

PROBIOTICI E SALUTE UMANA - 2013: ***Lo stato dell'arte basato sulle evidenze***

A cura di
Paolo Aureli
Giuseppe Banderali
Lucio Capurso
Anna Maria Castellazzi
Mario Clerici
Marcello Giovannini
Lorenzo Morelli
Andrea Poli
Fabrizio Pregliasco
Mariangela Rondanelli
Filippo Salvini
Gian Vincenzo Zuccotti

con la collaborazione di
Claudio Cricelli, Silvio Danese, Gianfranco Delle Fave, Giuseppe Fatati, Walter Marrocco

con il coordinamento di
NFI
Nutrition Foundation of Italy

Prefazione

I probiotici sono costituenti dalle caratteristiche pressoché esclusive nel variegato panorama dei costituenti alimentari, che annovera sia nutrienti che altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico. 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 crescente impiego di probiotici negli integratori alimentari, dove ormai hanno fatto registrare una lunga storia di consumo.

Infatti, come è stato premesso nella ultima revisione delle linee guida ministeriali, l'ingresso dei probiotici in Italia nella composizione degli integratori risale a circa 30 anni fa, quando tali prodotti non avevano ancora una regolamentazione specifica e ricadevano all'interno del campo normativo dei prodotti "dietetici", la cui immissione in commercio era subordinata alla preventiva autorizzazione del Ministero della Salute.

Non avendo la "valenza nutrizionale" allora richiesta per la collocazione tra i "dietetici" e non essendo ancora codificato sul piano normativo il ruolo "fisiologico" delle "altre sostanze" alimentari, nei primi prodotti autorizzati come integratori i probiotici rappresentavano solo una componente complementare a quella "nutritiva", costituita per lo più da vitamine del gruppo B.

In considerazione della finalità della componente complementare, che era chiaramente preponderante nel profilo di "attività" di associazioni del genere, furono messe a punto le prime linee guida sulle condizioni minime di apporto giornaliero di cellule vive per dare un significato a tale presenza e, conseguentemente, poterne rivendicare in etichetta l'effetto utile a favorire "l'equilibrio/il riequilibrio della flora batterica intestinale".

Tale indicazione, di fatto, rappresenta il primo beneficio di tipo "fisiologico" riconosciuto per l'etichettatura di integratori con finalità salutistiche, in un'epoca in cui le rivendicazioni di effetti sulla salute venivano comunemente considerate in contrasto con il divieto di attribuire agli alimenti proprietà di prevenzione e cura e gli integratori alimentari, nel presupposto della loro valenza nutritiva, venivano genericamente indicati in etichetta per il consumo in caso "di ridotto apporto o aumentato fabbisogno" dei loro costituenti.

Quando poi la direttiva 2002/46/CE ha formalmente ammesso come costituenti di integratori alimentari anche le sostanze diverse dai nutrienti in grado di svolgere "effetti fisiologici" per finalità salutistiche, i probiotici hanno potuto finalmente rappresentare la componente esclusiva di tali prodotti.

Si può quindi affermare che i probiotici rappresentano l'esempio emblematico dell'evoluzione del ruolo riconosciuto agli alimenti e ai loro costituenti sul piano normativo: dal contributo al soddisfacimento dei fabbisogni nutrizionali fino a quello per l'ottimizzazione della salute e del benessere.

L'effetto "fisiologico" volto a favorire l'equilibrio della flora intestinale, condizionato alla "dose" del probiotico in grado di colonizzare a livello intestinale, è sempre stato considerato utile per il benessere generale dell'organismo.

Con l'avvento del Regolamento (CE) 1924/2006 sui claims nutrizionali e i claims sulla salute e le sue modalità applicative per disciplinare orizzontalmente la comunicazione sulle proprietà nutritive e gli effetti degli alimenti sulla salute, si viene invece a determinare una situazione conflittuale sul riconoscimento dei benefici offerti dai probiotici.

Al di là delle difficoltà poste da una valutazione richiedente necessariamente appositi studi condotti sull'uomo, l'EFSA arriva alla conclusione che favorire l'equilibrio della flora batterica

intestinale non è in sé un beneficio se non si prova quali specifici vantaggi per la salute ne conseguano (ad esempio una concomitante diminuzione dei microrganismi potenzialmente patogeni o altro). Solo tali specifici vantaggi, pertanto, sarebbero i benefici meritevoli di essere rivendicati come claims sulla salute.

In questa ottica l'effetto favorevole dei probiotici sulla composizione della flora batterica diventa solo la premessa generale di benefici "a valle", che restano in sospeso, ai fini di una possibile indicazione, se non vengono prima definiti specificamente ad uno ad uno per essere provati ad hoc. E' come dire che, ad esempio, assumendo un integratore di calcio in caso di ridotto apporto con la dieta ordinaria del minerale il conseguente effetto sull'ottimizzazione del suo stato nutrizionale nell'organismo non sarebbe in sé benefico.

Per l'impiego di probiotici in prodotti alimentari un approccio del genere alla valutazione di efficacia appare fortemente sproporzionato.

