

# **PROBIOTICI E SALUTE**

## **stato dell'arte basato sulle evidenze**

*a cura di*

Paolo Aureli

Lucio Capurso

Anna Maria Castellazzi

Mario Clerici

Marcello Giovannini

Lorenzo Morelli

Andrea Poli

Fabrizio Pregliasco

Filippo Salvini

Gian Vincenzo Zuccotti

*con la collaborazione di*

Claudio Cricelli, Silvio Danese, Gianfranco Delle Fave,

Giuseppe Fatati, Walter Marrocco

i contenuti scientifici del Position Paper sono stati approvati da

ADI, FIMMG, SIGE, SIMG, SINUPE

*con il coordinamento di*

NFI

Nutrition Foundation of Italy

## **Curatori**

Paolo Aureli, *Dirigente di Ricerca, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Lucio Capurso, *Consulente “Centro Ricerche Cliniche”, Azienda Ospedaliera San Filippo Neri, Roma*

Anna Maria Castellazzi, *Direttore Centro Interuniversitario di Ricerca su Immunità e Nutrizione, Dipartimento di Scienze Pediatriche, Università di Pavia*

Mario Clerici, *Professore ordinario di Immunologia, Università di Milano, Direttore Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, e Direttore Scientifico IRCCS SM Nascente, Fondazione Don Gnocchi, Milano*

Marcello Giovannini, *Direttore Scuola di Specializzazione di Pediatria, Università di Milano, Ospedale San Paolo-Milano*

Lorenzo Morelli, *Professore ordinario di Microbiologia Alimentare e Biotecnologie, Istituto di Microbiologia Università Cattolica SC, Piacenza*

Andrea Poli, *Direttore Scientifico Nutrition Foundation of Italy, Milano*

Fabrizio Pregliasco, *Ricercatore Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia, Virologia, Università di Milano*

Filippo Salvini, *Dottore di Ricerca in Nutrizione Clinica, Università di Milano, Dirigente medico Clinica Pediatrica Ospedale San Paolo-Milano*

Gian Vincenzo Zuccotti, *Direttore Clinica Pediatrica, Università di Milano, Ospedale L. Sacco, e Professore ordinario presso la facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Milano*

## **Con la collaborazione di:**

Claudio Cricelli (Firenze), Silvio Danese (Istituto Clinico Humanitas, Milano), Gianfranco Delle Fave (Sapienza Università di Roma), Giuseppe Fatati (A.O. Santa Maria, Terni), Walter Marrocco (Roma)

## **I contenuti scientifici del Position Paper sono stati approvati da:**

ADI (Associazione Italiana di Dietetica e Nutrizione)

FIMMG (Federazione Italiana Medici di Medicina Generale)

SIGE (Società Italiana di Gastroenterologia)

SIMG (Società Italiana di Medicina Generale)

SINUPE (Società Italiana di Nutrizione Pediatrica)

Realizzato con il contributo incondizionato di:



FEDERCHIMICA



*Realizzazione editoriale e progetto grafico*

Pacini Editore S.p.A.

Via A. Gherardesca 1

56121 Pisa

[www.pacinimedicina.it](http://www.pacinimedicina.it)

[info@pacinieditore.it](mailto:info@pacinieditore.it)

L'editore resta a disposizione degli aventi diritto con i quali non è stato possibile comunicare e per le eventuali omissioni.

Le fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume/fascicolo di periodico dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633. Le riproduzioni effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da AIDRO, Corso di Porta Romana n. 108, Milano 20122, e-mail [segreteria@aidro.org](mailto:segreteria@aidro.org) e sito web [www.aidro.org](http://www.aidro.org)

<b>Indice</b>	
Prefazione	05
Presentazione	07
Introduzione	11
Il <i>microbiota</i> ed il sistema immune	13
Dal <i>microbiota</i> al probiotico	14
Aspetti critici della relazione tra probiotici ed organismo ospite	16
Probiotici e risposta immune	19
Probiotici e salute	20
Malattie allergiche ed atopiche in età pediatrica	23
Infezioni respiratorie	24
Effetti sull'apparato digerente	26
Conclusioni e Consensus	28
Appendice	34



## Prefazione

I probiotici sono costituenti dalle caratteristiche pressoché esclusive nel variegato panorama delle sostanze impiegabili negli alimenti e negli integratori. Si tratta infatti di microrganismi vitali che devono rimanere tali in numero significativo fino al termine di conservazione del prodotto per esercitare effetti utili per la salute.

Per il loro potenziale benefico nella costruzione di una dieta complessivamente adeguata, gli alimenti tradizionalmente fonte di probiotici (yogurt e latti fermentati in primis) sono oggi giustamente da annoverare tra quelli “protettivi”, insieme a pesce, frutta e verdura.

Per la stessa finalità salutistica, si registra un impiego crescente di probiotici proposti tal quali al consumo come integratori alimentari.

Attualmente, a livello comunitario i *claims* nutrizionali e sulla salute sono disciplinati dal regolamento (CE) 1924/2006, che ne prevede l’autorizzazione in base a dati specifici, comprendenti anche studi clinici.

A seguito dell’applicazione di tale regolamento, sta emergendo una serie di difficoltà per il riconoscimento degli effetti sulla salute di molte sostanze “funzionali” impiegate come ingredienti alimentari, tra cui in prima fila i probiotici.

Si aggiunga che all’interno dello stesso regolamento (CE) 1924/2006 si registra un approccio sproporzionato all’autorizzazione dei *claims* in funzione della natura delle sostanze in esame, che sta portando ad una forte penalizzazione delle sostanze diverse da vitamine e minerali.

Basti considerare che per ciascuna vitamina e ciascun minerale l’EFSA ha vagliato favorevolmente come *claims* effetti “utili” per un largo numero di funzioni dell’organismo, a prescindere dalla significatività del ruolo svolto per un plausibile svolgimento degli effetti stessi.

Di conseguenza, ci si appresta ad esempio ad autorizzare che il solo magnesio, piuttosto che il solo manganese, piuttosto che il solo calcio (senza alcuna considerazione per la specificità del ruolo di tali minerali e, peraltro, con un apporto minimo del solo 15% della RDA) “contribuisce al mantenimento di una normale struttura ossea”.

È del tutto evidente che un approccio del genere trova dei limiti e delle contraddizioni. Il *claim* riferito al minerale con ruolo meno specifico e meno incidente, o che abbia una diffusione ubiquitaria e non selettiva negli alimenti, perde il significato di elemento orientativo per favorire corrette scelte alimentari, e quindi comportamenti “efficaci” da parte del consumatore, che tra le finalità del regolamento (CE) 1924/2006 sarebbe quella “sanitaria”.

In ogni caso, se ci si appresta a riconoscere che la vitamina A o la vitamina B6 o la vitamina B12 o la vitamina C o il ferro o lo zinco, assunti insieme o singolarmente con un integratore o un alimento in quantità pari al 15% della RDA, sono in grado di “contribuire alle normali funzioni del sistema immune”, non si può non ammettere che alla luce del complesso delle evidenze disponibili vi siano vari probiotici meritevoli di analogo riconoscimento.

Per gli apporti utili, le linee guida ministeriali su probiotici e prebiotici partono dal presupposto che “è impossibile poter fornire su questo punto indicazioni precise perché sono molti i fattori che influenzano l’attività dei ceppi probiotici una volta ingeriti”. Senza contare la sinergia che potrebbe derivare dalla contemporanea presenza nei prodotti di prebiotici o di sostanze di altro tipo.

Conseguentemente, la quantità giornaliera minima indicata in almeno un miliardo di cellule vive, a prescindere dal ceppo in questione, rappresenta solo un parametro orientativo, potendo risultare sufficienti anche quantitativi diversi, se comprovati da specifici studi.

Peraltro tali studi, per supportare *claims* sulla salute autorizzabili ai sensi del regolamento (CE) 1924/2006, dovrebbero documentare un effetto specifico e non limitarsi ad attestare una avvenuta colonizzazione. Alla luce della posizione dell’EFSA, infatti, una semplice dichiarazione del tipo “Favorisce il riequilibrio della flora intestinale”, senza l’indicazione dei vantaggi conseguenti, non si configura come un *claim* sulla salute.

La “efficacia” è subordinata evidentemente al livello di qualità dei prodotti contenenti probiotici. In fase di produzione, pertanto, serve una accurata selezione delle materie prime con una appropriata classificazione, identificazione e denominazione del ceppo specifico, seguita dall’attuazione di piani di autocontrollo adeguatamente mirati al superamento dei vari punti critici individuati.

In conclusione, per disporre di prodotti effettivamente attivi e per venire al riconoscimento formale dei loro effetti benefici, superando la situazione attuale, occorre tendere ad elevare il livello medio della loro “qualità funzionale” nonché quella dei dati e della documentazione a supporto delle loro proprietà, auspicando nel contempo un riproporzionamento del sistema sulle evidenze ammissibili come prova per effetti sulla salute di sostanze diverse da vitamine e minerali.

Milano, settembre 2010

Bruno Scarpa  
Ministero della Salute

## Presentazione

La letteratura scientifica relativa ai probiotici è in costante aumento, e sono ormai numerosi gli articoli pubblicati su riviste di prestigio che dimostrano effetti benefici di specifici ceppi di batteri probiotici sull'organismo umano.

Le aree della funzionalità intestinale normale o patologica e della modulazione dei meccanismi dell'immunità sono quelle nelle quali, ad oggi, sono stati ottenuti i risultati più favorevoli: ma riscontri sperimentali preliminari (come il rilievo di significative differenze tra il *microbiota* di soggetti obesi e normopeso) permettono di intravedere effetti potenziali di interesse anche in altre aree della salute umana.

Su temi specifici (ad esempio il controllo di alcuni disturbi intestinali acuti o cronici), inoltre, anche approcci molto rigorosi, di tipo metanalitico, hanno documentato effetti favorevoli statisticamente significativi e clinicamente discernibili.

L'attiva ricerca nel settore deve tuttavia fronteggiare alcune complessità e specificità, in parte di natura scientifica ed in parte di carattere regolatorio, che meritano di essere considerate con attenzione.

Sul piano scientifico esiste ormai consenso sul fatto che una caratterizzazione tassonomica precisa ed univoca del ceppo probiotico utilizzato è irrinunciabile in qualunque lavoro sperimentale. L'azione di un probiotico dipende infatti, in tutta evidenza, dall'interazione tra le sue attività metaboliche o funzionali e quelle dell'ospite: ed è quindi certamente ceppo-specifica.

Ma non va trascurato che l'interazione stessa, condizionata da numerosissimi fattori (il ceppo utilizzato, le sue eventuali combinazioni con altri probiotici, la carica batterica somministrata, la matrice alimentare impiegata, l'alimentazione, il *microbiota*, gli aspetti fisiologici e metabolici del ricevente, per citarne solo alcuni) è esplorabile solo con metodiche di notevole rigore, e soprattutto implica, per raggiungere un adeguato livello di certezza in relazione ad effetti dei probiotici di possibile rilevanza pratica, l'esecuzione di studi nell'uomo con *end-points* ben codificati.

L'allestimento di tali studi non è sempre agevole. Su alcune definizioni specifiche (basti pensare a quella di un "sano ed equilibrato" *microbiota* intestinale), in realtà, non esiste nemmeno consenso nell'ambito della Comunità Scientifica: e la scelta di appropriati *end-points*, in questo settore, è di conseguenza oggettivamente complessa.

L'esecuzione di lavori sperimentali nell'area di ricerca dei probiotici è poi ulteriormente complicata, sul piano normativo, dall'interazione con la normativa "claims" (Regolamento Comunitario 1924/2006), relativa ad alimenti ed integratori, cui i prodotti contenenti probiotici devono necessariamente fare riferimento.

Gli alimenti, come i latti fermentati, o gli integratori contenenti probiotici, infatti, non possono vantare (nell'ambito della normativa attuale) effetti di natura preventiva o terapeutica nei riguardi di alcuna malattia. Questo limita l'allestimento di studi su soggetti portatori di patologie (eventuali effetti favorevoli su tali condizioni non potrebbero essere utilizzati nella comunicazione di prodotto): ma è piuttosto probabile, d'altra parte, che lo studio di soli sog-

getti “sani” solo in casi specifici potrà consentire di evidenziare vantaggi significativi per il consumatore.

