

Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales

Y. Sanz¹, J. Dalmau²

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). Burjassot (Valencia).

²Unidad de Nutrición y Metabolopatías. Hospital Infantil «La Fe». Valencia

Resumen

La entrada en vigor de la nueva normativa sobre alimentos funcionales sólo permitirá incluir alegaciones que hagan referencia a efectos beneficiosos sobre la salud demostrados científicamente. Los probióticos constituyen una importante categoría dentro de los alimentos funcionales, contemplada en el marco de esta regulación. La posible introducción de nuevas cepas prebióticas, así como su uso en sectores distintos al de la alimentación, hace, no obstante, que las normas que rigen su comercialización requieran consideraciones adicionales, como la normativa de los nuevos alimentos. En el marco de la FAO/OMS en 2002 un grupo de expertos en probióticos ha trabajado en la definición de: a) el grado de evidencia científica necesario para poder incluir alegaciones de salud en los alimentos que contienen probióticos; b) las medidas necesarias para su regulación y etiquetado, y c) los criterios para evaluar su eficacia y seguridad. Aunque todavía no existe un consenso internacional sobre todos estos aspectos, sus recomendaciones se han transferido a la Comisión del Codex Alimentarius para su consideración en el marco que regula tanto los alimentos funcionales como los nuevos alimentos. En el contexto de los probióticos, la nueva normativa sobre alimentos funcionales destaca la necesidad de evaluar las relaciones dosis-efecto y definir de forma específica las propiedades beneficiosas, la población diana de cada probiótico y los aspectos relativos a su seguridad, hasta ahora sólo regulados en probióticos para alimentación animal. La estandarización de los criterios de evaluación de la funcionalidad y la seguridad de los prebióticos, así como el establecimiento de correlaciones entre los ensayos de evaluación *in vivo* e *in vitro*, siguen constituyendo un gran reto para la comunidad científica, los productores y los órganos reguladores. Globalmente, las medidas adoptadas van a contribuir a armonizar los criterios de comercialización de los alimentos funcionales (y, entre ellos, los que contienen probióticos) y a proteger los derechos de los consumidores mediante la transmisión de las alegaciones de salud en un formato normalizado.

Palabras clave

Alimentos funcionales, nuevos alimentos, probióticos, regulación, seguridad, dosis-efecto

Abstract

Title: Probiotics within the framework of the new European standard regulating functional foods

The coming into effect of the new regulation on functional foods will only allow the introduction of nutritional and health claims that are scientifically substantiated. Probiotics are an important category of functional foods that are taken into consideration in this regulation. However, the possible introduction of new probiotic strains, as well as their use in sectors other than the food industry, makes it necessary to establish additional considerations, such as the regulation of novel foods. In 2002, within the framework of the FAO/WHO, an expert consultation group worked to define (i) the amount of scientific evidence necessary to make health claims concerning probiotic foods, (ii) the means necessary for their regulation and labeling, and (iii) the criteria for the evaluation of their efficacy and safety. Although, as yet, there is no international consensus on these aspects, the recommendations of this consultation group have been transferred to the Codex Alimentarius Commission for their consideration within the framework of the regulations of both functional foods and novel foods. In the context of probiotics, as part of the functional foods, the new regulation points out the need to define the dose-effect relationships, the specific beneficial effect of each probiotic, the target population, and the safety issues, to date, only regulated in probiotics for animal feed. The standardization of the criteria for evaluating the efficacy and safety of probiotics, as well as the establishment of solid correlations between *in vitro* and *in vivo* trials, constitute challenges for the scientific community, the producers and the regulatory authorities. Overall, the regulations adopted will contribute to the harmonization of the criteria for commercialization of functional foods and those containing probiotics and to the protection of consumers' rights by communicating the health claims in a normalized format.

Keywords

Functional foods, novel foods, probiotics, regulation, safety, dose-effect

Nueva norma europea que regula los alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son los que, además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad¹. Los alimentos que contienen microorganismos probióticos constituyen una categoría dentro de los alimentos funcionales. Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre una o más funciones del organismo². El Reglamento n.º 258/97 de la Comunidad Europea (CE) define como nuevos alimentos los que no se han consumido sistemáticamente en la dieta antes del 15 de mayo de 1997. Esta definición incluye, por tanto, alimentos o ingredientes funcionales inusuales, así como los que contengan o sean producidos por nuevos microorganismos o microorganismos modificados genéticamente³.