Considerando che un ecosistema intestinale in equilibrio ottimale viene comunemente considerato a livello medico-scientifico un determinante utile per il benessere, e conseguentemente un obiettivo da perseguire, non si vede perché un effetto fisiologico chiaramente volto alla sua salvaguardia o al suo pieno recupero non debba essere considerato di per sé un beneficio.

Peraltro, sono autorizzati claims come "*contribuisce alla normale funzione del sistema immunitario*" per apporti di vitamina A, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, ferro, zinco, da soli o in associazione, pari ad almeno il 15% con la dose giornaliera di un integratore o per 100 g/ml di un alimento.

Ci troviamo quindi in una situazione contraddittoria. Nello stesso quadro normativo, per un apporto alimentare ad esempio di 12 mg di vitamina C, si legittima la rivendicazione di effetti volti a favorire le naturali difese dell'organismo nei termini e alle condizioni sopra indicati mentre per probiotici in grado di colonizzare a livello intestinale alle condizioni previste dalle linee guida ministeriali non si possono rivendicare proprietà analoghe documentandone l'effetto eubiotico.

Appare evidente che il complesso delle evidenze scientifiche non supporta una tale sperequazione e che le rivendicazioni ammesse per le vitamine e i minerali ex articolo 13.1 del Regolamento (CE) 1924/2006 godono di un ingiustificato trattamento, configurandosi alla stregua di indicazioni ricavate da testi di biochimica (peraltro non sempre utili per il consumatore medio sul piano informativo) che non potrebbero mai essere provate attraverso studi ad hoc alle condizioni minime stabilite.

Occorrono quindi dei correttivi per un approccio proporzionato alle rivendicazioni di efficacia dei probiotici impiegati negli alimenti, come per tutte le sostanze diverse da vitamine e minerali, considerando che le misurazioni ad hoc degli effetti, da un lato, pongono grandi difficoltà nella selezione dei soggetti sani e, dall'altro, possono portare alla fissazione di apporti che si sovrappongono a quelli richiesti per effetti terapeutici.

I claims ammessi per gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena come EPA e DHA, in relazione al controllo dei normali livelli di trigliceridemia (apporto di 2 g) o della pressione arteriosa (apporto di 3 g), come quello della monacolina per il controllo di normali livelli di colesterolemia (10 mg, a fronte dei 3 mg precedentemente fissati a livello nazionale sulla base del complesso delle evidenze scientifiche e non di studi ad hoc) ne rappresentano casi eclatanti.

Il favore che i probiotici continuano ad incontrare presso il pubblico sta nel fatto che, al di là delle indicazioni riportate in etichetta, il loro uso è consolidato ed è ormai comunemente noto al consumatore medio l'ambito dei benefici salutistici che ne può ricavare, a partire dall'effetto eubiotico sull'ecosistema intestinale.

Le linee guida ministeriali sono volte a tutelare e a promuovere, oltre naturalmente alla sicurezza, l'efficacia dei prodotti con probiotici, che è condizionata da un livello di qualità

adeguato.

Nel quadro normativo descritto, per vari aspetti conflittuale come si è visto, solo prodotti conformi alle prescrizioni delle linee guida possono avvalersi della qualifica di "probiotici", considerando le garanzie di qualità che devono fornire per le attese ingenerate nei consumatori dal solo uso di tale qualifica.

Sul piano regolatorio una indicazione del tipo "favorisce l'equilibrio della flora intestinale", con storia trentennale in Italia, non è considerata ad oggi come un claim sulla salute e pertanto non è autorizzabile ai sensi del Regolamento (CE) 1924/2006. D'altra parte, a fronte di qualunque dossier volto a documentare benefici conseguenti all'effetto favorevole sulla flora intestinale, l'EFSA continua invariabilmente a pronunciarsi per l'insufficienza delle prove.

In una situazione del genere, appare auspicabile una revisione generale dei criteri di valutazione per riportare al centro, come elemento di prova, l'uso tradizionale nel complesso delle evidenze disponibili.

Nel contempo, ferma restando la necessità di mettere in atto tutte misure necessarie per assicurare un adeguato livello di qualità dei prodotti contenenti probiotici, appare auspicabile anche riconoscere il beneficio di un effetto eubiotico e la sua utilità come elemento informativo in etichetta secondo i criteri delle linee guida ministeriali. Ciò al fine di orientare correttamente i consumatori nelle scelte secondo le loro esigenze ed aspettative con un linguaggio ad essi familiare e comprensibile.

Bruno Scarpa, Ministero della Salute

Presentazione

Sono passati tre anni dalla presentazione del Position Paper relativo agli effetti dei Probiotici sulla salute umana, elaborato da un gruppo di esperti nazionali coordinato da NFI.

La letteratura scientifica relativa agli effetti favorevoli di questi microrganismi sulla salute umana ha continuato ad accumularsi, e le metanalisi che hanno valutato complessivamente i loro effetti in specifiche condizioni fisiologiche e patologiche sono ormai numerose. Spesso queste analisi (anche quelle condotte dal rigoroso gruppo Cochrane) concludono sottolineando la significatività dell'effetto considerato.