È infatti vero che alcuni parametri misurabili di funzione intestinale, influenzabili mediante l’uso di probiotici (ad esempio la frequenza di evacuazione) possono variare in modo anche rilevante nell’ambito della cosiddetta “normalità”, ed è quindi possibile modificarli in modo significativo senza dover necessariamente trattare condizioni di partenza patologiche; si pensi tuttavia alla sintomatologia soggettiva addominale fastidiosa (“discomfort”), che rappresenta un tipico ambito di uso potenziale dei probiotici, e che presenta una sorta di “continuum” dalla normalità al quadro della *Irritable Bowel Disease* (IBD): è evidente che studiare soggetti con totale assenza di sintomi intestinali renderebbe di fatto impossibile documentare i potenziali effetti dei probiotici su questa sintomatologia intestinale, per definizione soggettiva, così come è altrettanto vero che la stessa presenza di sintomi potrebbe far classificare i soggetti che ne siano portatori come “pazienti”, limitando così la trasferibilità dei dati raccolti trattandoli con probiotici alla popolazione di riferimento cosiddetta “sana”.

È ben vero che la ricordata normativa *claims* permette di documentare (nell’ambito del cosiddetto art. 14) effetti di “riduzione del rischio di malattia”: ma la complessità metodologica di una tale dimostrazione non va sottovalutata. Si pensi, ad esempio, agli studi relativi al potenziamento delle difese immunitarie di soggetti in età geriatrica o infantile, cui potrà far seguito una minore incidenza di patologie di natura virale: per dimostrare che la probabilità di un evento di questa natura (ad esempio una sindrome influenzale) è effettivamente ridotta sarà necessario studiare molte centinaia di pazienti per lunghi periodi di tempo (dell’ordine di alcuni mesi), rilevando con accuratezza quadri clinici di diagnosi non sempre univoca, in studi controllati di confronto con un appropriato placebo.

Nonostante le intuitive difficoltà (anche economiche) del loro allestimento, studi di questa natura sono stati pubblicati: ma il loro numero è ridotto, ed i risultati spesso al limite della significatività statistica.

In questo contesto, non deve probabilmente sorprendere il fatto che l’Autorità Europea che si occupa della valutazione dei *claims* (EFSA) abbia rigettato la quasi totalità delle richieste di *claims* stessi proposte dalle aziende relativamente a prodotti contenenti probiotici.

Ma c’è un problema in più: molti *claims* non sono stati accettati per problemi metodologici facilmente superabili (ad esempio, l’insufficiente caratterizzazione del ceppo usato); ma i media (i cui interventi e le cui posizioni, che influenzano in modo rilevante i consumatori, sono cruciali per le aziende attive nell’area del food e degli integratori) hanno spesso interpretato il parere EFSA in modo non corretto. I *claims* non autorizzati da EFSA sono stati in genere presentati sulla stampa come “ingannevoli” per il consumatore: trasformando la non completezza delle evidenze scientifiche prodotte (e va sottolineato che lo standard richiesto da EFSA è certamente molto elevato), in un’assenza totale di evidenze, molto lontana dalla realtà dei fatti.

In uno scenario così complesso, NFI ha ritenuto opportuno riunire un gruppo di riconosciuti esperti nazionali del settore che esaminasse, con un approccio il più possibile “evidence-based”, la letteratura scientifica sui probiotici, con l’obiettivo di presentarne una sintesi critica destinata al mondo medico, ai media, ed in generale a tutte le persone interessate.

Il documento intende fornire anche ai consumatori (seppure per via “mediata”) una sintesi documentata dello stato attuale della scienza dei probiotici; ed alle aziende del settore, criteri di riferimento per continuare nel modo più appropriato la ricerca sui loro prodotti, cruciale per proseguire nello sviluppo di un segmento del mercato del food e degli integratori che, anche sul piano strettamente economico, è di notevole importanza per la nostra realtà nazionale.

Milano, settembre 2010

Nutrition Foundation of Italy



## Introduzione

Il *microbiota* intestinale (termine che ha ormai sostituito la vecchia denominazione “microflora”) è un ecosistema formato da una pluralità di nicchie ecologiche, che ospitano una popolazione batterica formata da numerosissime specie e da un’innumerabile quantità di ceppi<sup>1-6</sup>. È a stretto contatto con la mucosa intestinale, o interfaccia epiteliale, che costituisce, dopo quella respiratoria, la più grande superficie libera del nostro organismo, essendo pari a circa 250-400 m<sup>2</sup>.

Il *microbiota* e la mucosa, insieme al muco, formano la cosiddetta *barriera mucosa*, importante sistema di difesa nei confronti dei fattori potenzialmente immunogenici o patogeni presenti nel lume. L’interfaccia epiteliale, infatti, separa il lume, contenente il *microbiota* ed i residui dell’alimentazione e delle secrezioni organiche (salivari, gastriche, pancreatiche, biliari, intestinali), dal sistema immunitario specifico associato alla mucosa (GALT).

I microrganismi che costituiscono il *microbiota* si distribuiscono lungo l’apparato digerente in modo disomogeneo, come riassunto nella Tabella I.

**Tabella I.** Distribuzione del microbiota nell’apparato digerente.

Sede	Cellule batteriche per g di contenuto intestinale	Note
Stomaco, duodeno	< 10 <sup>3</sup>	Lattobacilli, Streptococchi. HCl, bile e peristalsi inibiscono l’adesione dei batteri e ne ostacolano la colonizzazione
Digiuno, ileo Ileo distale	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup>	Scarse informazioni: probabile attività di fermentazione dei carboidrati
Intestino crasso	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup> (prevalenza di anaerobi)	Sede della maggior parte delle attività del microbiota

Questi microrganismi giocano un ruolo di rilievo, anche attraverso le loro attività metaboliche, nell’utilizzazione dei nutrienti assunti con gli alimenti; essi influenzano inoltre in modo significativo anche lo sviluppo ed il funzionamento del sistema immune, e di altre funzioni dell’organismo umano<sup>7-10</sup>.

Le cellule che costituiscono il sistema immune, responsabili delle risposte che difendono l’organismo dai patogeni, sono infatti concentrate in massima parte in strutture linfatiche che si trovano proprio nella membrana basale, o lamina propria, del tratto gastroenterico (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT). Fanno parte del GALT numerose strutture follicolari e le placche di Peyer, oltre ad aggregati di linfociti T, di *antigen presenting cells* (APC) e di linfociti B, caratterizzati dalla produzione di IgA, gli anticorpi secretori tipici dell’immunità mucosale. Le IgA sono resistenti alla proteolisi e non attivano il complemento: rivestono dunque una funzione protettiva senza avere un’azione proinfiammatoria. I T linfociti sono presenti sia come linfociti T helper CD4+, nelle loro declinazioni (TH1, TH2, TH17, TH9), i T-citotossici CD8+, le cellule gd e le cellule T regolatorie, o Treg.

Il *microbiota* di ogni individuo ha una sua specifica “impronta digitale batterica”, cioè un profilo di specie suo proprio, diverso da quello di altri individui; esiste tuttavia un *core* di almeno 57 specie batteriche che può essere considerato comune a tutti.

Le divisioni batteriche (i *phyla*) dominanti sono due, i *Bacteroidetes* e i *Firmicutes*, che costituiscono più del 90% delle categorie filogenetiche presenti nell'intestino umano, almeno nella sua parte distale.

Il *microbiota* dell'intestino umano è oggi oggetto di ricerche condotte con tecniche molto avanzate, che comprendono anche lo studio del genoma batterico (*microbioma*), ed i cui risultati vengono pubblicati sulle riviste scientifiche più prestigiose <sup>1-6</sup>. Due grandi progetti, basati sul sequenziamento sistematico del DNA del *microbiota*, sono al momento in corso: lo *Human Microbiome Project* (HMP), negli USA, e il *Metagenomics of Human Intestine* (metaHIT), in corso in Europa. Di quest'ultimo è stato pubblicato un primo report <sup>1</sup>, che conferma la presenza, nel *microbiota* stesso, di una grande varietà di specie batteriche: oltre 1.000 nei 124 individui campionati, e circa 160 per ogni individuo studiato.

Un risultato sorprendente dell'analisi meta-genomica è quello che vede tuttavia il 15% delle sequenze determinate codificare per funzioni non note o indefinite, lasciando così chiaramente intendere che la reale comprensione del ruolo svolto dalla biomassa batterica intestinale richiederà ancora molti anni di ricerca e analisi.

Le due caratteristiche peculiari del *microbiota* intestinale umano in termini genomici sono:

- la capacità di aderire alle proteine dell'ospite (collagene, fibrinogeno, fibronectina), confermando così una serie di dati accumulati negli anni mediante altre tecniche analitiche, che vedono nell'adesione un requisito fondamentale per la possibilità di persistenza di un ceppo batterico nel sistema gastro-intestinale;
- la possibilità di fermentare i carboidrati.

L'interazione tra *microbiota* ed ospite produce, per entrambi, vantaggi di varia natura. Le principali funzioni del *microbiota*, ad oggi note, dotate di un effetto favorevole per l'ospite sono le seguenti:

- *partecipazione alla formazione della barriera intestinale* (v. Box 1, *Il sistema di difesa della mucosa intestinale*, p. 13);
- *resistenza alla colonizzazione*: Nissle nel 1916 <sup>11</sup> dimostrò per la prima volta il ruolo del *microbiota* umano nel conferire resistenza alle infezioni tifoidi mediate da *Salmonella*, identificando il *microbiota* stesso, come sarà confermato in seguito, come la prima barriera di difesa contro l'invasione da parte di batteri patogeni <sup>12</sup>;
- *produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA)*: i metaboliti finali dei processi fermentativi svolgono nell'uomo funzioni fisiologiche rilevanti (l'acido acetico per i muscoli, il cuore ed il cervello; l'acido propionico per la gluconeogenesi; l'acido butirrico per la nutrizione degli enterociti <sup>13</sup>;
- *produzione di vitamine*: specie del gruppo B e K <sup>14</sup>;
- *interazioni con il sistema immunitario di mucosa* <sup>15 16</sup>;
- *degradazione di xenobiotici*: grazie a geni in grado di sintetizzare enzimi ad attività catabolica verso questi composti <sup>1</sup>.

È importante in prospettiva osservare anche che la diversa capacità del *microbiota*, a seconda della sua composizione, *di "estrarre" le calorie* della dieta<sup>17 18</sup> potrebbe rappresentare una possibile chiave di interpretazione fisiopatologica del sovrappeso e dell'obesità. La Tabella II riassume alcuni aspetti funzionali o anatomici dell'organismo ospite imputabili alla presenza ed all'attività del *microbiota* intestinale.

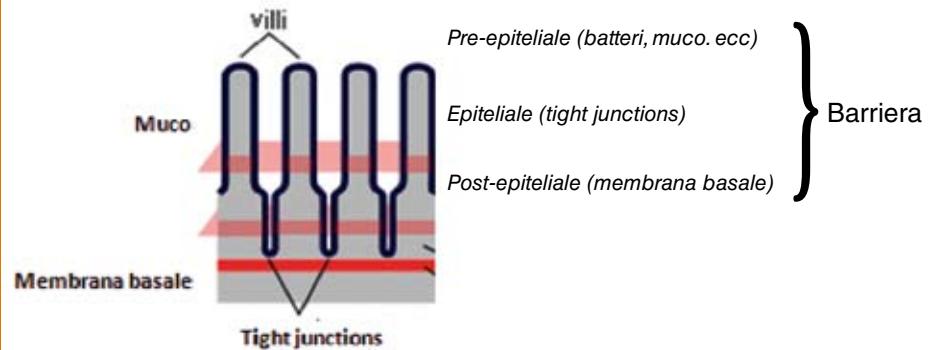
**Tabella II.** Effetti del microbiota sull'organismo ospite.

	GAC (animali germ-free)	MAC (ex germ-free riconvenzionalizzati)
Epitelio intestinale	Sottile	Spessito
Cinetica degli enterociti	Lenta	Veloce
Metabolismo acidi biliari	Deconjugazione significativa	Deconjugazione assente
Metabolismo Colesterolo	Assenza di coprostanolo	Presenza di coprostanolo
Produzione SCFA	Produzione ridotta	Produzione rilevante
Attività immunologica	Ridotta	Presente

#### Box 1. Il sistema di difesa della mucosa intestinale

Il sistema di difesa della mucosa intestinale può essere diviso in tre componenti principali:

1. *pre-epiteliale*, costituito da muco, *trefoil peptides* e lipidi che formano un gel continuo in cui è secreto un fluido ricco in bicarbonati che mantengono un pH neutro;
2. *epiteliale*, costituito da cellule legate fra loro dalle *tight junctions* (un complesso di proteine occludenti come le zonuline ZO-1, ZO-2, ZO-3, le claudine, le cinguline, le 7H6, le occludine, le caderine) che impediscono il passaggio di materiale fra cellula e cellula: la funzionalità delle *tight junctions* può essere modulata dall'espressione di tali proteine;
3. *post-epiteliale*, formato dai costituenti della lamina propria.