En el mercado español hay más de 200 alimentos denominados funcionales. En su mayoría son zumos, alimentos infantiles, leches y yogures, y una fracción muy importante de éstos incluye probióticos. Pese a que un gran número de enfermedades están relacionadas con la alimentación y, según los expertos, los alimentos funcionales pueden ser un instrumento importante para su prevención, las alegaciones sobre sus propiedades saludables no estaban reguladas. Hasta la fecha, la normativa comunitaria no permitía atribuir a un alimento propiedades para prevenir, tratar o curar una enfermedad. Esta situación no se ajustaba a la realidad social, y estaba dejando desprotegidos los derechos de los consumidores y generando conflictos en el ámbito empresarial. En este contexto, la acción concertada de la Unión Europea sobre alimentos funcionales (Functional Food Science in Europe)¹ comenzó a definir los conceptos científicos aplicables al desarrollo de alimentos funcionales. Asimismo, se propuso la creación de un marco legal común que regulara la introducción de alimentos funcionales en el mercado y la formulación de las alegaciones de salud, como modo de comunicar al consumidor el beneficio derivado de su consumo. La propuesta del reglamento comunitario se presentó a la Comisión europea a mediados de 2003 y fue finalmente aprobada el 20 de diciembre de 2006 (CE, n.º 1924/2006). De acuerdo con la nueva normativa, sólo se permitirá hacer alegaciones sobre las propiedades saludables demostradas científicamente. Éstas deben estar incluidas en la lista comunitaria de alegaciones generalmente admitidas en función de las evidencias científicas sobre dicha función biológica, o evaluarse y aprobarse por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Comisión. Los tipos de alegaciones incluidos en la nueva regulación y sus características se muestran en la tabla 1. A raíz de esta normativa, el desarrollo de criterios para evaluar el beneficio y el riesgo del consumo de alimentos e ingredientes funcionales mediante metodologías adecuadas se ha convertido en una necesidad urgente. En este sentido, se puso en funcionamiento una nueva acción concertada de la Unión Europea, denominada PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims and Foods)⁴, que trata de resolver los asuntos relativos a la validación y la verificación científica de las alegaciones. Dicha organización servirá de apoyo tanto a las empresas que deseen hacer alegaciones como a las que las regulan.

TABLA 1

Tipos de alegaciones incluidas en la nueva regulación europea sobre alimentos funcionales

Tipo de alegación	Características
Nutricionales	<ul style="list-style-type: none"> • Referidas al contenido en nutrientes, valor energético o ambos • Basadas en perfiles de nutrientes • Regulan el uso de términos como: bajo valor energético, bajo contenido en grasa, alto contenido en fibra, etc.
De salud	<ul style="list-style-type: none"> • Referidas a los efectos beneficiosos sobre la salud • Sobre reducción del riesgo de enfermedad • Sobre el desarrollo y salud de los niños • Basadas en evidencias científicas generalmente aceptadas • Basadas en nuevos conocimientos

La nueva normativa pone también de manifiesto la necesidad de establecer relaciones dosis-efecto y definir las cantidades mínimas efectivas y máximas recomendadas, teniendo en cuenta el consumo habitual de los alimentos en la dieta. Asimismo, se considera que las evaluaciones clínicas de la efectividad de las alegaciones funcionales en humanos deben tener en cuenta la variabilidad en función de determinados factores, como la edad, el sexo, el origen étnico, el genotipo, el estilo de vida y la dieta de los distintos grupos de población⁴. Estos requisitos se reflejan en las normas establecidas para formular las alegaciones de salud en el etiquetado o en su publicidad. Éstas deben incluir una declaración de la importancia de una dieta adecuada para la salud, la indicación del grupo diana al que va dirigido ese alimento funcional, la cantidad de alimento y la pauta de consumo ideal para obtener el efecto alegado, y las advertencias sobre los posibles riesgos derivados de su consumo excesivo, de las posibles interacciones con fármacos o de su consumo por determinados sectores de la población (CE, n.º 1924/2006)⁵.