Il Position Paper è stato rivalutato interamente. Sono stati aggiunti un capitolo relativo agli effetti dei probiotici nell'anziano, sia per la crescente quota della popolazione che fa parte della "terza età" e sia per la disponibilità, ormai ricca, di evidenze scientifiche sul tema, ed uno sugli effetti epigenetici dei probiotici: un'area di crescente interesse in tutto l'ambito della relazione tra alimentazione salute. La bibliografia del Paper è stata aggiornata.

Pur in questo contesto di crescente interesse della comunità scientifica, e di crescente disponibilità di dati, la situazione normativa dei prodotti a base di probiotici (ed in particolare la loro possibilità di vantare specifici claims di salute) appare tuttora complessa: EFSA non ha infatti ritenuto di accettare alcuno dei claims relativi a questi prodotti sottoposti alla sua valutazione.

La principale novità, nel settore è probabilmente rappresentata dall'elaborazione, da parte del Ministero della Salute Italiano, di una linea guida che definisce molti aspetti della produzione, della commercializzazione e della presentazione al pubblico di questi prodotti: una dettagliata analisi di questo documento, e delle sue implicazioni operative, è contenuta nella prefazione a questa nuova versione del documento redatta dal dr. Bruno Scarpa, del Ministero della Salute.

I prodotti contenenti probiotici continuano a rappresentare, nel mercato Italiano, un'area importante, anche sul piano economico. E' opinione di NFI che il raccordo tra comunità scientifica e mondo produttivo possa portare ad una migliore comprensione dei vantaggi associati al loro uso regolare ed a una più adeguata regolamentazione della comunicazione ai consumatori di queste valenze nutrizionali.

Andrea Poli - NFI

POSITION PAPER
“PROBIOTICI E SALUTE UMANA 2013:
STATO DELL’ARTE BASATO SULLE EVIDENZE”

A cura di:

Paolo Aureli, Consigliere FOSAN, Fondazione per lo studio degli alimenti e della Nutrizione, Roma;

Giuseppe Banderali, U.O. Neonatologia e Patologia Neonatale Ospedale San Paolo, Università degli Studi di Milano;

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 Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche, Unità di Pediatria, Università degli Studi di Pavia;

Mario Clerici, Professore Ordinario di Immunologia, Università degli Studi di Milano, Direttore della Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare e Traslazione e Direttore Scientifico, IRCCS SM Nascente, Fondazione Don Gnocchi, Milano;

Marcello Giovannini, Professore Emerito di Pediatria, Università degli Studi di Milano; Presidente Società Italiana di Nutrizione Pediatrica (SINUPE);

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 del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano;

Mariangela Rondanelli, Professore Associato in Scienze e Tecniche dietetiche, Responsabile Unità Endocrino-Nutrizionale, Azienda di Servizi alla Persona, Polo Universitario Geriatrico, Università degli Studi di Pavia;

Filippo Salvini, Dottore di Ricerca in Nutrizione Sperimentale e Clinica presso l'Università degli Studi di Milano, Dirigente medico Clinica Pediatrica Ospedale San Paolo-Milano;

Gian Vincenzo Zuccotti, Direttore Clinica Pediatrica dell'Università degli Studi di Milano, Ospedale L. Sacco, e Professore Ordinario presso la facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Milano

Con la collaborazione di:

Claudio Cricelli, Silvio Danese, Gianfranco Delle Fave, Giuseppe Fatati, Walter Marrocco.

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 (Qin J, 2010; Jones BV, 2010; Kurokawa K, 2007; Gill SR, 2006; Jones BV, 2007; Ley RE, 2008). E' 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 m².

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 seguente:

Tabella 1: Distribuzione del *microbiota* nell'apparato digerente.

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

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 (Backhed F, 2005; Ley RE, 2006; Cani PD, 2009; Hooper LV, 2001).

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 (GALT=*gut-associated lymphoid tissue*). 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 $\gamma\delta$ 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 (Qin J, 2010; Jones BV, 2010; Kurokawa K, 2007; Gill SR, 2006; Jones BV, 2007; Ley RE, 2008). 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 (Qin J, 2010), 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* (box 1)
- *Resistenza alla colonizzazione*: Nissle nel 1916 (Nissle S, 1916) 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 (Cummings JH, 1997).
- *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 (Resta SC, 2008).
- *Produzione di vitamine*: specie del gruppo B e K (Lanning DK, 2005).
- *Interazioni con il sistema immunitario di mucosa* (Tsuji M, 2008; Turnbaugh PJ, 2009)
- *Degradazione di xenobiotici*: grazie a geni in grado di sintetizzare enzimi ad attività catabolica verso questi composti (Qin J, 2010).

E' importante in prospettiva osservare anche che la diversa capacità del *microbiota*, a seconda della sua composizione, di "estrarre" le calorie della dieta (Ley RE, 2010; Falk PE, 1998) potrebbe rappresentare una possibile chiave di interpretazione fisiopatologica del sovrappeso e dell'obesità.

La Tabella 2 riassume alcuni aspetti funzionali o anatomici dell'organismo ospite imputabili alla presenza ed all'attività del *microbiota* intestinale, basandosi sulle differenze rilevabili tra animali germ-free ed animali riconvenzionalizzati.