## Il *microbiota* ed il sistema immune

La relazione che si stabilisce tra *microbiota* ed ospite può essere di tipo commensale o simbiotico. I batteri del *microbiota*, come si ricordava, rivestono un'importanza fondamentale nel facilitare l'assorbimento degli alimenti (per esempio permettendo l'idrolisi di alcuni carboidrati non altrimenti digeribili per l'organismo) e nel prevenire la colonizzazione intestinale da parte di microrganismi patogeni, e quindi la loro penetrazione nell'organismo. È quindi

fondamentale che il sistema immune riconosca i componenti del *microbiota* in quanto tali, e stabilisca una condizione di tolleranza nei loro confronti.

La tolleranza nei confronti del *microbiota* è mediata da alcuni meccanismi complementari:

- i batteri del *microbiota* non esprimono fattori di virulenza (per esempio secondariamente a modificazioni chimiche dei PAMP, o *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), strutture antigeniche riconoscibili dai TLR (*toll-like receptors*) presenti sulla superficie delle cellule del sistema immune), oppure
- alcuni batteri commensali sono in grado di sopprimere processi flogistici (per esempio tramite la “down regulation” delle attività di NF- $\kappa$ B<sup>19</sup>).

La definizione oggi internazionalmente accettata di “probiotico” è quella elaborata da un gruppo di esperti congiuntamente convocati nel 2001<sup>20</sup> dalla FAO e dall’OMS: “*Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host*”. In Italia il Ministero della Salute<sup>21</sup> ha definito i probiotici “*microrganismi che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l’organismo*” sostanzialmente riprendendo la definizione delle due organizzazioni ONU. È da sottolineare come nella definizione FAO/OMS non si faccia cenno all’origine umana del ceppo batterico come criterio per la selezione e definizione di probiotico e ci si basi invece sul tipo di effetto causato<sup>22</sup>.

Questo trasferimento della definizione dagli scopi scientifici a quelli regolatori ha avuto la conseguenza di far ritenere il termine probiotico, che nella sua definizione implica un beneficio per la salute, una vera e propria “indicazione sulla salute” (o *health claim*) ai sensi del Regolamento CE 1924/2006; se confermata, questa interpretazione da un lato comporterà restrizioni all’uso del termine negli alimenti e negli integratori, ma permetterà probabilmente dall’altro al consumatore di identificare immediatamente i ceppi (e quindi i prodotti) per i quali sia stato dimostrato un effetto favorevole sulla salute.

Dal punto di vista funzionale numerosi dati sperimentali suggeriscono che i probiotici possono concorrere al rinforzo delle attività della barriera mucosa intestinale, in particolare influendo sulle cellule epiteliali intestinali (CEI) e sui macrofagi.

Una recente rassegna sintetica<sup>23</sup> sull’argomento ha richiamato l’attenzione sui meccanismi più importanti e sulla diversità di azione dei singoli ceppi a livello delle cellule epiteliali intestinali (CEI) e dei macrofagi. Un elenco dei possibili meccanismi di modulazione da parte dei probiotici dei sistemi di segnalazione nelle cellule epiteliali intestinali (CEI) e nei macrofagi, tratta dalla review citata<sup>23</sup> è presentata in calce a questo documento.

I meccanismi più importanti, a tale proposito, sono schematizzati nel Box 2 *Meccanismi di interazione tra probiotici e cellule epiteliali intestinali*.

## Dal *microbiota* al probiotico

## Box 2. Meccanismi di interazione tra probiotici e cellule epiteliali intestinali

- *Induzione della sintesi di heat shock proteins citoprotettive*  
Le cellule epiteliali intestinali (CEI), quando vengono a contatto con stress termici, osmotici, ossidativi o di altro tipo, mettono in azione un sistema di “tolleranza allo stress” basato su l’induzione delle cosiddette *heat shock proteins* (*hsp*) cellulari. Nell’intestino le *heat shock proteins* indotte includono la proteina *hsp25*, che stabilizza l’actina, e la proteina *hsp72*, che previene la denaturazione cellulare. Tali meccanismi contribuiscono a mantenere efficienti le *tight junctions* fra le CEI, promuovendo così la funzione della barriera mucosa <sup>24</sup>. Nell’intestino i probiotici inducono la produzione di *heat shock proteins* citoprotettive <sup>25</sup>.
- *Modulazione dei sistemi di segnalazione infiammatori nelle CEI*  
Le CEI sono munite di sistemi di segnalazione chiave per l’attivazione della risposta immune in risposta ad una varietà di stimoli. Il principale di questi sistemi è NF $\kappa$ B, presente nel citoplasma nella sua forma inattiva, legato alle molecole inibitorie della famiglia I $\kappa$ B. In presenza di stimoli pro-infiammatori, I $\kappa$ B viene fosforilata, si stacca da NF $\kappa$ B e permette così all’NF $\kappa$ B stesso di migrare dal citoplasma al nucleo, attivando la trascrizione di geni specifici <sup>26</sup>. Alcuni probiotici modulano la degradazione di I $\kappa$ B $\alpha$ , mentre altri stimolano NF $\kappa$ B ad incrementare la secrezione di specifiche citochine <sup>27</sup>. *Lactobacillus plantarum* inibisce l’attività di NF $\kappa$ B e la degradazione di I $\kappa$ B *in vitro* <sup>28</sup>. Un altro bersaglio molecolare modulato da parte dei probiotici è il PPAR $\gamma$ , un recettore nucleare che può regolare il livello dell’infiammazione intestinale, e che può in particolare svolgere un ruolo nell’attenuare alcune patologie intestinali infiammatorie inibendo l’attività di NF $\kappa$ B (PPAR $\gamma$  è infatti ridotto nelle CEI di pazienti con malattie infiammatorie intestinali, o IBD) <sup>29 30</sup>. Il trattamento con ceppi specifici di probiotici può aumentare l’espressione di PPAR $\gamma$ , e migliorare quindi l’infiammazione in pazienti con IBD <sup>31 32</sup>.
- *Regolazione dell’apoptosi*  
Alcuni probiotici possono regolare l’apoptosi (la cosiddetta “morte programmata”) delle CEI. *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 può attivare una proteina ad azione anti-apoptotica ed inibire una proteina ad azione pro-apoptotica in CEI stimolate con varie citochine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ - $\beta$  o IFN $\gamma$ ). Altri esperimenti indicano che LGG attiva la produzione di due proteine, p75 e p40, che promuovono la proliferazione cellulare ed attivano la proteina Akt anti-apoptotica <sup>33</sup>. La capacità dei probiotici di regolare l’apoptosi può rappresentare anche un’utile strategia per il controllo delle infezioni intestinali <sup>34</sup>.
- *Modulazione dei sistemi di segnalazione dei Macrofagi*  
A livello intestinale i probiotici modulano diversi sistemi di segnalazione dei macrofagi, con effetti su l’immunità mucosale (v. Appendice).

Gli aspetti pratici più rilevanti della relazione tra probiotici ed ospite, da definire anche per permettere un uso razionale dei probiotici stessi in un'ottica di miglioramento delle funzioni fisiologiche dell'ospite, sono i seguenti:

1. importanza della somministrazione di batteri vivi; caratterizzazione funzionale ed identificazione dei batteri;
2. quantità di batteri da somministrare (in relazione al ceppo batterico impiegato, alla associazione con altri ceppi di una stessa o differente specie, alla matrice alimentare prescelta ed alla forma industriale di presentazione) e tecniche di conteggio degli stessi;
3. benefici per l'ospite e loro definizione;
4. sicurezza d'uso (anche alla luce dei due documenti FAO/WHO del 2001 e del 2002 e del concetto di QPS per le valutazioni di sicurezza batterica, recentemente introdotto da parte di EFSA).

La tradizione che risale a Metchnikoff prevede sia l'uso di una matrice alimentare fermentata da parte di un batterio "benefico" di una matrice alimentare che l'integrazione della dieta con un "concentrato" batterico; in ambedue i casi fornendo sempre al consumatore batteri vivi, capaci di superare le barriere gastriche ed ileali e quindi di riprodursi nell'intestino crasso: è un concetto di tipo ecologico che sostiene l'uso di batteri vivi, e quindi capaci di insediarsi fra altri batteri vivi (il *microbiota*) ed esercitare a tale livello funzioni che comportano un'attività metabolica. Gli studi che supportano l'efficacia di batteri vivi sono numerosi; pochi invece, e con risultati conflittuali, quelli che comparano gli effetti dello stesso ceppo somministrato in forma vitale o meno.

Si deve quindi concludere che, in virtù delle consolidate definizioni e per una migliore informazione del consumatore, il termine probiotico sia da riservare a prodotti contenenti cellule vive e vitali.

L'identificazione (a livello di ceppo) è necessaria, sia per motivi di sicurezza che per avere la certezza dello svolgimento di un'azione benefica vera e propria. Numerose evidenze, infatti, indicano che ceppi differenti della stessa specie possono avere effetti anche grandemente differenti sull'ospite (Tab. III).

## Aspetti critici della relazione tra probiotici ed organismo ospite

### 1. I probiotici come batteri vivi

**Tabella III.** Differenza di azione probiotica fra ceppi della stessa specie. Esempi riferiti solo all'azione verso l'ospite e non alle capacità di sopravvivenza e persistenza.

Specie/ceppo	Azione riscontrata	Referenza
Bifidobacterium longum W11	Bassa induzione di IL10 e alta induzione di Th1	Medina et al., 2007
Bifidobacterium longum NCIMB 8809 e Bifidobacterium longum BIF53	Alta induzione di IL10 bassa induzione di Th1	
Lactobacillus rhamnosus GG e Lactobacillus rhamnosus 1970-2	Differenza nella capacità di colonizzazione in vivo	Jacobsen et al., 1999
Lactobacillus crispatus M247 e Lactobacillus crispatus MU5	Differenza nella capacità di colonizzazione in vivo	Cesena et al., 2001

In pratica, la specie deve essere identificata mediante la determinazione della sequenza nucleotidica del DNA che codifica per il 16S RNA, mentre il ceppo deve essere caratterizzato mediante il profilo di macro-restrizione del cromosoma, determinato mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE). Viene inoltre raccomandato il deposito in una collezione internazionale di ceppi.

Ceppi della stessa specie, come si ricordava, possono esercitare azioni diverse, a volte opposte. La differenza di azione fra i vari ceppi è così consolidata dalla letteratura scientifica da esser riportata nel documento FAO/OMS: *“data obtained with one specific probiotic food cannot be extrapolated to other foods containing that particular probiotic strain or to other probiotic microorganisms”*<sup>20</sup>, come pure nel documento AFSSA (*Agencie Française de sécurité Sanitaire des Aliments*): *“The quantity of probiotics passing live through the gut depends on the strain, the dose ingested, factors related to the host and the vector food”*<sup>35</sup>.

I mezzi analitici da impiegare sono ormai ben consolidati, tanto da essere specificati in una serie di documenti:

- report FAO/WHO 2001<sup>20</sup>;
- linee guida Ministero della Salute 2005<sup>21</sup>;
- opinioni EFSA emesse tra il 2009 e il 2010.

## 2. La quantità

Poco è noto della quantità ottimale di batteri probiotici vivi da somministrare; tale quantità non è in realtà di facile determinazione, è ceppo-dipendente e, probabilmente, è anche funzione del tipo di beneficio che si vuole apportare con la somministrazione (effetti funzionali diversi possono necessitare di quantità differenti di cellule probiotiche vive). Certamente tale valore non può tuttavia essere basso, se si intende influenzare in modo misurabile la composizione del *microbiota* del ricevente. Va enfatizzato il fatto che nel caso delle associazioni micobiche ogni specie “concorrente” ad un’azione funzionale deve avere una sua carica significativa.