Los probióticos en el marco de la normativa europea

La ingestión de probióticos está cobrando gran importancia en nuestra dieta, así como en la práctica clínica, como consecuencia de las crecientes evidencias respecto a sus efectos beneficiosos sobre la salud y su buena aceptación por los consumidores. En el caso de los productos probióticos, al igual que en del resto de alimentos funcionales, se ha carecido de un marco legal que regulara las alegaciones sobre sus efectos saludables; por otro lado, todavía no se dispone de una metodología estandarizada para evaluar su eficacia y seguridad. La nueva regulación sobre las alegaciones de salud de los alimentos funcionales supone un gran avance en la armonización de los criterios de su comercialización. No obstante, la posible introducción de nuevas cepas prebióticas, así como su uso en sectores distintos al de la alimentación, hace que las normas que rigen su comercialización requieran consideraciones adicionales, como la normativa de los nuevos alimentos.

En el contexto de los probióticos incorporados a alimentos, en 2001 se constituyó un grupo integrado por once expertos de diez países que han trabajado en la definición de: a) el grado de evidencia científica necesario para poder incluir alegaciones de salud en los alimentos que contienen probióticos; b) las medidas legislativas necesarias para su regulación y etiquetado, y c) los criterios necesarios para evaluar su eficacia y seguridad². Aunque todavía no existe un consenso internacional sobre estos aspectos, sus recomendaciones se han transferido al Codex Alimentarius para su consideración en el marco que regula tanto los alimentos funcionales como los nuevos alimentos⁶. Asimismo, la adopción de la guía de evaluación de probióticos publicada por dicho comité de expertos se considera un requisito necesario para que una cepa pueda llamarse probiótico⁶.

Definición

El comité de expertos de la FAO/OMS² recomienda definir los probióticos como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor. De acuerdo con este concepto, las cepas deben mantener la viabilidad desde la producción hasta su consumo. Además, es deseable que las cepas mantengan su viabilidad durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, para lo que se requiere que sean resistentes al pH gástrico, y la presencia de sales biliares en el duodeno^{6,7}. Se considera que la capacidad de algunas cepas para proliferar en el tracto intestinal se asocia a sus efectos beneficiosos, aunque dichos efectos también pueden ser fruto directo de su actividad metabólica. Indudablemente, dicha actividad se potenciará en las cepas capaces de proliferar en los sitios diana del tracto gastrointestinal. El requisito de viabilidad en las condiciones adversas que suponen los tratamientos tecnológicos que conlleva su formulación y el tránsito gastrointestinal ha limitado la aplicación comercial, especialmente de cepas de origen intestinal y, en particular, del género *Bifidobacterium*⁸. Asimismo, ha estimulado la evaluación de la efectividad de bacterias no viables o de sus constituyentes^{9,10}. En este sentido, los efectos beneficiosos atribuidos a las bacterias no viables en algunas publicaciones científicas, derivados, por ejemplo, de las propiedades inmunomoduladoras de sus metabolitos o constituyentes celulares (ADN, componentes de la pared celular, etc.)⁹, escapan a este concepto de probiótico, por lo que algunos científicos plantean la posibilidad de revisarlo¹². La mayoría de estudios comparativos demuestran diferencias cualitativas y cuantitativas entre los efectos de cultivos viables e inactivados^{10,13,14}. En algunos ensayos clínicos las preparaciones inactivadas de bacterias probióticas no han demostrado tener efectos beneficiosos, como es el caso de una cepa de *Lactobacillus acidophilus* evaluada recientemente para prevenir la diarrea¹. Sin embargo, al menos dos estudios indican que la administración de algunas fórmulas infantiles fermentadas pero que no contienen bacterias viables puede reducir la incidencia y la gravedad de la diarrea infecciosa¹². La variabilidad de resultados puede deberse tanto a las diferencias en las dosis de compuestos bioactivos administradas en forma viable y no viable como a las alteraciones estruc-

turales derivadas del método empleado para la inactivación de las bacterias¹⁶. Actualmente, se acepta que las bacterias probióticas pueden ser un vehículo de componentes estructurales y metabólicos bioactivos que, por sí mismos, pueden aportar un valor añadido a los alimentos que actualmente no constituyen un vehículo idóneo de bacterias viables¹⁷; no obstante, su aplicación requerirá evaluaciones individualizadas tanto de su eficacia como de su seguridad.