Tabella 2

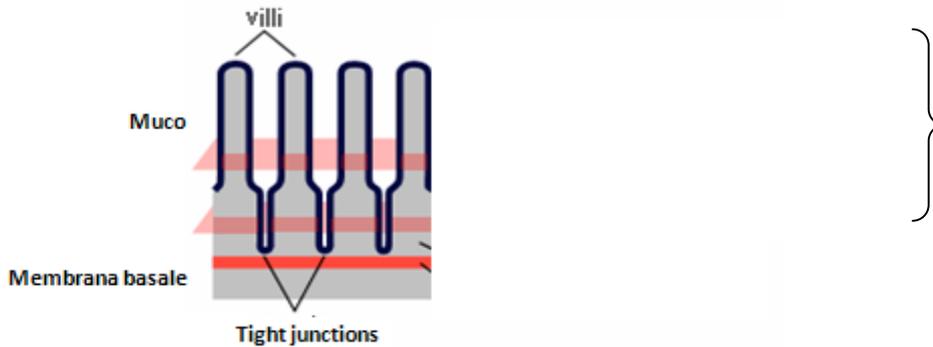
Pre-epiteliale (batteri, muco. ecc)

	Epiteliale (tight junctions) (animali germ-free)	MAC BARRIERA MUCOSA (ex germ-free riconvenzionalizzati)
Epitelio intestinale	Post-epiteliale (membrana basale) Sottile	Ispessito
Cinetica degli enterociti	Lenta	Veloce
Metabolismo Acidi Biliari	Deconiugazione significativa	Deconiugazione 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. E' 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-κB)(Caballero-Franco C, 2007).

Dal microbiota al probiotico

La definizione oggi internazionalmente accettata di "probiotico" è quella elaborata da un gruppo di esperti congiuntamente convocati nel 2001 (FAO/WHO, 2001) 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 (Ministero della Salute, 2005) 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. E' 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 (FAO/WHO, 2002).

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

Una recente rassegna sintetica (Thomas CM, 2010) 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 (Thomas CM, 2010) è presentata in allegato in calce a questo documento.

I meccanismi più importanti, a tale proposito, sono schematizzati nel box 2.

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 (Tao Y, 2006). Nell'intestino i probiotici inducono la produzione di *heat shock proteins* citoprotettive (Petrof EO, 2004).

- *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 NFκB, presente nel citoplasma nella sua forma inattiva, legato alle molecole inibitorie della famiglia IκB. In presenza di stimoli pro-infiammatori, IκB viene fosforilata, si stacca da NFκB e permette così all'NFκB stesso di migrare dal citoplasma al nucleo, attivando la trascrizione di geni specifici (Neish AS, 2000). Alcuni probiotici modulano la degradazione di IκBα, mentre altri stimolano NFκB ad incrementare la secrezione di specifiche citochine (Ruiz PA, 2005). *Lactobacillus plantarum* inibisce l'attività di NFκB e la degradazione di IκB *in vitro* (Petrof EO, 2009). Un altro bersaglio molecolare modulato da parte dei probiotici è il PPARγ, 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 NFκB (PPARγ è infatti ridotto nelle CEI di pazienti con malattie infiammatorie intestinali, o IBD) (Voltan S, 2008; Dubuquoy L, 2003). Il trattamento con ceppi specifici di probiotici può aumentare l'espressione di PPARγ, e migliorare quindi l'infiammazione in pazienti con IBD (Kelly D, 2004; Are A, 2008):

- *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 stimulate con varie citochine (TNF-, IL-1α- or IFNγ). 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 (Yan F, 2007). La capacità dei probiotici di regolare l'apoptosi può rappresentare anche un'utile strategia per il controllo delle infezioni intestinali (Czerucka D, 2000).

- *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 (si veda la Tabella in appendice).

Aspetti critici della relazione tra probiotici ed organismo ospite

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 la valutazione di sicurezza batterica, recentemente introdotto da parte di EFSA).

1. I Probiotici come batteri vivi.

La tradizione che risale a Metchnikoff prevede sia l'uso di una matrice alimentare fermentata da parte di un batterio "benefico" 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 e sia 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 (Tabella 3).

Tabella 3. 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
<i>Bifidobacterium longum</i> /W11	Bassa induzione di IL10 e alta induzione di Th1	Medina et al, 2007
<i>Bifidobacterium longum</i> /NCIMB 8809 e <i>Bifidobacterium longum</i> /BIF53	Alta induzione di IL10 bassa induzione di Th1	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> /GG e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> / 1970-2	Differenza nella capacità di colonizzazione in vivo	Jacobsen et al, 1999
<i>Lactobacillus crispatus</i> /M247 e <i>Lactobacillus crispatus</i> /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 nella letteratura scientifica da essere 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*" (FAO/WHO, 2001), come pure nel documento AFSSA (Agence 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*" (AFSSA, 2005).

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

- report FAO/WHO 2001 (FAO/WHO, 2001)
- linee guida Ministero della Salute 2005 (Ministero della Salute, 2005)

- 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 eccessivamente basso, se si intende influenzare in modo misurabile la composizione del *microbiota* del ricevente. Va enfatizzato il fatto che nel caso delle associazioni microbiche 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 (AFSSA, 2005) 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 10^6 CFU/mL in the small intestine (ileum) and 10^8 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 superamento della barriera gastrica e/o del piccolo intestino, anche se esistono buoni supporti teorici all'esistenza di una tale sinergia; alcuni lavori, peraltro, sembrerebbero suggerire in casi specifici un'interazione negativa tra i ceppi impiegati.