In mancanza di specifici studi dose-risposta, comunque, possiamo ricordare quanto riportato da AFSSA<sup>35</sup> in alcuni punti del suo documento:

- *“The dose of probiotics ingested is an important factor to obtain high concentrations in the various compartments of the gastrointestinal tract”*;
- *“It is often said that probiotic concentrations must be greater than or equal to 10<sup>6</sup> CFU/mL in the small intestine (ileum) and 10<sup>8</sup> CFU/g in the colon, but the scientific basis for these statements is relatively weak”*;
- *“The concentrations in the colon have been proposed because they correspond to less than 1/1000 of the autochthonous flora present (which it could be reasonably expected has more chance of being active than flora present at even lower levels)”*.

Da ricordare inoltre come non esistano evidenze scientifiche che provino un effetto sinergico di due o più ceppi batterici nel determinare un effetto funzionale o metabolico nell'uomo, anche se esistono supporti teorici al fatto che l'assunzione di due o più specie batteriche possa dare effetti funzionali additivi o sinergici;

va comunque ricordato che alcuni lavori, sebbene limitati, sembrerrebbero suggerire in alcuni casi un effetto incrociato negativo.

I probiotici possono migliorare, nell'ambito della normalità fisiologica, aspetti del funzionamento intestinale (ad esempio la frequenza di evacuazione o le sue caratteristiche soggettive) o di altre funzioni dell'organismo. Il consumo di probiotici può peraltro essere utile sia per ridurre il rischio di specifiche patologie, sia per attenuarne la sintomatologia oggettiva o soggettiva, qualora siano manifeste.

Sul piano formale, va sottolineato che gli effetti dei probiotici sono stati osservati prevalentemente studiando gruppi di soggetti affetti da patologie. Tale scelta si basa su motivi di carattere essenzialmente metodologico: non è infatti agevole documentare effetti favorevoli significativi di un probiotico nella condizione di sostanziale assenza di anomalie di tipo funzionale tipica della popolazione sana.

Questo approccio ha permesso di ottenere risultati favorevoli, ma pone il problema della trasferibilità di quanto osservato a quella parte di popolazione che costituisce il consumatore abituale dei probiotici, definita da FAO/WHO: *“otherwise healthy people”*.

È opinione del panel che in molte situazioni (ad esempio quelle in cui prevalgono sintomi di natura soggettiva, per i quali esiste una sorta di “continuum” tra quadri di sostanziale normalità e quadri francamente patologici, la possibilità di trasferire a soggetti sani “pauci-sintomatici” i dati raccolti in pazienti con quadro clinico più evoluto migliorerebbe sensibilmente la possibilità di documentare effetti funzionali rilevanti dei probiotici.

Gli effetti osservati sono in genere legati alla presenza del probiotico nel tratto intestinale, presenza assicurata solo da una continua somministrazione. Studi di lungo periodo devono affiancare quelli, già esistenti in buon numero, che descrivono gli effetti di interventi di durata limitata nel tempo.

L'accertamento della sicurezza delle specie microbiche proposte come probiotici ha sempre costituito un punto fermo per le Autorità Regolatorie. L'immissione in commercio delle specie microbiche è stata per anni subordinata alla verifica dell'esistenza di una lunga tradizione d'uso senza problemi per la salute dei consumatori, o valutata caso per caso seguendo, nella UE, i criteri previsti per tutti i nuovi alimenti, quelli per gli additivi utilizzati in alimentazione animale o quelli stabiliti per i farmaci, in funzione dell'indicazione d'uso della specie in questione.

Per lo specifico settore alimentare, l'introduzione di una nuova norma-base sull'igiene degli alimenti ha portato ad adottare un nuovo strumento di valutazione dei probiotici, basato sulla cosiddetta “presunzione qualificata di sicurezza (QPS)”<sup>36</sup>. In virtù di questo strumento, qualsiasi ceppo microbico di cui sia stata stabilita in maniera univoca l'identità, e che sia possibile classificare in un gruppo QPS (cioè in un gruppo che non desta alcuna preoccupazione in termini di sicurezza), non deve più essere oggetto di valutazione.

### 3. Quale tipo di beneficio

### 4. Sicurezza

pazione dal punto di vista della sicurezza), è sottoposto solamente alla verifica dell'assenza di specifiche "qualificazioni" (= cause di preoccupazione per la salute pubblica) per il definitivo riconoscimento della sicurezza d'uso.

Allo stato attuale, la qualificazione di uno specifico ceppo si basa sull'assenza della resistenza ad antibiotici d'interesse clinico e veterinario, oltre a quella dei fattori di virulenza <sup>37</sup>.

Per la verità, la resistenza agli antibiotici non è di per sé un rilevante problema di sicurezza in quanto diversi microrganismi risultano intrinsecamente indifferenti all'attività degli antibiotici; tuttavia, lo diventa quando essa si accompagna ad un trasferimento orizzontale dei relativi determinanti genici <sup>38</sup>. Proprio per questo, il Comitato Scientifico per l'Alimentazione Animale della UE (SCAN) ed il Panel dell'EFSA sugli Additivi, prodotti e sostanze usati nei mangimi (FE-EDAP) richiedono l'assenza di geni trasferibili di resistenza agli antibiotici come prerequisito per l'approvazione di un microrganismo. Pur non sussistendo un analogo criterio legalmente cogente per i probiotici degli integratori alimentari, la verifica dell'assenza di resistenza trasferibile è raccomandata per la valutazione della sicurezza sia a livello UE che dal Ministero della Salute Italiano.

## Probiotici e risposta immune

Una serie di recenti osservazioni ha permesso di meglio chiarire i meccanismi della risposta immune che hanno luogo a livello intestinale. Molti di questi meccanismi possono essere influenzati da specifici ceppi probiotici.

Nella lamina propria dell'intestino le cellule B si differenziano in plasmacellule e secernono anticorpi IgA dimerici che, sulla superficie baso-laterale delle cellule epiteliali intestinali, si legano ad un recettore specifico che le trasporta alla superficie apicale, dove vengono liberate nel lume intestinale. Le IgA secretorie sono elementi importanti dell'immunità mucosale, e partecipano alla protezione dell'ospite legando un'ampia varietà di antigeni dietetici, batterici, virali e fungini.

La possibilità che i probiotici possano influenzare questi processi, modificando specifici parametri immuni e, in ultima analisi, svolgendo quindi un effetto benefico su patologie umane, è un campo di grandissima attualità. Infatti:

1. I probiotici modulano e stabilizzano la composizione del *microbiota*, e possono quindi svolgere effetti immunomodulatori
2. Alcuni probiotici sono in grado di inibire la risposta infiammatoria del sistema immune intestinale grazie all'inibizione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B o in associazione ad una azione antiapoptotica sulle cellule dell'epitelio intestinale <sup>39 40</sup>.
3. Alcuni probiotici sono in grado di aumentare l'attività delle cellule *Natural Killer* (NK) <sup>41 42</sup>, cruciali come prima linea di difesa dell'organismo perché in grado di svolgere un'attività citotossica indipendentemente da una precedente sensibilizzazione all'antigene
4. Alcuni probiotici aumentano la secrezione di muco <sup>19</sup>.
5. Alcuni probiotici hanno un'azione immunomodulatoria diretta: dopo essere stati catturati a livello delle placche di Peyer, essi

possono indurre la secrezione di citochine e l'espressione di molecole costimolatorie da parte delle *Antigen Presenting Cells* (APC) <sup>43</sup>.

6. Alcuni ceppi di lattobacilli inducono la maturazione delle cellule dendritiche (CD) <sup>44</sup>. Le CD sono in grado, per mezzo della loro particolare citostruttura, di attraversare lo strato di cellule epiteliali e di catturare direttamente dal lume. Questa caratteristica delle CD, combinata con la loro abilità di orchestrare la risposta dei linfociti T e di stimolare in tal modo la secrezione di IL-10 ed IL-12, ne mette in primo piano il ruolo come ponte fra microbiota, immunità innata ed immunità adattativa.

Con un uso mirato di specifici ceppi probiotici è possibile indurre una risposta di tipo immunostimolante sia sulla componente linfocitaria di tipo B (incremento dell'immunità umorale) e T (incremento dell'immunità cellulo-mediata), sia sulla componente fagocitaria, in particolare sulle cellule polimorfonucleate <sup>45 46</sup>. La possibilità di stimolare risposte di questo tipo è utile in circostanze cliniche ben precise, per esempio quando si intenda realizzare un'immunoprofilassi delle infezioni delle alte vie respiratorie durante il periodo invernale, o in aggiunta alla vaccinazione anti-influenzale per aumentare la risposta anticorpale al vaccino o, più in generale, per aumentare la vigilanza immunitaria aspecifica verso patogeni di varia natura <sup>47 48</sup>.

Recenti studi di efficacia hanno fornito esiti positivi sugli effetti dei probiotici sull'apparato respiratorio, ed in particolare riguardo alla prevenzione ed alla riduzione della severità delle infezioni respiratorie, grazie a un aumento delle cellule che secernono IgA nella mucosa bronchiale <sup>49</sup>. Effetti positivi si sono riscontrati anche nei fumatori abituali, nei quali è osservazione comune di riscontrare una ridotta delle cellule NK <sup>50</sup>.

Un target privilegiato di studio per indagare gli effetti di salute dei probiotici sono poi i bambini, tra i quali è importante ridurre il diffondersi di malattie specialmente durante l'inverno, riducendo i giorni di assenza da scuola e diminuendo la necessità di utilizzare antibiotici <sup>51-53</sup>.

Nei primi momenti della vita i meccanismi innati di difesa sono più importanti dei meccanismi acquisiti, perché il neonato sano è "naïve" da un punto di vista immunologico, non avendo incontrato, all'interno dell'utero, quasi nessun antigene. In questo periodo iniziale della vita il colostro ed il latte materno possono accrescere la resistenza del neonato alle infezioni enteriche; i meccanismi di questa aumentata resistenza alle infezioni sono sia di natura passiva (grazie al passaggio con il latte di fattori anti-microbici), che attiva, attraverso la promozione dello sviluppo di specifiche funzioni immuni.

Il sistema immune neonatale si trova di fronte a due grandi sfide: da una parte deve rispondere attivamente agli antigeni dei batteri patogeni, dall'altra deve "tollerare" gli antigeni sia dietetici sia dei batteri non patogeni. La regolazione di queste risposte di tolleran-

## Probiotici e salute

## Malattie intestinali pediatriche

za e di risposta attiva è fondamentale per la salute, e il venir meno di queste proprietà può portare ad infezioni ricorrenti, malattie infiammatorie ed autoimmuni e ad allergie.

L'educazione del sistema immune nei primi momenti di vita è fondamentale nel minimizzare la comparsa di questi disordini immuno-mediati. Gli antigeni fondamentali a questo processo "educativo" sono proprio quelli della flora batterica, che il neonato acquisisce dalla madre, e che colonizza l'intestino già dopo 48 ore di vita (*E. coli* e Streptococchi). La dieta, poi, influisce sul *microbiota* del neonato: infatti i bambini allattati al seno presentano una colonizzazione prevalente con bifidobatteri, *E. coli* e Streptococchi, mentre quelli allattati con latte formulato, presentano un microbiota con prevalenza di bifidobatteri, bacteroidi, clostridi ed altri enterobatteri. L'instaurarsi graduale di una flora autoctona fin dalle prime ore di vita è in grado di modulare la risposta immunitaria in favore dell'acquisizione della tolleranza orale<sup>54 55</sup> definibile come "*un'iporesponsività immunologica specifica a seguito di una precedente esposizione mucosale all'antigene*".

La produzione di IgA secretorie, come già detto, è uno dei meccanismi immunologici fondamentali nello stabilirsi della tolleranza orale, soprattutto nel periodo perinatale, ma anche di protezione da agenti patogeni. Il latte materno contiene già IgA secretorie che possono essere utili a questo scopo. Per i lattanti che vengono nutriti con latte formulato è invece evidente come un latte supplementato con batteri probiotici possa favorire la naturale produzione di questa immunoglobulina. La supplementazione con probiotici è generalmente considerata sicura dal momento che vengono utilizzati microrganismi identici a quelli presenti nella flora vaginale e nel tratto gastrointestinale umani.

