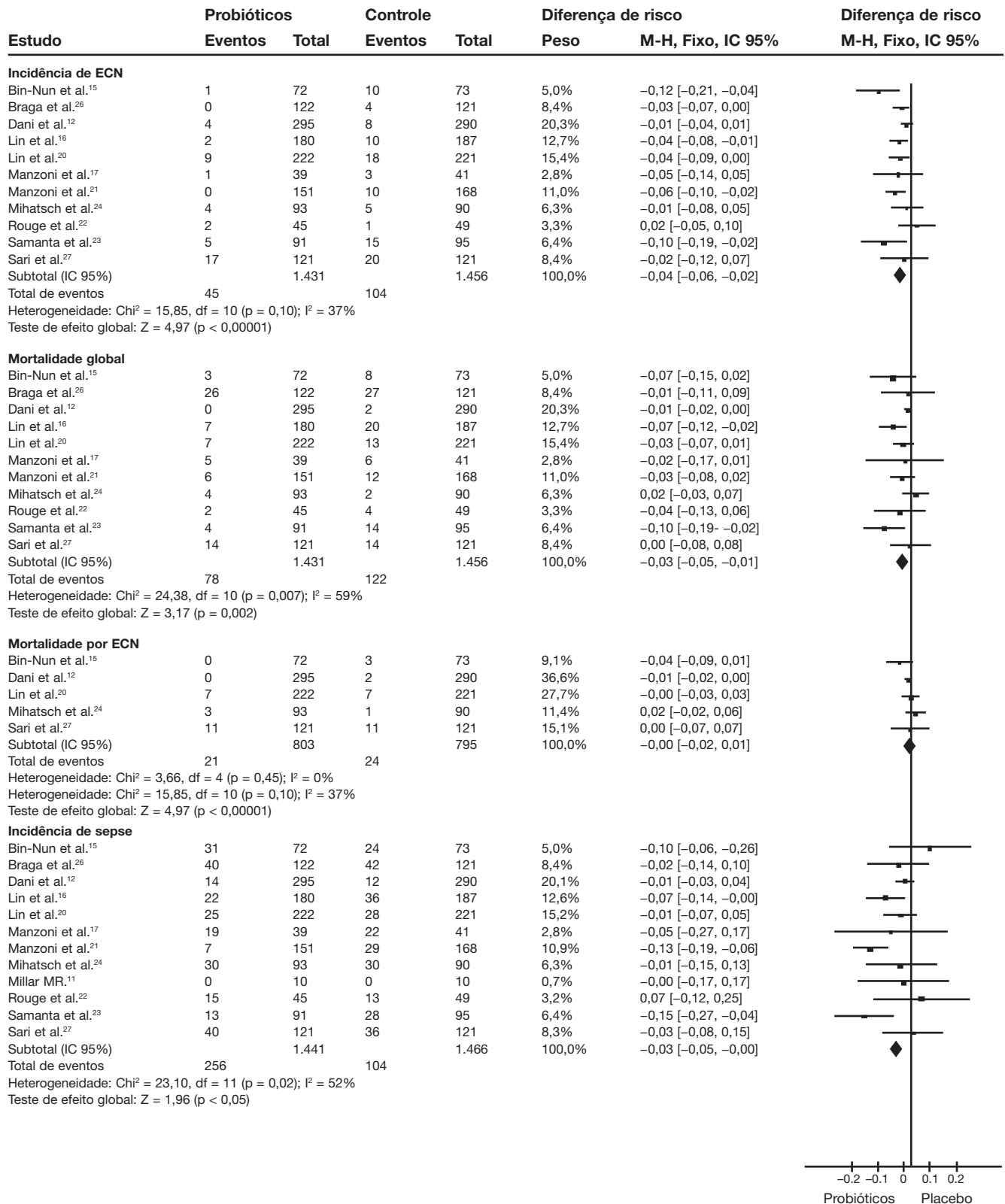


Figura 1 Meta-análise analisando a eficácia dos probióticos em recém-nascidos prematuros. df, graus de liberdade; ECN, enterocolite necrosante; H, homem; I², teste de heterogeneidade; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; M, mulher.

Tabela 2 Poder (1-b) estabelecido nos estudos primários.