Dosis efectivas

De acuerdo con la nueva regulación sobre alimentos funcionales, así como con las recomendaciones de la FAO/OMS² sobre el caso específico de los probióticos, en la etiqueta de estos productos debe constar la cantidad aproximada y la pauta de consumo para conseguir el efecto beneficioso declarado. Sin embargo, los estudios relativos a las dosis efectivas de los probióticos son todavía muy limitados; además, sus efectos pueden variar según el grupo de población al que se administran. Según algunos autores, se consideran necesario que entre 10^7 y 10^{10} organismos viables alcancen el intestino diariamente para que ejerzan su efecto^{18,19}. Los resultados obtenidos en uno de los primeros metanálisis sobre la eficacia de los probióticos en población infantil han indicado que se necesita una dosis de 10^7 - 10^9 de *Lactobacillus* probióticos para que éstos ejerzan un efecto protector frente a la diarrea aguda²⁰. Una revisión más reciente, que incluye datos de cuatro metanálisis y otros estudios clínicos, indica que la efectividad de los probióticos en el tratamiento de las diarreas agudas en niños depende de la cepa y, en general, es necesario administrar altas dosis durante al menos 5 días²¹. En estudios más recientes, aleatorizados, doble ciego y controlados con placebo, realizados en adultos, se ha valorado la respuesta de la administración de *Bifidobacterium animalis* sp. *lactis* Bb12 y *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei* CRL-341 en dosis de 10^8 , 10^9 , 10^{10} y 10^{11} unidades formadoras de colonias (UFC)/mL²². La recuperación de Bb12 en las heces aumentó con la dosis, mientras que la cepa CRL-341 no se recuperaba en las heces en ninguna de las dosis. Se produjo un aumento lineal en la consistencia de las heces al aumentar la dosis del producto. En un estudio reciente, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, se ha valorado la relación dosis-respuesta de *Bifidobacterium lactis* HN019 sobre la microflora de personas de edad avanzada. En dicho estudio se concluye que las tres dosis ($6,5 \times 10^7$, 1×10^9 y 5×10^9 UFC/mL) producen un aumento significativo del número de bifidobacterias y una reducción en el número de enterobacterias²³. En todos los casos las dosis mínimas ensayadas son próximas a las mínimas recomendadas en leches fermentadas (10^7 células/mL o g) por la Federación Internacional de Productos Lácteos (Internacional Dairy Federation), la Asociación de Leches Fermentadas y Bebidas Lácteas de Japón y la UE⁸.

Seguridad

Los principales probióticos utilizados para consumo humano son bacterias lácticas empleadas tradicionalmente en fermentaciones alimentarias o aislados intestinales, pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, sobre todo en fórmulas infantiles. En menor medida se han comercializado como

probióticos cepas comensales de *Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia coli* y levaduras. En Europa y en Japón las bacterias lácticas utilizadas en fermentaciones de alimentos se consideran generalmente seguras (GRAS, *generally regarded as safe*), ya que a lo largo de la historia su consumo no ha entrañado riesgos de salud. No obstante, se considera que este estatus está ligado a un uso determinado de ellas y no a las cepas. Las nuevas aplicaciones de éstas, así como de otros aislados intestinales en altas dosis en forma de prebióticos, han dado lugar a que se cuestione su seguridad. Las evaluaciones realizadas por expertos en este sentido demuestran que el potencial patogénico de los lactobacilos, y especialmente de las bifidobacterias, es muy bajo. En un número reducido de casos los lactobacilos se han asociado a infecciones en humanos (sobre todo endocarditis) y su potencial como patógenos oportunistas se reduce a individuos inmunodeprimidos o con problemas de salud. Su administración a la población infantil en general se considera segura, salvo en niños inmunodeprimidos o en los portadores de un catéter venoso central^{21,24}. Sin embargo, no se puede generalizar del mismo modo al hablar de la seguridad de las cepas del género *Enterococcus*. Su consumo regular en diversos alimentos fermentados no ha demostrado entrañar riesgos; no obstante, con mucha mayor frecuencia los enterococos se han asociado a infecciones de diversa naturaleza, y se ha demostrado el potencial patogénico de algunas de estas cepas portadoras de resistencias a antibióticos²⁵. El uso de aditivos microbianos y probióticos para alimentación animal está estrictamente regulado por la directiva europea 70/254/CEE y de acuerdo con el comité científico en alimentación animal. Esta regulación incluye pruebas de toxicidad oral y genotoxicidad, así como la evaluación sistemática de las posibles resistencias a antibióticos transmisibles, con independencia del origen o su uso seguro previo de la especie microbiana considerada³. Por otro lado, toda nueva cepa microbiana (es decir, no utilizada antes de 1997) para su uso en alimentación humana debería regirse por la normativa europea sobre nuevos alimentos (258/97/CE), y su aprobación exigiría una exhaustiva evaluación de su seguridad. No obstante, en la práctica ningún cultivo iniciador ni cepa probiótica se han evaluado de acuerdo con esta regulación 258/97/CE debido a la gran variedad de cepas utilizadas comercialmente antes de mayo de 1997, así como a la gran dificultad y arbitrariedad que entraña definir una cepa como nueva según la normativa europea. En general, los aspectos de la seguridad de los probióticos que más se cuestionan son el riesgo de translocación e infección y la transferencia de resistencias a antibióticos²⁶. También se considera necesaria la evaluación de la seguridad y la tolerancia de la administración de altas dosis de probióticos a largo plazo, y los efectos derivados de su capacidad inmunomoduladora, especialmente en neonatos y niños pretérmino^{21,24,26,27}.