3. Quale tipo di beneficio.

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"*.

E' 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.

4. Sicurezza

L'accertamento della sicurezza delle specie microbiche proposte come probiotici per l'uomo ha sempre costituito un punto fermo per le Autorità Regolatorie, specialmente dopo la pubblicazione di rapporti clinici su occasionali infezioni attribuibili al loro impiego, che hanno interessato soprattutto pazienti immunocompromessi (Gasser, 1994; Aquirre and Collins, 1993; Saxelin et al., 1996a,b; Rautio et al 1999, Mackay et al 1999)

Per lungo tempo, la commercializzazione di probiotici sotto forma di alimenti vari, principalmente prodotti lattiero-caseari, o come integratori commercializzati sotto varie forme farmaceutiche, non è stata subordinata ad una formale valutazione di sicurezza quando si poteva vantare l'esistenza di una lunga tradizione d'uso senza problemi per la salute dei consumatori; negli USA, ad esempio, molti microrganismi con tale storia venivano qualificati GRAS (*generally recognized as safe*) dalle autorità per la loro commercializzazione. In effetti, specifiche sorveglianze post-market e studi clinici controllati utilizzando lattobacilli e bifidobatteri non hanno rilevato alcun effetto avverso nei consumatori o nei soggetti trattati (Saxelin et al., 1996a,b; Gasser, 1994; Adams and Marteau, 1995).

L'enorme favore che i prodotti probiotici hanno incontrato tra i consumatori, testimoniato dalle grandi quantità consumate ogni anno in molti Paesi industrializzati, hanno promosso la loro produzione su larga scala e facilitato la deliberata introduzione di microrganismi nella filiera alimentare. Questo fatto ha finito per aprire un ampio dibattito sull'opportunità di definire più precisi criteri con cui documentare la sicurezza d'uso delle colture microbiche per l'uomo e gli animali (Donohue e Salminen, 1996, Lee e Salminen, 1995, Salminen et al 1996; Salminen et al 1998; Saarela et al 2000; Wessels et al 2004).

Così, alcuni autori hanno proposto linee guida per la valutazione della sicurezza dei microrganismi probiotici (Salminen et al., 1998; Adams, 1999; Saarela et al., 2000) che prevedono i seguenti criteri per i ceppi microbici destinati all'uso umano: avere un'origine umana; essere stati isolati dal tratto gastrointestinale di soggetti sani; possedere una storia documentata come germi non patogeni; non essere stati associati a malattie e, infine, non essere portatori di geni trasmissibili di resistenza agli antibiotici, soprattutto alla luce dei seri problemi che tale situazione potrebbe porre nel trattamento delle infezioni microbiche.

Più recentemente, l'Autorità Europea di Sicurezza Alimentare (EFSA), sensibilizzata sulla medesima questione, ha elaborato ed introdotto (EN2003; EFSA, 2004) un nuovo sistema per la valutazione pre-market della sicurezza di gruppi selezionati di microrganismi, deliberatamente addizionati ad alimenti e/o mangimi o utilizzati nella produzione di alimenti e mangimi, grazie al quale gli stessi possono acquisire lo status QPS, o Presunzione Qualificata di Sicurezza.

In base a questo sistema, 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 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 sulla verifica dell'assenza di resistenze trasferibili relative ad antibiotici d'interesse clinico e veterinario, e dell'assenza di fattori di virulenza (Barlow S, 2007; EFSA 2011). Si vuole così evitare che a causa dell'ampia

distribuzione ambientale dei microrganismi utilizzati dall'industria, questi possano aumentare il pool dei geni di resistenza agli antibiotici già presenti nelle popolazioni microbiche del tratto intestinale e, in special modo, incrementare il rischio di un loro trasferimento ai consumatori attraverso la filiera alimentare (Jansen WT, 2006).