Estudo	ECN	Mortalidade global	Mortalidade por ECN	Sepse
Millar et al. ¹¹	*	*	*	NA
Dani et al. ¹²	40,9%	40,6%	40,6%	8,3%
Bin-Nun et al. ¹⁵	85,0%	35,7%	40,2%	23,5%
Lin et al. ¹⁶	60,8%	71,9%	*	45,6%
Manzoni et al. ¹⁷	12,5%	3,9%	*	6,2%
Lin et al. ²⁰	42,6%	33,1%	1,1%	9,4%
Manzoni et al. ²¹	86,8%	21,3%	*	92,6%
Rouge et al. ²²	12,1%	12,4%	*	9,1%
Samanta et al. ²³	68,5%	72,4%	*	70,3%
Mihatsch et al. ²⁴	8,9%	12,0%	15,9%	2,6%
Braga et al. ²⁶	48,7%	3,1%	*	4,7%
Sari et al. ²⁷	9,3%	1,0%	1,1%	7,0%

ECN, enterocolite necrosante; NA, não aplicável.

*Desfecho não analisado.

dência de casos graves de ECN, de mortalidade e de sepse, além de apresentar menor tempo para realimentação oral integral e tempo de hospitalização. Apesar de os números necessários para tratar em relação à profilaxia de ECN (NNT = 25) e à mortalidade (NNT = 34) serem relativamente elevados, estes podem ser compensados pela grande incidência de partos prematuros, principalmente nos países com problemas socioeconômico e culturais, e também pelo fácil manuseio e baixos custos relacionados aos probióticos. Tendo em vista pacientes extremamente frágeis, suscetíveis a infecções, complicações e comorbidades, acredita-se que em vigência da disponibilidade de tais suplementos, estes merecem maior enfoque.

Com base nos dados disponíveis, pode-se inferir que os probióticos são mais uma ferramenta útil na prática clínica pediátrica. Porém, são necessários novos estudos que avaliem a melhor forma de preparo e dosagem, além dos tipos de probióticos a serem utilizados.

Algumas revisões sobre o tema foram publicadas nos últimos anos e, assim como esta, mostraram benefícios da suplementação com probióticos.³⁴⁻³⁶ Pequenas diferenças em questões metodológicas são encontradas entre elas, como, por exemplo, em relação à estratégia de busca e base de dados utilizados, idade gestacional (27-37 semanas) e peso do recém-nascido. Independentemente disso, verificou-se redução da incidência de ECN em todas as análises. Wang et al.,³⁶ na última revisão publicada sobre o tema, são os primeiros a tentar estratificar os dados referentes às espécies de probióticos. Tanto os *Lactobacillus* quanto as *Bifidobacterias* mostraram-se eficazes.

Alguns autores consideram as evidências disponíveis como suficientes para a adoção desta modalidade terapêutica como rotina, e novos estudos sobre o tema são desnecessários e, ainda, antiéticos. Outros são mais cautelosos e afirmam que os estudos apresentam falhas metodológicas, pois a segurança dos probióticos em relação à invasão destes micro-organismos na mucosa intestinal não está totalmente estabelecida e os métodos de preparo são muito heterogêneos.³⁷

Quatro ensaios clínicos, registrados no *ClinicalTrials.gov*, incluindo cerca de 1.500 pacientes, estão em fase de andamento e futuramente devem ser incluídos em uma atualização de dados, podendo, assim, elucidar os reais benefícios obtidos até o momento.

Ainda, deve-se esclarecer que apenas dois estudos selecionados tiveram poder suficiente para confirmar os resultados obtidos.

Conclusão

A síntese da evidência permite concluir que em recém-nascidos prematuros a suplementação com probióticos diminui a incidência de casos graves de enterocolite necrosante.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. Brook I. Microbiology and management of neonatal necrotizing enterocolitis. *Am J Perinatol.* 2008;25:111-8.
2. Reynolds RM, Thureen PJ. Special circumstances: trophic feeds, necrotizing enterocolitis and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12:64-70.
3. de Oliveira ND, Miyoshi MH. Avanços em enterocolite necrosante. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81:S16-S22.
4. Kullen MJ, Bettler J. The delivery of probiotics and prebiotics to infants. *Curr Pharm Des.* 2005;11:55-74.
5. Stenger MR, Reber KM, Giannone PJ, Nankervis CA. Probiotics and prebiotics for the prevention of necrotizing enterocolitis. *Curr Infect Dis Rep.* 2011;13:13-20.
6. Arciero JC, Ermentrout GB, Upperman JS, Vodovotz Y, Rubin JE. Using a mathematical model to analyze the role of probiotics and inflammation in necrotizing enterocolitis. *PLoS One.* 2010;5:e10066.

7. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg.* 1978;187:1-7.
8. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials.* 1996;17:1-12.
9. Moher D, Schulz KF, Altman DG. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. *Lancet.* 2001;357:1191-4.
10. Reuman PD, Duckworth DH, Smith KL, Kagan R, Bucciarelli RL, Ayoub EM. Lack of effect of *Lactobacillus* on gastrointestinal bacterial colonization in premature infants. *Pediatr Infect Dis.* 1986;5:663-8.
11. Millar MR, Bacon C, Smith SL, Walker V, Hall MA. Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus GG*. *Arch Dis Child.* 1993;69:483-7.
12. Dani C, Biadaoli R, Bertini G, Martelli 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.
13. 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.
14. Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. Effects of bifidobacterium breve supplementation on intestinal flora of low birth weight infants. *Pediatr Int.* 2004;46:509-15.
15. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr.* 2005;147:192-6.
16. Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2005;115:1-4.
17. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C, et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1735-42.
18. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M, et al. Effects of *Bifidobacterium lactis Bb12* supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4025-31.
19. Stratiki Z, Costalos C, Sevastiadou S, Kastanidou O, Skouroliakou M, Giakoumatou A, et al. The effect of a bifidobacter supplemented bovine milk on intestinal permeability of preterm infants. *Early Hum Dev.* 2007;83:575-9.
20. Lin HC, Hsu CH, Chen HL, Chung MY, Hsu JF, Lien RI, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics.* 2008;122:693-700.
21. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pagni L, Romeo MG, Messner H, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA.* 2009;302:1421-8.
22. Rougé C, Piloquet H, Butel MJ, Berger B, Rochat F, Ferraris L, et al. Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1828-35.
23. Samanta M, Sarkar M, Ghosh P, Ghosh J, Sinha M, Chatterjee S. Prophylactic probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in very low birth weight newborns. *J Trop Pediatr.* 2009;55:128-31.
24. Mihatsch WA, Vossbeck S, Eikmanns B, Hoegel J, Pohlandt F. Effect of *Bifidobacterium lactis* on the incidence of nosocomial infections in very-low-birth-weight infants: a randomized controlled trial. *Neonatology.* 2010;98:156-63.
25. Awad H, Mokhtar H, Imam SS, Gad GI, Hafez H, Aboushady N. Comparison between killed and living probiotic usage versus placebo for the prevention of necrotizing enterocolitis and sepsis in neonates. *Pak J Biol Sci.* 2010;13:253-62.
26. Braga TD, da Silva GA, de Lira PI, de Carvalho Lima M. Efficacy of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei* oral supplementation on necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a double-blind, randomized, controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:81-6.
27. Sari FN, Dizdar EA, Oguz S, Erdeve O, Uras N, Dilmen U. Oral probiotics: *Lactobacillus sporogenes* for prevention of necrotizing enterocolitis in very low-birth weight infants: a randomized, controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2011;65:434-9.
28. 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.
29. Underwood MA, Salzman NH, Bennett SH, Barman M, Mills DA, Marcobal A, et al. A randomized placebo-controlled comparison of 2 prebiotic/probiotic combinations in preterm infants: impact on weight gain, intestinal microbiota, and fecal short-chain fatty acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:216-25.
30. Ke D, Su Z, Li L. Control study on preventing necrotizing enterocolitis in 438 premature infants by using Bifico. *Chin Pediatr Emerg Med.* 2008;15:69-71.
31. Huang B, Yang H, Huang X. Prevention and cure effect of micro ecosystem praeparatum on necrotizing enterocolitis of very low birth weight infant. *J Guangdong Med Coll.* 2009;27:37-9.
32. Di M, Li X. Effects of *Bifidobacterium* supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: a randomized, controlled trial. *Zhong Guo She Qu Yi Shi.* 2010;231:69.
33. Ren B. Preventive effect of *Bifidobacterium tetravaccine* tablets in premature infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Pharm.* 2010;16:24-5.
34. Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(3):CD005496.
35. Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics.* 2010;125:921-30.
36. 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.
37. Young L, Morgan J, McGuire W. Preventing necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: current evidence. *Paediatrics and Child Health.* 2011;21:258-64.