En el contexto de la nueva regulación sobre alimentos funcionales, la seguridad de los que contengan probióticos será evaluada por la EFSA. Los expertos de la FAO/OMS² han propuesto en este sentido la evaluación de: a) la resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia

transferibles; b) actividades metabólicas perjudiciales (p. ej., producción de ácido D-láctico que puede producir cambios neurológicos); c) determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente productora; d) ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos, y e) estudios de vigilancia sobre los posibles efectos adversos de un consumo continuado.

Métodos de evaluación de la eficacia de los probióticos

El desarrollo de métodos más eficaces para evaluar la funcionalidad y la seguridad de los prebióticos *in vitro* e *in vivo* es una de las recomendaciones del comité de expertos de la FAO/OMS y una necesidad derivada de la nueva regulación⁶. Actualmente, los ensayos realizados *in vitro* no han sido del todo adecuados para predecir la funcionalidad de los probióticos *in vivo*⁶. Asimismo, se desconoce la relevancia que tienen algunas de las propiedades evaluadas *in vitro*, como la resistencia a condiciones gastrointestinales y la capacidad de adhesión, sobre el desarrollo de los efectos beneficiosos *in vivo*^{27,28}. El uso de modelos de experimentación animal resulta muy útil para evaluar *in vivo* la seguridad y los efectos de la administración de altas dosis, antes de desarrollar ensayos clínicos en humanos. En este sentido, se debe continuar avanzando en el desarrollo de mejores modelos de enfermedad. Los efectos beneficiosos deben ser confirmados con posterioridad mediante estudios clínicos en humanos al menos de fase 2 (eficacia). Dichos ensayos deben tener un adecuado diseño experimental, ser aleatorizados, controlados con placebo y, siempre que sea posible, doble ciego; además, deben realizarse al menos en dos centros independientes².

En revisiones recientes sobre la eficacia de los probióticos en la edad pediátrica, se concluye que se necesitan más estudios al respecto; si bien se ha comprobado su eficacia en determinadas patologías (tabla 2)^{21,24}, se prevé la solicitud de un número considerable de alegaciones dentro del nuevo marco regulador.

Etiquetado

La comisión de expertos de la FAO/OMS² ha recomendado incorporar en el etiquetado de alimentos que contienen probióticos los siguientes aspectos: a) nombre del género, especie y cepa de acuerdo con la nomenclatura internacionalmente reconocida; b) número mínimo de viables de la cepa probiótica al final de la vida útil; c) consumo recomendado para que la dosis del probiótico sea efectiva en relación con la mejora de salud declarada; d) efectos beneficiosos que puede proporcionar a la salud, y e) condiciones adecuadas de almacenamiento. Además, la nueva regulación sobre alimentos funcionales incluye mencionar la importancia de mantener una dieta equilibrada y un estilo de vida saludable, así como los posibles riesgos derivados de su consumo en exceso o de su consumo por grupos de población específicos. Asimismo, las referencias a beneficios generales sobre la salud o el bienestar sólo podrán efec-

TABLA 2

Efectos probados de los probióticos

1. Alteraciones digestivas

- Prevención de diarrea infecciosa por rotavirus
- Tratamiento de diarrea por rotavirus
- Tratamiento de diarrea por *Clostridium difficile*
- Tratamiento de diarrea asociada a antibióticos
- Efecto probable en el sobrecrecimiento bacteriano, la intolerancia a la lactosa y la diarrea del viajero