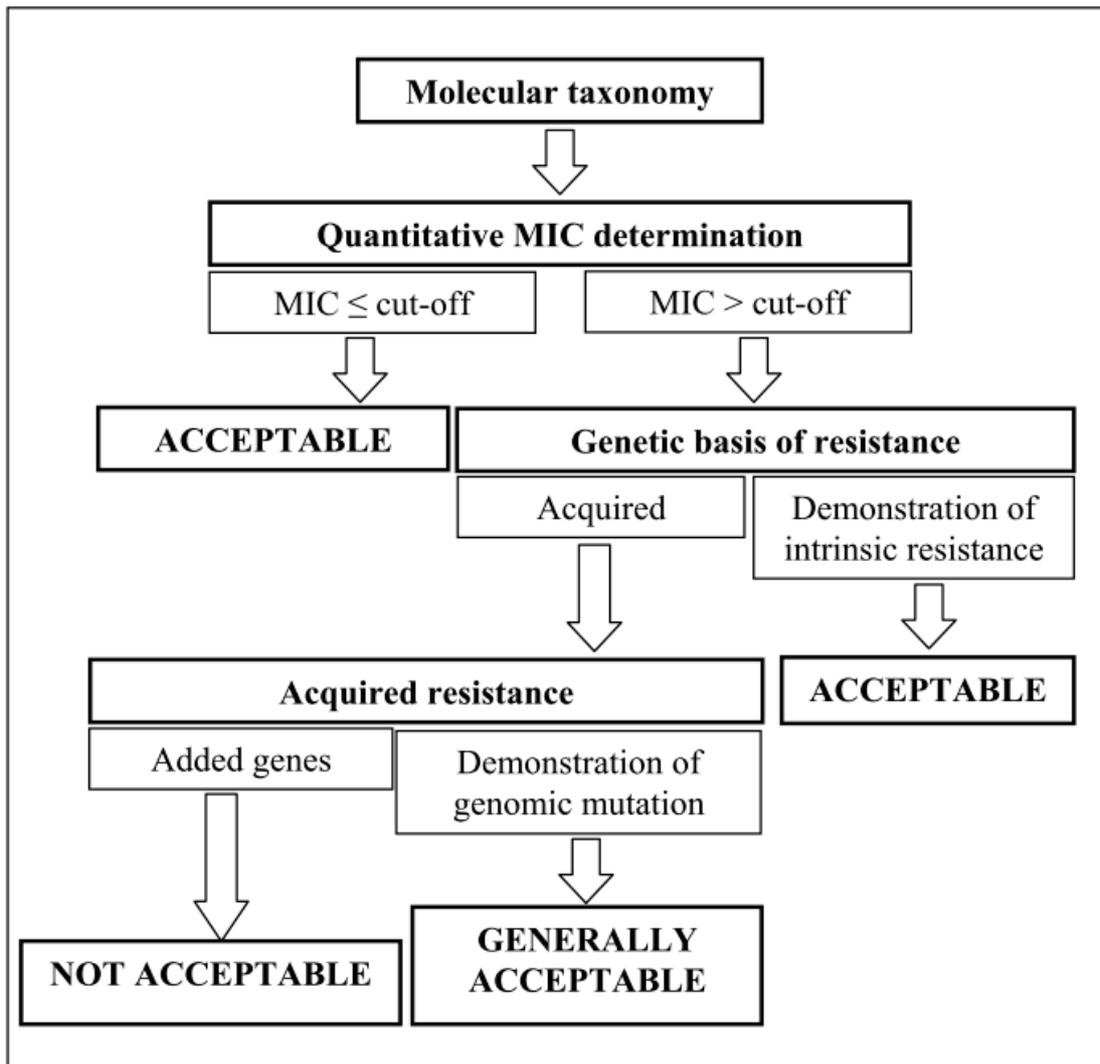
Come è noto, nei microrganismi si riconosce una resistenza intrinseca e una resistenza acquisita; la prima è una caratteristica naturale della specie, con un'assai bassa possibilità di essere trasferita orizzontalmente. La resistenza acquisita, invece, è un'atipica resistenza che i ceppi sensibili possono acquisire attraverso mutazioni cromosomiali o l'assunzione di elementi genetici (plasmidi e transposoni) da altri batteri, verosimilmente per coniugazione (de la Cruz e Davis, 2000).

I lattobacilli sono naturalmente (intrinsecamente) resistenti all'acido nalidixico, ai chinoloni, al trimetoprim e ai sulfamidici, e sensibili, invece, a tutti gli inibitori della sintesi proteica tranne gli aminoglicosidi (Charteris et al 1998; Mathur e Singh, 2005). Anche la resistenza ai glicopeptidi di molte specie di lattobacilli (tranne *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, and *L. crispatus*) è considerata intrinseca (Belletti et al, 2009; Charteris et al 1998b). Per i bifidobatteri è riconosciuta, invece, un'intrinseca resistenza a kanamicina, gentamicina, streptomycin, polimixina B, acido nalidixico, paromomicina e neomicina (D'aimmo et al 2007).

Nel caso dei microrganismi destinati al settore veterinario, le resistenze intrinseche dei ceppi possono essere distinte da quelle acquisite utilizzando uno schema definito dal Panel EFSA on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (EFSA, 2012); questo schema si ritiene utilizzabile anche nel caso dei ceppi destinati all'uomo.

Le specie microbiche che ospitano resistenze antibiotiche acquisite possono essere riconosciute dai ceppi sensibili mediante un test di sensibilità utilizzando breakpoints microbiologici stabiliti sulla base di dati di letteratura e/o di programmi di monitoraggio nazionali ed europei. E' essenziale che i tests con cui stabilire la sensibilità dei ceppi che si intende utilizzare per l'uomo e gli animali siano effettuati in maniera appropriata impiegando metodi internazionalmente riconosciuti e standardizzati (Huys et al 2010; ISO 2010).

Le più recenti linee guida emanate del Ministero della Salute per gli integratori alimentari a base di o con probiotici richiedono la dimostrazione dell'identità del ceppo mediante metodi molecolari e la verifica dell'assenza di resistenze trasferibili.