Negli ultimi anni si sono moltiplicati gli studi clinici condotti su bambini per valutare gli effetti dei probiotici nella prevenzione e nel controllo sia di patologie gastrointestinali acute e croniche, ma anche di patologie extra-intestinali quali l'atopia<sup>56</sup>. L'interpretazione dei risultati ottenuti è spesso controversa, perché gli studi differiscono per il microrganismo utilizzato, la popolazione esaminata, la valutazione dell'effetto, le dosi e la frequenza di somministrazione.

Di seguito viene presentata una valutazione critica delle evidenze disponibili relative all'uso di probiotici in specifiche condizioni parafisiologiche o patologiche in ambito pediatrico.

### Gastroenteriti infettive

La maggior parte degli studi effettuati negli ultimi anni ha dimostrato l'efficacia di specifici probiotici nel ridurre la sintomatologia nella popolazione pediatrica colpita da gastroenterite infettiva<sup>57-60</sup>. I probiotici riducono la durata della diarrea infettiva di 0,7 giorni e riducono la frequenza degli episodi diarreici già nelle prime ore<sup>61</sup>. In base alle più recenti evidenze scientifiche pertanto ne è consigliata l'assunzione in corso di gastroenterite acuta fin dalla comparsa dei primi sintomi.

In genere i probiotici devono essere somministrati per almeno 5 giorni e in ogni caso per tutta la durata di un eventuale ricovero

ospedaliero, in un'unica oppure in due somministrazioni giornaliere. L'efficacia è evidente soprattutto nei casi di infezioni da rotavirus trattate precocemente con terapia reidratante orale associata a *Lactobacillus GG*<sup>62-65</sup>. Questo probiotico è in grado di diminuire l'escrezione di rotavirus nelle feci<sup>66</sup>, contribuendo alla riduzione della diffusione del virus e perciò migliorando l'efficacia delle strategie di prevenzione degli episodi infettivi sia in comunità, sia durante la degenza ospedaliera, anche se con risultati che non possono essere ancora considerati definitivi<sup>67-69</sup>. L'efficacia del trattamento con probiotici è dimostrata nelle gastroenteriti sostenute da rotavirus di severità lieve-moderata, mentre i risultati ottenuti nel trattamento delle forme rotavirus negative, e soprattutto in quelle batteriche, non sono significativi<sup>62-69</sup>. Si ipotizza che l'inefficacia di LGG nelle diarree batteriche sia dovuta alla capacità dei batteri coinvolti di produrre mucinasi che vanificano gli effetti del probiotico<sup>70</sup>. Uno studio del 2005 ha invece dimostrato l'efficacia del *Lactobacillus paracasei* ST1 nelle gastroenteriti non determinate da rotavirus<sup>71</sup>.

Risultati che confermano l'efficacia della supplementazione con probiotici nella terapia delle gastroenteriti in età pediatrica, vengono osservati anche da una recente review<sup>72</sup>, che ne evidenzia inoltre la ceppo-specificità; in particolare i probiotici che hanno dimostrato i più promettenti risultati sono *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*.

L'incidenza di diarrea in corso di terapia antibiotica (AAD) è del 5-30%<sup>65</sup>. La maggior parte degli antibiotici può indurre, durante il trattamento, la comparsa di diarrea: il rischio è tuttavia maggiore nel caso di terapie con aminopenicilline, associazione di aminopenicilline con acido clavulanico, cefalosporine e clindamicina<sup>73</sup>.

Recenti meta-analisi riportano un'importante riduzione dei casi di AAD quando alla terapia antibiotica sia associato un trattamento preventivo con probiotici<sup>73-75</sup>. Il microrganismo più efficace sembra essere *Saccharomyces boulardii*, tuttavia nei bambini si è dimostrato efficace anche LGG<sup>76 77</sup>. *S. boulardii*, per il quale esiste il rischio di una diffusione ematogena nei pazienti immunocompromessi, si è dimostrato efficace nell'inibire il ripetersi di episodi di infezione da *Clostridium difficile*<sup>78</sup>. Anche se non tutti gli studi hanno confermato l'efficacia del trattamento con probiotici nella prevenzione dell'AAD, una review del 2009 ha dimostrato che l'efficacia stessa è legata prevalentemente al ceppo utilizzato<sup>79</sup>; gli studi analizzati confermano inoltre come i ceppi *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus rhamnosus* GG presentino sufficienti evidenze cliniche per confermare il loro utilizzo nella terapia della diarrea da antibiotici.

L'enterocolite necrotizzante è una causa rilevante di morbilità e mortalità nei neonati prematuri; l'eziologia di questa patologia non è stata ancora del tutto chiarita. Sono stati identificati fattori di rischio, quali prematurità, alimentazione enterale e colonizzazione

**Diarrea associata a terapia antibiotica**

## Enterocolite necrotizzante (NEC)

batterica, che causerebbero la risposta infiammatoria esagerata responsabile della necrosi ischemica dell'intestino<sup>80</sup>.

Sulla base delle osservazioni sui modelli animali, alcuni studi hanno valutato gli effetti di una supplementazione con probiotici sull'incidenza di NEC nei neonati. Una review recentissima<sup>81</sup> ha analizzato i risultati di 11 studi presenti in letteratura evidenziando come il rischio di NEC e di morte, nelle popolazioni trattate con probiotici, si sia rivelato effettivamente più basso, confermando un significativo beneficio della supplementazione con probiotici nei bambini prematuri e di peso molto basso alla nascita. In questa meta-analisi si conclude addirittura che, per gli importanti effetti ottenuti, i risultati statisticamente significativi e le evidenze riscontrate, non sembrano più necessari studi randomizzati contro placebo.

## Malattie allergiche ed atopiche in età pediatrica

Negli ultimi anni si è assistito nei paesi industrializzati ad un significativo aumento di patologie autoimmuni ed allergiche. I fattori responsabili di questo aumento sono probabilmente l'alterata maturazione della funzione immune nei primi mesi di vita, che comporterebbe un minore *switch* TH2/TH1 per un ridotto o mancato contatto con agenti infettivi (teoria dell'igiene), e l'alterata flora microbica, che favorisce la persistenza di citochine derivanti da TH2 (IL4, IL5, IL13), prevalenti alla nascita, e non consente il riequilibrio a favore di una predominante risposta TH1, con produzione di IL12 ed IFN $\gamma$ .

Quest'ultima ipotesi è sostenuta dall'osservazione in diversi studi di alterazioni nella flora intestinale in bambini atopici, nei quali si riscontra una prevalenza di clostridi<sup>82 83</sup>. Nel 2007 è stato pubblicato il primo studio che ipotizza il ruolo preventivo di un probiotico sulla ricorrenza di sintomi respiratori allergici nei bambini. Questo studio si prefiggeva lo scopo di valutare se il consumo giornaliero a lungo termine (12 mesi) di un latte fermentato contenente il probiotico *Lactobacillus casei* DN-114001 (un probiotico con attività immuno-modulante) potesse migliorare lo stato di salute e modificare il profilo immunologico di bambini in età prescolare con sintomatologia allergica a inalanti<sup>84</sup>.

Si è trattato di uno studio multicentrico, prospettico, randomizzato, in doppio cieco, in cui sono stati arruolati 187 pazienti (119 con asma e 131 con rinite, di cui 63 con entrambi i sintomi), di entrambi i sessi e di età compresa tra 2 e 5 anni, seguiti presso 8 ospedali di Milano e provincia. Lo studio ha mostrato come la supplementazione con il probiotico abbia ridotto del 33% la ricorrenza di episodi di rinite/anno, con una mediana (IQR) di 2 episodi (1-5) *vs.* 3 (0-8); l'incidenza di episodi di rinite allergica era due volte inferiore nei bambini trattati nel secondo trimestre di supplementazione [OR (95%CI)] di 0,39 (0,19-0,82,  $p < 0,01$ ).

Su un sottogruppo di 45 pazienti è stata effettuata l'analisi genetica della composizione della flora microbica intestinale, che ha dimostrato una netta prevalenza di flora probiotica nell'intestino ed in particolare la presenza di numerose colonie di *Lactobacillus casei* DN-114001 nei pazienti trattati rispetto ai controlli: la colonizza-

zione dell'intestino da parte del probiotico è persistita a 6 e 12 mesi di follow-up nella quasi totalità dei soggetti. Numerosi studi hanno evidenziato risultati promettenti sull'efficacia dei probiotici nel ridurre l'incidenza di manifestazioni allergiche<sup>85-88</sup>.

Purtroppo l'enorme eterogeneità degli studi in letteratura, dei ceppi utilizzati, della durata della terapia e delle dosi impiegate, non permette un'interpretazione univoca. Dalle più recenti review<sup>89 90</sup> non emerge un'indicazione precisa sull'efficacia dei probiotici nella terapia o nella prevenzione delle principali patologie allergiche. I dati più promettenti riguardano esclusivamente la prevenzione dell'eczema atopico, anche se non tutti gli studi sono concordi sui risultati. Infatti due recenti review relative all'utilizzo dei probiotici nella terapia<sup>91</sup> e nella prevenzione<sup>92</sup> della dermatite atopica, hanno concluso che ad oggi, in base agli studi presenti in letteratura, non esistono evidenze sufficienti per promuovere la supplementazione con probiotici in relazione alla dermatite atopica.

Tutti i probiotici, come si ricordava, inducono una risposta immunitaria, le cui caratteristiche sono correlate al ceppo o alla miscela di batteri utilizzati. Recenti studi hanno dimostrato effetti positivi dei probiotici sul sistema respiratorio, ed in particolare sulla prevenzione e sulla riduzione della severità delle infezioni respiratorie, mediato probabilmente da un aumento delle cellule che seceranno IgA nella mucosa bronchiale<sup>93</sup>. È stato anche dimostrato il ruolo della malnutrizione, e del deficit di alcuni micronutrienti e di vitamine, nei processi di ingresso cellulare e di replicazione dei patogeni delle infezioni virali<sup>94-96</sup>. L'uso preventivo di supplementi contenenti sostanze attive sul sistema immunitario ha quindi un razionale di impiego sia prima della vaccinazione che come adiuvante al vaccino, per aumentare il titolo anticorpale negli anziani e nei soggetti defedati<sup>97 98</sup>.

Si riportano di seguito i risultati di alcuni studi realizzati su popolazioni target differenti per indagare gli effetti dei probiotici sulle patologie infettive del sistema respiratorio.

Uno studio randomizzato, in doppio cieco e contro placebo, è stato realizzato allo scopo di determinare se i probiotici possano ridurre il rischio di infezioni nei neonati. La ricerca ha coinvolto bimbi di età inferiore ai 2 mesi, cui è stato somministrato quotidianamente, fino a 12 mesi di età, latte arricchito da *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium lactis* Bb-12 o un latte con placebo. I dati ottenuti suggeriscono che i probiotici possano rappresentare un mezzo sicuro per ridurre il rischio di otiti medie acute precoci ed il ricorso ad antibiotici per le infezioni respiratorie ricorrenti durante il primo anno di vita<sup>99</sup>. Risultati analoghi sono emersi in uno studio condotto su una popolazione di 326 bambini di età compresa tra i 3 e i 5 anni, che ha rilevato una diminuzione di incidenza dell'uso di antibiotico di oltre il 65% e una riduzione dei giorni di assenza di oltre il 25% tra i bambini trattati con un probiotico<sup>100</sup>.

## Infezioni respiratorie

### Età pediatrica

**Adulti**

Uno studio randomizzato in doppio cieco e contro placebo ha valutato se il consumo per tre mesi di *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5, avesse riflessi su severità dei sintomi, incidenza e durata del raffreddore comune. Per due stagioni inverno/primavera 479 adulti hanno assunto ogni giorno vitamine e minerali, arricchiti o meno da probiotici. I risultati indicano una riduzione della durata degli episodi di raffreddore di almeno due giorni, e della severità dei sintomi, tra i soggetti che avevano assunto il probiotico rispetto a quelli randomizzati al placebo<sup>101</sup>. Conclusioni simili sono state ottenute in uno studio che ha valutato l'effetto dell'assunzione a lungo termine di probiotici sulla stessa patologia<sup>102</sup>. Un'altra indagine in doppio cieco, randomizzata e contro placebo, condotta in 237, 234 e 250 adulti sani ha indagato, in tre stagioni invernali, l'efficacia di diversi probiotici nel ristabilire e mantenere l'equilibrio intestinale e la potenziale protezione da patologie infettive del tratto respiratorio<sup>103</sup>. Il protocollo sperimentale prevedeva tre diverse fasi:

- nella prima fase è stata testata una formulazione attiva (A) contenente 3 tipi di probiotici (*L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*) e frutto-oligosaccaridi (FOS) rispetto al placebo;
- nella seconda fase la stessa formulazione è stata comparata a un preparato simile arricchito di lactoferrina (B) e al placebo;
- nella terza fase due formulazioni simbiotiche, ciascuna contenente probiotici e FOS (C) o galatto-oligosaccaridi (GOS, D), sono state comparate tra loro e con il placebo.