2. Alteraciones inmunológicas

- Prevención de la dermatitis atópica
- Tratamiento de la dermatitis atópica

tuarse si van acompañadas de alegaciones de salud específicas generalmente aceptadas e incluidas en la mencionada regulación, o nuevas alegaciones aprobadas por la EFSA y la Comisión Europea. De este modo se pretende informar a los consumidores sobre los alimentos beneficiosos para su salud utilizando un formato único, comprensible, preciso y garantizando su veracidad. ■

Bibliografía

1. European Commission in Concerted Action on Functional Foods Science in Europe. International Life Sciences Institute. Consensus Document. BMJ. 1999; 81: 1S-2S.
2. FAO/OMS. Report on Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. 2002. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
3. Von Wright A. Regulating the safety of probiotics-the European approach. *Curr Pharm Des.* 2005; 11: 17-23.
4. Aggett PJ, Antoine JM, Asp NG, Bellisle F, Contor L, Cummings JH, et al. PASSCLAIM: consensus on criteria. *Eur J Nutr.* 2005; 44 Supl 1: 5-30.
5. National Center of Excellence in Functional Foods. Health Claim Regulatory System. European Union. 2004. Disponible en: <http://www.nceff.com.au/pdf/EU.pdf>
6. Pineiro M, Stanton C. Probiotic bacteria: legislative framework-requirements to evidence basis. *J Nutr.* 2007;137(3) Supl 2: 850-853.
7. Del Piano M, Morelli L, Strozzi GP, Allesina S, Barba M, Deidda F, et al. Probiotics: from research to consumer. *Dig Liver Dis.* 2006; 38 Supl 2: 248-255.
8. Sanz Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *Int Dairy J.* 2007 (en prensa).
9. Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, et al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 38(2): 165-172.
10. Alberda C, Gramlich L, Meddings J, Field C, McCargar L, Kutsoyiannis D, et al. Effects of probiotic therapy in critically ill patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(3): 816-823.
11. Aggett PJ, Agostini C, Goulet O, Hernell O, Koletzko B, Lafeber HL, et al.; European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology

and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. The nutritional and safety assessment of breast milk substitutes and other dietary products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001; 32(3): 256-258.

12. Agostoni C, Goulet O, Kolacek S, Koletzko B, Moreno L, Puntis J, et al.; ESPGHAN Committee on Nutrition. Fermented infant formulae without live bacteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44(3): 392-397.
13. He F, Morita H, Kubota A, Ouwehand AC, Hosoda M, Hiramatsu M, et al. Effect of orally administered non-viable *Lactobacillus* cells on murine humoral immune responses. *Microbiol Immunol.* 2005; 49(11): 993-997.
14. Vinderola G, Matar C, Perdigon G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12(9): 1.075-1.084.
15. Sanders ME, Hamilton J, Reid G, Gibson G. A nonviable preparation of *Lactobacillus acidophilus* is not a probiotic. *Clin Infect Dis.* 2000; 44(6): 886.
16. Lee J, Rachmilewitz D, Raz E. Homeostatic effects of TLR9 signaling in experimental colitis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1.072: 351-355.
17. Marteau P. Living drugs for gastrointestinal diseases: the case for probiotics. *Dig Dis.* 2006; 24(1-2): 137-147.
18. Lee YK, Salminen S. The coming age of probiotics. *Trends in Food Sci. Technol.* 1995; 6: 241-245.
19. Saarela, M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnology.* 2000; 84: 197-215.
20. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2002; 109: 678-684.
21. Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 42(5): 454-475.
22. Larsen CN, Nielsen S, Kaestel P, Brockmann E, Bennedsen M, Christensen HR, et al. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr.* 2006; 60(11): 1.284-1.293.
23. Ahmed M, Prasad J, Gill H, Stevenson L, Gopal P. Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. *J Nutr Health Aging.* 2007; 11(1): 26-31.
24. NASPGHAN Nutrition Report Committee, Michail S, Sylvester F, Fuchs G, Issenman R. Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 43(4): 550-557.
25. Reid G. Safe and efficacious probiotics: what are they? *Trends Microbiol.* 2006; 14(8): 348-352.
26. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(6): 1.256-1.264.
27. Izquierdo E, Medina M, Ennahar S, Sanz Y. On the way to the probiotic concept. 40th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. ESPGHAN. PN1-13, p. 75.
28. Corthesy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr.* 2007; 137(3) Supl 2: 781-790.