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-kB o in associazione ad una azione antiapoptotica sulle cellule dell'epitelio intestinale (Tien MT, 2006; Yan F, 2002)
3. Alcuni probiotici sono in grado di aumentare l'attività delle cellule Natural Killer (Takeda K, 2006; Kazuyoshi, 2007) 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 (Caballero-Franco C, 2007).
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) (Niers LE, 2007).
6. Alcuni ceppi di *Lactobacillus* inducono la maturazione delle Cellule Dendritiche (CD) (Smits HH, 2005). Le CD sono in grado, per mezzo dei loro processi estensivi che attraversano lo strato di cellule epiteliali, di catturare direttamente dal lume alcuni contenuti. 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.
7. Dati recenti hanno poi ulteriormente chiarito la complessità delle interazioni che avvengono tra il microbiota, la risposta immune, e il sistema gastroenterico. Dunque, è stato dimostrato che la interazione tra le CD ed il microbiota induce la differenziazione dei T linfociti presenti nella lamina propria in senso TH17; queste cellule producono la citochina IL22 che, a sua volta, induce la sintesi dei peptidi ad azione antimicrobica regenerating islet-derived protein 3 β (REGIII β) e REGIII γ . Questi ultimi svolgono due importanti azioni:
 1. Regolano la composizione del microbiota e
 2. Modulano la segregazione spaziale tra microbiota e parete intestinale (creano e mantengono, dunque, uno spazio fisico tra queste due componenti)(Vaishnava S et al, Science, 334:255-258, 2011) .

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 (Iliev ID, 2005; Iliev ID, 2008). 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 (Kaur IP, 2002; Marco ML, 2006).

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 (Perdigon G, 1999). Effetti positivi si sono riscontrati anche nei fumatori abituali, caratterizzati da un'attività ridotta delle cellule NK (Morimoto K, 2005). Altri recenti dati hanno poi confermato come l'utilizzo di alcuni probiotici (es. lactobacilli) potenzi la risposta immunitaria sia sistemica che mucosale antigene specifica indotta dalle vaccinazioni anche in soggetti giovani e non affetti da patologie (Rizzardini et al, BJN, 107:876-884, 2012). Questi dati confermano le proprietà adjuvanti nei confronti di vaccini umani dei probiotici, potenzialmente suggerendo la possibilità di affiancare la vaccinazione con l'utilizzo degli stessi probiotici per ottimizzare la risposta vaccinale.

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 le occasioni di cura con antibiotici (Hatakka K, 2001; Lin JS, 2009; Marseglia GL, 2007).

PROBIOTICI E SALUTE

Malattie intestinali pediatriche

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 tolleranza 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 (Lu L, 2001; Santos S, 2006) 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 (Zuccotti GV, 2008). 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 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 (Zajewska H, 2006; Davidson GP, 2000; NASPGHAN, 2006; Guandalini S, 2006). I probiotici riducono la durata della diarrea infettiva di 0,7 giorni e riducono la frequenza degli episodi diarroici già nelle prime ore (Van Niel CW, 2002). 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* (Szajewska H, 2001; Guandalini S, 2000; Kaila M, 1992; Szymanski H, 2006) Questo probiotico è in grado di diminuire l'escrezione di rotavirus nelle feci (Oberhelman R, 1999), 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 (Costa-Ribeiro H, 2003; Mastretta E, 2002; Salazar-Lindo E, 2004). 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 (Szajewska H, 2001; Salazar-Lindo E, 2004). 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 (Mack DR, 1999). Uno studio del 2005 ha invece dimostrato l'efficacia del *Lactobacillus paracasei* ST1 nelle gastroenteriti non determinate da rotavirus (Sarker SA, 2005).

A conferma di ciò una recente meta-analisi (Szajewska H, 2011) ha analizzato i risultati di 3 studi randomizzati controllati (1092 bambini ospedalizzati) concludendo che la somministrazione di LGG, per l'intera durata dell'ospedalizzazione, porta ad una significativa riduzione degli episodi di diarrea nosocomiale, comprendendo anche le gastroenteriti da rotavirus, rispetto al placebo. Per prevenire 1 caso di diarrea nosocomiale è necessario trattare 12 bambini.

Risultati che confermano l'efficacia della supplementazione con probiotici nella terapia delle gastroenteriti in età pediatrica, vengono rilevati anche da una review (Cremonini F, 2002), 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*.

Nel 2010 una revisione Cochrane coordinata da Allen et al. su 56 studi randomizzati controllati condotti in età pediatrica ha evidenziato come la supplementazione con probiotici riduca la durata della diarrea acuta di circa 1 giorno oltre a ridurre la frequenza delle scariche diarroidi (Probiotics for treating acute infectious diarrhea (Allen SJ, 2010).

Più recentemente un ulteriore studio randomizzato, ben condotto, su 129 bambini dai 6 mesi ai 6 anni ha mostrato come la supplementazione con *Lactobacillus GG* acceleri la regolarizzazione della funzione intestinale in pazienti valutati in pronto soccorso per diarrea acuta (Nixon AF, 2012).

Diarrea associata a terapia antibiotica

L'incidenza di diarrea in corso di terapia antibiotica (AAD) è del 5-30% (Szymanski H, 2006). 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 (Szajewska H, 2006).

Recenti meta-analisi riportano un'importante riduzione dei casi di AAD quando alla terapia antibiotica sia associato un trattamento preventivo con probiotici (Szajewska H, 2006; Cremonini F, 2002; D'Souza AL, 2002). Il microrganismo più efficace sembra essere *Saccharomyces boulardii*, tuttavia nei bambini si è dimostrato efficace anche LGG (Arvola T, 1999; Lewis SJ, 1998). *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* (Castagliuolo I, 1999). 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 (McFarland LV; 2009); 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.