La lunghezza media delle infezioni respiratorie acute ha mostrato risultati migliori per quanto concerne le ILI (*influenza-like illness*) e le URTI (*upper respiratory tract infections*) nelle fasi 1 e 2 dello studio, mentre l'incidenza di raffreddore e tosse sono risultate migliori nella fase 3. Risultati analoghi emergono dalla revisione sistematica delle evidenze cliniche ottenute in 14 ricerche randomizzate (RCTs) relative all'uso dei probiotici nel prevenire le infezioni del tratto respiratorio (RTIs). La riduzione nella severità dei sintomi collegati alle RTIs è stata rilevata in cinque studi su sei; in tre studi su nove il decorso clinico delle RTIs è stato più breve. I probiotici, quindi, hanno un effetto benefico sulla severità e sulla durata dei sintomi delle RTIs, ma non sembrano ridurre l'incidenza delle RTIs<sup>104</sup>.

**Anziani**

Due studi randomizzati multicentrici controllati, in doppio cieco, sono stati condotti in due successive stagioni vaccinali (studio pilota e conferma). Un numero di 86 e 222 anziani volontari, rispettivamente, ha consumato una bevanda al latte fermentato, contenente *Lactobacillus casei* DN-114001, oppure uno yogurt fermentato o un prodotto caseario non fermentato di controllo, due volte al giorno per un periodo di 7 o 13 settimane. Dopo 4 settimane è avvenuta la vaccinazione. Lo studio ha dimostrato che il probiotico utilizzato è in grado di migliorare le risposte anticorpali alla vaccinazione influenzale negli ultrasettantenni<sup>105</sup>. Il *Lactobacillus casei* DN-114001 è stato anche valutato in uno studio multicentrico con-

trollato in doppio cieco condotto su 1.072 anziani, per valutare la resistenza alle infezioni respiratorie. Il prodotto contenente il probiotico, ben tollerato, ha indotto una riduzione della durata delle infezioni respiratorie, soprattutto per URTI e rinofaringiti <sup>106</sup>.

Molti degli effetti studiati dei probiotici, comprensibilmente, si riferiscono all'apparato digerente. Tali effetti si riferiscono sia a condizioni parafisiologiche (stipsi) che a situazioni più specificamente di malattia.

Recentemente è stata pubblicata una review sull'effetto di alcuni ceppi probiotici sulla costipazione <sup>107</sup>: sono stati considerati 5 studi clinici controllati verso placebo per un totale di 377 soggetti. I risultati mostrano che negli adulti effetti favorevoli sulla frequenza di evacuazione e sulla consistenza delle feci sono stati ottenuti con i ceppi probiotici *Bifidobacterium lactis* DN-173010, *Lactobacillus casei* Shirota e *Escherichia coli* Nissle 1917. Alcuni ceppi hanno permesso di ottenere una riduzione della percezione di gonfiore addominale (riportata dai pazienti prima e dopo il trattamento). Nei bambini, il ceppo *L. rhamnosus* Lcr35 ha mostrato degli effetti favorevoli anche se non statisticamente significativi (ridotto numero di soggetti coinvolti) mentre il ceppo *L. rhamnosus* GG non ha mostrato alcun effetto rispetto al placebo. Nel 2008 un altro studio, controllato verso placebo, è stato condotto su bambini con costipazione funzionale cronica, che per 8 settimane hanno ricevuto un probiotico (*L. reuteri* DSM 17938) oppure un placebo. In questo caso, già dopo la seconda settimana di trattamento è stato rilevato un significativo miglioramento della frequenza di evacuazione mentre nessun effetto è stato misurato sulla consistenza delle feci <sup>108</sup>.

Il microbiota, d'altra parte (lo si è più volte sottolineato) partecipa alla funzione di barriera contro l'adesione alla mucosa dei batteri patogeni, momento cruciale per l'inizio dei processi infettivi. Quando questa funzione di barriera è alterata da agenti chimici, da antigeni o da fattori stressogeni di varia natura, possono manifestarsi disordini intestinali, talora dovuti alla crescita di batteri patogeni.

Numerosi dati sperimentali suggeriscono che i probiotici possano concorrere al rinforzo delle attività della barriera mucosa intestinale, in particolare influendo aspetti della funzionalità delle cellule epiteliali intestinali o dei macrofagi (Tab. II).

La Tabella IV <sup>109</sup> riporta i dati pubblicati in studi controllati su l'utilizzo di probiotici nella prevenzione e nel trattamento di alcuni disordini o malattie digestive.

## Effetti sull'apparato digerente

**Tabella IV.**

<b>Disordine</b>	<b>Ceppo</b>	<b>Dose</b>	<b>Rif.</b>
Trattamento della diarrea acuta infettiva nei bambini	<i>L. rhamnosus GG</i> <i>L. reuteri ATCC 55730</i> <i>S. cerevisiae (boulardii)</i>	$10^{10}$ - $10^{11}$ ufc $10^{10}$ - $10^{11}$ ufc x 2/dì $10^9$ ufc x 3/dì	110 110 110
Trattamento della diarrea acuta infettiva negli adulti	<i>Enterococcus faecium LAB SF68</i>	$10^8$ ufc x 3/dì	110
Prevenzione della diarrea da antibiotici	<i>S. cerevisiae (boulardii)</i> <i>L. rhamnosus GG</i> <i>B. lactis Bb12 + S. thermophilus</i> <i>Enterococcus faecium LAB SF68</i> <i>S. cerevisiae (boulardii)</i> <i>L. rhamnosus GG</i> <i>L. casei DN-114 001 in latte fermentato con L. bulgaricus + S. thermophilus</i> <i>B. clausii</i> <i>L. acidophilus CL1285 + L. casei</i>	$10^9$ ufc x 2/dì $10^{10}$ ufc x 1-2/dì $10^7$ + $10^6$ ufc/g formula $10^8$ ufc x 2/dì $1 g$ o $3 \times 10^{10}$ ufc x 1/dì $10^{10}$ - $10^{11}$ ufc x 2/dì $10^{10}$ ufc x 2/dì $2 \times 10^9$ spore x 3/dì $5 \times 10^{10}$ ufc x 1/dì	111 111 111 111 111 111 112 113 114
Prevenzione della diarrea nosocomiale nei bambini	<i>L. rhamnosus GG</i> <i>B. lactis Bb12 + S. thermophilus</i> <i>B. lactis Bb12</i> <i>L. reuteri ATCC 55730</i>	$10^{10}$ - $10^{11}$ ufc x 2/dì $10^8$ + $10^7$ ufc/g formula $10^9$ ufc x 2/dì $10^9$ ufc x 2/dì	111 111 111 111
Prevenzione della diarrea da <i>C. difficile</i> negli adulti	<i>L. casei DN-114 001 in latte fermentato con L. bulgaricus + S. thermophilus</i> <i>S. cerevisiae (boulardii)</i>	$10^{10}$ ufc x 2/dì $2 \times 10^{10}$ ufc x 1/dì $2 \times 10^{10}$ ufc x 1/dì	112 111 111
Coadiuvante nella terapia per eradicazione <i>H. pylori</i>	<i>L. rhamnosus GG</i> <i>B. clausii</i> <i>S. cerevisiae (boulardii)</i> <i>L. casei DN-114 001 in latte fermentato con L. bulgaricus + S. thermophilus</i>	$6 \times 10^9$ ufc x 2/dì $2 \times 10^9$ spore x 3/dì $1 g$ o $5 \times 10^9$ ufc x dì $10^{10}$ cfu x 2/dì	115 115 115 116
Riduzione sintomi s. colon irritabile	<i>B. infantis 35624</i> <i>L. rhamnosus GG</i> <i>B. longum, B. infantis, B. breve, L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii subsp. <i>bulgaricus</i>, L. plantarum, S. salivarius subsp. <i>thermophilus</i></i> <i>L. rhamnosus GG, L. rhamnosus LC705, B. breve Bb99 e P. freudenreichii subsp. <i>shermanii</i> JS</i> <i>B. animalis DN-173 010 in latte ferm. con L. bulgaricus + S. thermophilus</i>	$10^8$ ufc x 1/dì $6 \times 10^9$ ufc x 2/dì $4,5 \times 10^{11}$ ufc x 2/dì $10^{10}$ ufc x 1/dì $10^{10}$ cfu x 2/dì	117 118 119 120 121
Remissione col. ulcerosa	<i>E. coli</i> Nissle 1917	$5 \times 10^{10}$ x 2/dì	122
Remissione pouchite	<i>B. longum, B. infantis, B. breve, L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii subsp. <i>bulgaricus</i>, L. plantarum, S. salivarius subsp <i>thermophilus</i></i>	$4,5 \times 10^{11}$ ufc x 2/dì	123
Prevenzione enterocolite necrotizzante	<i>B. infantis, S. salivarius subsp. <i>thermophilus</i>, B. bifidum</i> <i>L. acidophilus + B. infantis</i>	$3,5 \times 10^8$ ufc per ogni ceppo x 1/dì $10^9$ ufc per ogni ceppo x 2/dì	124 125

Alcuni effetti dei probiotici sul funzionamento normale o patologico dell'organismo umano sono ben documentati, ed il loro impiego da soli o in associazione ad altre terapie può essere quindi considerato "evidence-based".

In altre condizioni cliniche, invece, sono necessari ulteriori studi, perché le evidenze disponibili non sono sufficienti a dimostrare la reale efficacia dei probiotici stessi.

In generale, come più volte ricordato in questo documento, va sottolineato che gli effetti sono "ceppo specifici" e non si possono estendere ad altri probiotici dello stesso genere o specie.

Più in dettaglio, si può osservare che:

- influenzare la composizione del microbiota, mediante la somministrazione di batteri probiotici, può contribuire in modo significativo alla salute ed al benessere dell'ospite;
- lo studio dei possibili effetti favorevoli di miscele di ceppi deve essere specifico, e non limitarsi a "sommare" le evidenze relative agli effetti dei vari ceppi miscelati;
- dai dati sperimentali va estrapolata anche la quantità di batteri vivi da somministrare, ed eventualmente gli effetti della matrice in cui essi vengono somministrati; tale somministrazione deve essere prolungata, in alcuni casi per tempi indefiniti;
- nei soggetti sani, alcuni probiotici contribuiscono in modo significativo alla regolarizzazione dell'alvo, ed alla riduzione del discomfort intestinale;
- alcuni probiotici possono antagonizzare i patogeni intestinali per antagonismo diretto (es: produzione di citochine, defensine, ecc.) o per esclusione competitiva;
- alcuni probiotici contribuiscono alla prevenzione della diarrea infettiva nei bambini;
- alcuni probiotici sono associati ad un globale miglioramento dei disordini fuzionali intestinali (gonfiore, fastidio addominale, ecc.) tipici della sindrome dell'intestino irritabile;
- alcuni probiotici riducono la frequenza e la severità dell'enterocolite necrotizzante (NEC) nei prematuri;
- è segnalata la possibilità di utilizzare i probiotici per mantenere la remissione clinica nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) e nella pouchite; l'evidenza sperimentale in proposito non è di elevata solidità;
- alcuni probiotici, probabilmente grazie alla stimolazione di vie dell'immunità aspecifica, sembrano in grado di ridurre la durata e/o la gravità di patologie virali stagionali;
- segnalazioni preliminari, anche se non del tutto univoche, suggeriscono che specifici ceppi di probiotici possano ridurre l'incidenza o alcuni aspetti dermatologici delle patologie allergiche nel bambino;
- gli alimenti contenenti probiotici hanno dimostrato la loro sicurezza sia nella popolazione sana che in soggetti affetti da alcune patologie;
- la complessità della ricerca sugli effetti dei probiotici implica, probabilmente, l'adozione di strumenti di valutazione dei loro effetti differenti da quelli classicamente impiegati per valutare le azioni dei farmaci.

## Conclusioni e Consensus

## Bibliografia

- 1 Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, et al. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. *Nature* 2010;464:59-65.
- 2 Jones BV, Sun F, Marchesi JR. *Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome*. *BMC Genomics* 2010;11:46.
- 3 Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, et al. *Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes*. *DNA Res* 2007;14:169-81.
- 4 Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, et al. *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. *Science* 2006;312:1355-9.
- 5 Jones BV, Marchesi JR. *Accessing the mobile metagenome of the human gut microbiota*. *Mol Biosyst* 2007;3:749-58.
- 6 Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. *Evolution of mammals and their gut microbes*. *Science* 2008;320:1647-51.
- 7 Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. *Science* 2005;307:1915-20.
- 8 Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. *Cell* 2006;124:837-48.
- 9 Cani PD, Delzenne NM. *The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease*. *Curr Pharm Des* 2009;15:1546-58.
- 10 Hooper LV, Gordon JI. *Commensal host-bacterial relationships in the gut*. *Science* 2001; 292:1115-8.
- 11 Nissle S. *Ueber die Grundlagen einer neuen ursaechlichen Bekaempfung der pathologischen Darmflora*. *Deutsch Med Woch* 1916;42:1181-4.
- 12 Cummings JH, Macfarlane GT. *Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism*. *JPNEN J Parenter Enteral Nutr* 1997;21:357-65.
- 13 Resta SC. *Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling*. *J Physiol* 2008;587:4169-74.
- 14 Lanning DK, Rhee KJ, Knight KL. *Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire*. *Trends Immunol* 2005;26:419-25.
- 15 Tsuji M, Suzuki K, Kinoshita K, et al. *Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis*. *Semin Immunol* 2008;20:59-66.
- 16 Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. *A core gut microbiome in obese and lean twins*. *Nature* 2009;457:480-4.
- 17 Ley RE. *Obesity and the human microbiome*. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:5-11.
- 18 Falk PE, Hooper LV, Midtvedt T, et al. *Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1157-70.
- 19 Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, et al. *The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G315-22.
- 20 FAO/WHO Expert Consultation. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria (2001)*. [www.fao.org](http://www.fao.org).
- 21 Ministero della Salute. *Linee Guida Nutrizione/Probiotici*.
- 22 FAO/WHO. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food (2002)*. [www.fao.org](http://www.fao.org)
- 23 Thomas CM, Versalovic J. *Probiotics-host communication. Modulation of signaling pathways in the intestine*. *Gut Microbes* 2010;1:1-16.
- 24 Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, et al. *Soluble factors from Lactobacillus GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:1018-30.
- 25 Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, et al. *Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition*. *Gastroenterology* 2004;127:1474-87.
- 26 Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, et al. *Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination*. *Science* 2000;289:1560-3.
- 27 Ruiz PA, Hoffmann M, Szcesny S, et al. *Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats*. *Immunology* 2005;115:441-50.
- 28 Petrof EO, Claud EC, Sun J, et al. *Bacteria-free solution derived from Lactobacillus plantarum inhibits multiple NFkappaB pathways and inhibits proteasome function*. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1537.
- 29 Voltan S, Martines D, Elli M, et al. *Lactobacillus crispatus M247- derived H2O2 acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-gamma in the intestinal mucosa*. *Gastroenterology* 2008;135:1216-27.
- 30 Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, et al. *Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis*. *Gastroenterology* 2003;124:1265-76.
- 31 Kelly D, Campbell JI, King TP, et al. *Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA*. *Nat Immunol* 2004;5:104-12.

- <sup>32</sup> Are A, Aronsson L, Wang S, et al. *Enterococcus faecalis* from newborn babies regulate endogenous PPARgamma activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1943-8.
- <sup>33</sup> Yan F, Cao H, Cover TL, et al. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 2007;132:562-75.
- <sup>34</sup> Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, et al. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun* 2000;68:5998-6004.
- <sup>35</sup> AFSSA. *Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte*, 2005.
- <sup>36</sup> European Food Safety Authority. *EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed*. Brussels December 2004, 13-14.
- <sup>37</sup> Barlow S, Chesson A, Collins JD, et al. *Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee*. *EFSA J* 2007;587:1-16.
- <sup>38</sup> Jansen WT, van der Bruggen JT, Verhoef J, et al. *Bacterial resistance: a sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe*. *Drug Resist Updat* 2006;9:123-33.
- <sup>39</sup> Tien MT, Girardin SE, Regnault B, et al. *Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella* infected human intestinal epithelial cells*. *J Immunol* 2006;176:1228-37.
- <sup>40</sup> Yan F, Polk DB. *Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem* 2002;277:50959-65.
- <sup>41</sup> Takeda K, Suzuki T, Shimada SI, et al. *Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota*. *Clin Exp Immunol* 2006;146:109-15.
- <sup>42</sup> Takeda K, Okumura K. *Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity*. *J Nutr* 2007;137(3 Suppl 2):791S-3S.
- <sup>43</sup> Niers LE, Hoekstra MO, Timmerman HM, et al. *Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic disease: immunomodulation of neonatal dendritic cells*. *Clin Exp Immunol* 2007;149:344-52.
- <sup>44</sup> Smits HH, Engering A, van der Kleij D, et al. *Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1260-7.
- <sup>45</sup> Iliev ID, Kitazawa H, Shimosato T, et al. *Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern*. *Cell Microbiol* 2005;7:403-14.
- <sup>46</sup> Iliev ID, Tohno M, Kurosaki D, et al. *Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTCGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice*. *Scand J Immunol* 2008;67:370-6.
- <sup>47</sup> Kaur IP, Chopra K, Saini A. *Probiotics: potential pharmaceutical applications*. *Eur J Pharm Sci* 2002;15:1-9.
- <sup>48</sup> Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. *Towards understanding molecular modes of probiotic action*. *Curr Opin Biotechnol* 2006;17:204-210.
- <sup>49</sup> Perdigon G, Alvarez S, Medina M, et al. *Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 1999;12:97-102.
- <sup>50</sup> Morimoto K, Takeshita T, Nanno M, et al. *Modulation of natural cell activity by supplementation of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in habitual smokers*. *Preventive Medicine* 2005;40:589-94.
- <sup>51</sup> Hatakka K, Savilahti E, Pölkä A, et al. *Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial*. *BMJ* 2001;322:1327.
- <sup>52</sup> Lin JS, Chiu YH, Lin NT, et al. *Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: a double-blind, randomized, controlled study*. *Vaccine* 2009;27:1073-9.
- <sup>53</sup> Marseglia GL, Tosca M, Cirillo I, et al. *Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study*. *Ther Clin Risk Manag* 2007;3:13-7.
- <sup>54</sup> Lu L, Walker WA. *Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium*. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1124S-30.
- <sup>55</sup> Santos S, Farnworth E, Jones PJH. *Probiotics and their potential health claim*. *Nutr Rev* 2006;64:265.
- <sup>56</sup> Zuccotti GV, Meneghin F, Raimondi C, et al. *Probiotics in clinical practice: an overview*. *J Int Med Res* 2008;36(Suppl 1):1A-53.
- <sup>57</sup> Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, et al. *Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:454-75.

- <sup>58</sup> Davidson GP, Butler RN. *Probiotics in pediatric gastrointestinal disorders*. Curr Opin Pediatr 2000;12:477-81.
- <sup>59</sup> NASPGHAN Nutrition Report Committee; Michail S, Sylvester F, Fuchs G, et al. *Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children*. J Ped Gastroenterol Nutr 2006;43:550-7.
- <sup>60</sup> Guandalini S. *Probiotics for children: use in diarrhea*. J Clin Gastroenterol 2006;40:244-8.
- <sup>61</sup> Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, et al. *Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis*. Pediatrics 2002;109:678-84.
- <sup>62</sup> Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, et al. *Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of diarrhea in infants*. J Pediatr 2001;138:361-5.
- <sup>63</sup> Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, et al. *Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoea: a multicenter European study*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000;30:54-60.
- <sup>64</sup> Kaila M, Isolauri E, Soppi E, et al. *Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human Lactobacillus strain*. Pediatr Res 1992;32:141-5.
- <sup>65</sup> Szymanski H, Pejcz J, Jawień M, et al. *Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosusstrains – a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Heczko Aliment Pharmacol Ther 2006;23:247-53.
- <sup>66</sup> Oberhelman R, Gilman RH, Sheen P, et al. *A placebo-controlled trial of Lactobacillus GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children*. J Pediatr 1999;134:15-20.
- <sup>67</sup> Costa-Ribeiro H, Ribeiro TCM, et al. *Limitations of probiotic therapy in acute, severe dehydrating diarrhea*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003;36:112-5.
- <sup>68</sup> Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A, et al. *Effect of Lactobacillus GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002;35:527-31.
- <sup>69</sup> Salazar-Lindo E, Miranda-Langschwager P, Campos-Sanchez M, et al. *Lactobacillus casei strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: A randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial*. BMC Pediatrics 2004;4:18.
- <sup>70</sup> Mack DR, Michail S, Wei S, et al. *Probiotics inhibit enteropathogenic E. Coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1999;276:G941-50.
- <sup>71</sup> Sarker SA, Sultana S, Fuchs GJ, et al. *Lactobacillus paracasei Strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh*. Pediatrics 2005;116:221-8.
- <sup>72</sup> Guarino A, Lo Vecchio A, Berni Canani R. *Probiotics as prevention and treatment for diarrhea*. Curr Opin Gastroenterol 2009;25:18-23.
- <sup>73</sup> Szajewska H, Ruszczynski M, Radzikowski A. *Probiotics in the prevention of antibiotic associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials*. J Pediatr 2006;149:367-72.
- <sup>74</sup> Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, et al. *Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhea*. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:1461-7.
- <sup>75</sup> D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, et al. *Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis*. BMJ 2002;324:1361.
- <sup>76</sup> Arvola T, Laiho K, Torkkeli S, et al. *Prophylactic Lactobacillus GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study*. Pediatrics 1999;104:e64.
- <sup>77</sup> Lewis SJ, Potts LF, Barry RE. *The lack of therapeutic effect of Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic-related diarrhea in elderly patients*. J Infect 1998;36:171-4.
- <sup>78</sup> Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, et al. *Saccharomyces boulardii protease inhibits the effects of Clostridium difficile toxins A and B in human colonic mucosa*. Infect Immun 1999;67:302-7.
- <sup>79</sup> McFarland LV. *Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile infections*. Anaerobe 2009;15:274-80.
- <sup>80</sup> Claud EC, Walker WA. *Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis*. FASEB J 2001;15:1398-40.
- <sup>81</sup> Deshpande G. *Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates*. Pediatrics 2010;125:921-30.
- <sup>82</sup> Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, et al. *The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children*. Clin Exp Allergy 1999;29:342-6.
- <sup>83</sup> Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, et al. *Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects*. J Allergy Clin Immunol 2003;111:587-91.
- <sup>84</sup> Giovannini M, Agostoni C, Riva E, et al. *A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing Lactobacillus casei in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis*. Pediatric

- Res 2007;62:215-20.
- <sup>85</sup> Abrahamsson TR, Jakobsson T, Böttcher MF, et al. *Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial*. J Allergy Clin Immunol 2007;119:184-91.
- <sup>86</sup> Taylor AL, Dunstan JA, Prescott SL. *Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial*. J Allergy Clin Immunol 2007;119:184-91.
- <sup>87</sup> Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, et al. *Probiotics and prebiotic galactooligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. J Allergy Clin Immunol 2007;119:192-8.
- <sup>88</sup> Valsecchi C, Marseglia A, Ricci A, et al. *Probiotics and children: is an integration useful in allergic diseases?* Pediatr Med Chir 2008;30:197-203.
- <sup>89</sup> Johannsen H, Prescott SL. *Practical prebiotics, probiotics and synbiotics for allergists: how useful are they?* Clin Exp Allergy 2009;39:1801-14.
- <sup>90</sup> Yao TC, Chang CJ, Hsu YH, et al. *Probiotics for allergic diseases: realities and myths*. Pediatr Allergy Immunol 2010;21:900-19.
- <sup>91</sup> Boyle RJ. *Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review*. Clin Exp Allergy 2009;39:1117-27.
- <sup>92</sup> van der Aa LB, Heymans HS, van Aalderen WM, et al. *Probiotics and prebiotics in atopic dermatitis: review of the theoretical background and clinical evidence*. Pediatr Allergy Immunol 2010;21:e355-67..
- <sup>93</sup> Perdigon G, Alvarez S, Medina M, et al. *Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus*. Int J Immunopathol Pharmacol 1999;12:97-102.
- <sup>94</sup> Santos JI. *Nutrition, infection, and immunocompetence*. Infect Dis Clin North Am 1994;8:243-67.
- <sup>95</sup> Levander OA. *Nutrition and newly emerging viral diseases: an overview*. J Nutr 1997;127(5 Suppl):948S-50S.
- <sup>96</sup> Beck MA. *Antioxidants and viral infections: host immune response and viral pathogenicity*. J Am Coll Nutr 2001;20(5 Suppl):384S-8.
- <sup>97</sup> Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. *Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review*. Vaccine 2006;24:1159-69.
- <sup>98</sup> Iorio AM, Camilloni B, Basileo M, et al. *Effects of repeated annual influenza vaccination on antibody responses against unchanged vaccine antigens in elderly frail institutionalized volunteers*. Gerontology 2007;53:411-8.
- <sup>99</sup> Rautava S, Salminen S, Isolauri E. *Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study*. Br J Nutr 2009;101:1722-6.
- <sup>100</sup> Leyfer GJ, Li S, Mubasher ME, et al. *Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children*. Pediatrics 2009;124:e172-9.
- <sup>101</sup> De Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, et al. *Effect of Lactobacillus gasseri PA 16/8, Bifidobacterium longum SP 07/3, B. bifidum MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial*. Clin Nutr 2005;24:481-91.
- <sup>102</sup> De Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, et al. *Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial*. Vaccine 2006;24:6670-4.
- <sup>103</sup> Pregliasco F, Anselmi G, Fonte L, et al. *A new chance of preventing winter diseases by the administration of symbiotic formulations*. J Clin Gastroenterol 2008;42(Suppl 3):S224-33.
- <sup>104</sup> Vouloumanou EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, et al. *Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review*. Int J Antimicrob Agents 2009;34:197e1-10.
- <sup>105</sup> Boge T, Rémigy M, Vaudine S, et al. *A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials*. Vaccine 2009;27:5677-84.
- <sup>106</sup> Guillemard E, Tondu F, Lacoin F, et al. *Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic Lactobacillus casei DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial*. Br J Nutr 2010;103:58-68.
- <sup>107</sup> Chmielewska A, Szajewska H. *Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation*. World J Gastroenterol 2010;16:69-75
- <sup>108</sup> Coccorullo P, Strisciuglio C, Martnelli M, et al. *Lactobacillus reuteri (DSM 17938) in infants with functional chronic constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study*. J Pediatr 2010;157:598-602.
- <sup>109</sup> Lee MC, Lin LH, Hung KL, et al. *Oral bacterial therapy promotes recovery from acute diarrhea in children*. Acta Paediatr Taiwan 2001;42:301-5.
- <sup>110</sup> Allen SJ, Okoko B, Martinez E, et al. *Probiotics for treating infectious diarrhoea*. Cochrane Database Syst Rev 2004;(2):CD003048.

- <sup>111</sup> Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, et al. *Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials*. Lancet Infect Dis 2006;6:374-82.
- <sup>112</sup> Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, et al. *Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial*. BMJ 2007;335:80.
- <sup>113</sup> Nista EC, Candelli M, Cremonini F, et al. *Bacillus clausii therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial*. Aliment Pharmacol Ther 2004;20:1181-8.
- <sup>114</sup> Beausoleil M, Fortier N, Guénette S, et al. *Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* Cl1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Can J Gastroenterol 2007;21:732-6.
- <sup>115</sup> Tong JL, Ran ZH, Shen J, et al. *Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy*. Aliment Pharmacol Ther 2007;25:155-68.
- <sup>116</sup> Sýkora J, Valecková K, Amlerová J, et al. *Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study*. J Clin Gastroenterol 2005;39:692-8.
- <sup>117</sup> Montalto M, Curigliano V, Santoro L, et al. *Management and treatment of lactose malabsorption*. World J Gastroenterol 2006;12:187-91.
- <sup>118</sup> Gawronska A, Dziechciarz P, Horvath A, et al. *A randomized double-blind placebo-controlled trial of *Lactobacillus GG* for abdominal pain disorders in children*. Aliment Pharmacol Ther 2007;25:177-84.
- <sup>119</sup> Kim HJ, Vazquez Roque MI, Camilleri M, et al. *A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL# 3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating*. Neurogastroenterol Motil 2005;17:687-96.
- <sup>120</sup> Kajander K, Hatakka K, Poussa T, et al. *A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention*. Aliment Pharmacol Ther 2005;22:387-94.
- <sup>121</sup> 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;26:475-86.
- <sup>122</sup> Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. Gut 2004;53:1617-23.
- <sup>123</sup> Gionchetti P, Lammers KM, Rizzello F, et al. *VSL#3: an analysis of basic and clinical contributions in probiotic therapeutics*. Gastroenterol Clin North Am 2005;34:499-513.
- <sup>124</sup> Deshpande G, Rao S, Patole S. *Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials*. Lancet 2007;369:1614-20.
- <sup>125</sup> Deshpande G, Rao S, Patole S, et al. *Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates*. Pediatrics 2010;125:921-30.

## Appendice

### Modulazione da parte dei Probiotici dei sistemi di segnalazione nelle cellule epiteliali intestinali (CEI) e nei macrofagi <sup>24</sup>.

Probiotico	Modello	Via Segnalazione	Effetto	Referenza
<i>Bacillus subtilis</i> JH642	CEI	hsp	Induce hsp27, hsp25 hsp70	Fujiya et al., 2007
<i>Bacillus subtilis</i> JH642	CEI	MAPK	> fosforilazione p38	Fujiya et al., 2007
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29184	CEI	MAPK	Attivazione ERK1/2, p38	Resta-Lenert et al., 2006
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	CEI	NF $\kappa$ B	Aumenta esportazione RelA via PPAR $\gamma$	Kelly et al., 2004
<i>Bacteroides vulgatus</i>	CEI	NF $\kappa$ B	> fosforilazione I $\kappa$ B $\alpha$	Haller et al., 2002
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	Macrofagi	NF $\kappa$ B	< fosforilazione I $\kappa$ B $\alpha$ ; incrementa SOCS	Okada et al., 2009
<i>Bifidobacterium bifidum</i> B536	Macrofagi	NF $\kappa$ B	< legame LPS CD14	Menard et al., 2004
<i>Bifidobacterium breve</i> BbC50	Macrofagi	NF $\kappa$ B	< legame LPS CD14	Menard et al., 2004
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	CEI	NF $\kappa$ B	Attiva RelA	Ruiz et al., 2005
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	CEI	MAPK	> fosforilazione p38	Ruiz et al., 2005
<i>Bifidobacterium longum</i>	CEI	NF $\kappa$ B	< trans locazione p65	Bai et al., 2004; Bai et al., 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> EC1/ EC3/EC15/ EC16	CEI	PPAR $\gamma$	Induce fosforilazione PPAR $\gamma$ 1	Are et al., 2008
<i>Escherichia coli</i> M17	Macrofagi	NF $\kappa$ B	Inibisce legame nucleare p65	Fitzpatrick et al., 2008
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	CEI	NF $\kappa$ B	Inibisce attivazione NF $\kappa$ B	Sokol et al., 2008
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	CEI	MAPK	Attivazione ERK1/2 e p38	Resta-Lenert et al., 2006
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	CEI	NF $\kappa$ B	< fosforilazione I $\kappa$ B $\alpha$	Resta-Lenert et al., 2006
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	CEI	NF $\kappa$ B	< translocazione p65	Bai et al., 2004
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	CEI	NF $\kappa$ B	Previene degradaz. I $\kappa$ B $\alpha$	Tien et al., 2005
<i>Lactobacillus casei</i>	CEI	PPAR $\gamma$	> PPAR $\gamma$ mRNA	Eun et al., 2007
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Macrofagi	NF $\kappa$ B	Inibisce fosforil. I $\kappa$ B $\alpha$	Watanabe et al., 2009
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Macrofagi	MAPK	Inibisce fosforil. ERK1/2	Watanabe et al., 2009
<i>Lactobacillus casei</i> YIT 9029	Macrofagi	NF $\kappa$ B	Attivazione NF $\kappa$ B	Matsuguchi et al., 2003
<i>Lactobacillus crispatus</i> M247	CEI	PPAR $\gamma$	> attività transcriptzionale	Voltan et al., 2008
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Macrofagi	NF $\kappa$ B	attivazione NF $\kappa$ B	Klebanoff et al., 1999
<i>Lactobacillus fermentum</i> DSMZ 20052	CEI	NF $\kappa$ B	Blocca attivazione NF $\kappa$ B	Frick et al., 2007
<i>Lactobacillus fermentum</i> DSMZ 20052	CEI	MAPK	< attivazione p38	Frick et al., 2007

<i>Lactobacillus fermentum</i> YIT 0159	Macrofagi	NF $\kappa$ B	Attivazione NF $\kappa$ B	Matsuguchi et al., 2003
Probiotico	Modello	Via Segnalazione	Effetto	Referenza
<i>Lactobacillus fermentum</i> YIT 0159	Macrofagi	MAPK	Attivazione JNK	Matsuguchi et al., 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CEI	NF $\kappa$ B	Inibisce proteosoma	Petrof et al., 2009
<i>Lactobacillus plantarum</i> K8	Macrofagi	NF $\kappa$ B	Inibisce degradaz. I $\kappa$ B $\alpha$	Kim et al., 2008
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Macrofagi	MAPK	< p38, JNK	Kim et al., 2008
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CEI	NF $\kappa$ B	Previene degradaz. I $\kappa$ B $\alpha$	Ma et al., 2004
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475	Macrofagi	apoptosi	Sopprime Bcl-2 e Bcl-x <sub>L</sub>	Iyer et al., 2008
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475	Macrofagi	NF $\kappa$ B	< ubiquitizz. I $\kappa$ B $\alpha$	Iyer et al., 2008
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475	Macrofagi	MAPK	Incrementa JNK e fosforilazione p38	Iyer et al., 2008
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475	Macrofagi	MAPKs	< fosforilazione ERK1/2	Iyer et al., 2008
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475	Macrofagi	AP-1	< fosforilazione c-Jun	Lin et al., 2008
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	CEI	hsp	Induce hsp25 e hsp72, heat shock TF1	Tao et al., 2006
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	CEI	MAPKs	Incrementa fosforilazione p38 e JNK	Tao et al., 2006
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	CEI	NF $\kappa$ B	Previene ubiquitizzazione e degrad. I $\kappa$ B $\alpha$	Kumar, 2007 Lin et al., 2009
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	CEI	MAPK	Up-regolazione di geni-f MAPK relativi	Di Caro, 2005; Lin, 2008
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	CEI	apoptosi	Attiva Akt/PI3K	Yan, 2002 Yan, 2007
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	Macrofagi	NF $\kappa$ B	Induce attività NF $\kappa$ B	Miettinen et al., 2000
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lcr	Macrofagi	apoptosi	> Bax pro-apoptotica, libera citocromo-c, attiva caspasi-9 & 3	Chiu, 2009
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1	Macrofagi	MAPKs	Attiva JAK2-STAT3 ad inibire attivaz. JNK	Kim, 2006
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> FRE1	Macrofagi	NF $\kappa$ B	< legame di LPS a CD14	Menard, 2004
“ <i>Saccharomyces boulardii</i> ”	CEI	apoptosi	Previene attiv. di caspasi-3	Czerucka, 2000
“ <i>Saccharomyces boulardii</i> ”	Macrofagi	NF $\kappa$ B	Previene degradaz. I $\kappa$ B $\alpha$	Sougioultzis, 2006
<i>Salmonella typhimurium</i> PhoP	CEI	NF $\kappa$ B	Inibisce ubiquitizz. I $\kappa$ B $\alpha$	Neish, 2000
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	CEI	MAPK	Attivazione di ERK1/2 e p38	Resta-Lenert, 2006
<i>Streptococcus thermophilus</i> St065	Macrofagi	NF $\kappa$ B	< legame di LPS a CD14	Menard, 2004

ERK: extracellular signal-regulated kinases; hsp, heat shock protein; CEI: cellule epiteliali, intestinali; I $\kappa$ B $\alpha$ : inhibitor NF $\kappa$ B; JNK: c-Jun N-terminal kinase; LPS: lipopolisaccaridi; MAPK: mitogen-activated protein kinase; NF $\kappa$ B: nuclear factor-kappaB; PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator activated receptor-gamma; SOCS: suppressor of cytokine signaling; STAT: signal transducer and activator of transcription.