Una recente revisione Cochrane (Johnston BC, 2011) ha selezionato 16 studi randomizzati condotti su un totale di 3432 pazienti trattati con diversi ceppi (tra cui *Bacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacilli spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc cremoris*, *Saccharomyces spp.*, or *Streptococcus spp.*, soli o in combinazione; 7 studi su 16 riguardavano *S. boulardii* or *Lactobacillus rhamnosus spp.*). La metanalisi ha evidenziato 3 bias principali: definizione eterogenea di diarrea, grande variabilità di dosaggio dei probiotici somministrati (da 200 milioni a 40 miliardi CFU/die), mancanza di dati dettagliati sulle terapie antibiotiche (presenti solo in 6 lavori su 16). Nonostante questi limiti, la revisione conclude per un effetto protettivo dei probiotici verso la diarrea associata a antibiotici; in particolare il NNT per prevenire 1 caso di AAD sarebbe pari a 7 (NNT 7; 95% CI 6 to 10). In particolare la revisione individua due ceppi con particolare efficacia *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii* a dosi variabili da 5 a 40 miliardi CFU/die (Johnston BC, 2011).

Una recentissima review Cochrane (Goldenberg JZ, 2013) ha analizzato 23 studi randomizzati controllati presenti in letteratura, per un totale di 4.213 soggetti (adulti e bambini). I risultati di questa review hanno dimostrato che i probiotici riducono del 64% il rischio di diarrea associata a *Clostridium difficile* (CDAD). Gli autori concludono che ci sono moderate evidenze che supportano un effetto protettivo da parte dei probiotici nella prevenzione della CDAD, ma non nella riduzione dell'incidenza di infezione da *Clostridium difficile*. La profilassi con probiotici sembra essere in grado di prevenire 35 episodi di CDAD su 1000 pazienti trattati, mentre riguardo la diarrea associata ad antibiotici (AAD) la supplementazione previene 84 episodi su 1.000 pazienti trattati.

Enterocolite Necrotizzante (NEC)

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 batterica, che causerebbero la risposta infiammatoria esagerata responsabile della necrosi ischemica dell'intestino (Claud EC, 2001).

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 del 2010 (Deshpande G, 2010) 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.

Alla stessa conclusione giunge una rassegna Cochrane del 2011 (AlFaleh K, 2011) che prende in esame 16 studi randomizzati per un totale di 2.842 bambini prematuri (< 37 settimane di età gestazionale) o di basso peso neonatale (< 2500 gr). I dati dimostrano che la supplementazione enterale con probiotici riduce significativamente l'incidenza di NEC (RR 0,35, 95% CI 0,24-0,52) e il rischio di mortalità associata (RR 0,40, 95% CI 0,27-0,60), mentre non evidenzia significative riduzioni nell'incidenza di sepsi nosocomiali. Gli autori concludono che sono necessari studi che dimostrino l'efficacia nei neonati ELBW (*extremely low birth weight*) e per identificare la migliore formulazione e dose da usare. Gli Autori sottolineano come siano ancora da definire i ceppi più efficaci e la posologia ottimale.

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 γ .

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 (Bjorksten B, 1999; Watanabe S, 2003). 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 (Giovannini M, 2007).

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 colonizzazione 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 (Abrahamsson TR, 2007; Taylor AI, 2007; Kukkonen K, 2007; Valsecchi C, 2008).

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 (Johannsen H, 2009; Yao TC, 2010) 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 (Boyle RJ, 2009) e nella prevenzione (van der Aa LB, 2010) 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.

Una recentissima revisione sistematica ha analizzato i dati di 21 studi randomizzati ben condotti (per un totale di 4.134 bambini): per quanto concerne la prevenzione della dermatite atopica con probiotici, 11 studi su 17 mostrano una certa efficacia; 5 studi, sui 6 analizzati, hanno evidenziato un effetto positivo sulla riduzione della severità della dermatite. Il probiotico che si è dimostrato più efficace è il *Lactobacillus rhamnosus* GG. (Foolad N, 2013)

Gli stessi dubbi relativi alla vasta eterogeneità degli studi presenti in letteratura, è stata sottolineata anche da una recentissima review (Meneghin F, 2012) che ha preso in esame 17 RCTs sulla prevenzione (4.490 pazienti) e 20 sul trattamento (1367 pazienti) della dermatite atopica con probiotici. Tra i ceppi utilizzati, sicuramente il *Lactobacillus* GG sia come singolo probiotico, sia all'interno di un mix di ceppi, è risultato essere il più efficace. Gli autori

concludono però che la mancata aderenza a linee guida per una corretta gestione dei protocolli di studio, rende molto poco valutabili fra loro i risultati dei singoli RCTs.

Infezioni respiratorie

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 secernono IgA nella mucosa bronchiale (Perdigon G, 1999). E' 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 (Santos JJ, 1994; Levander OA, 1997; Beck MA, 2001). 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 (Goodwin K, 2006; Iorio AM, 2007).

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.

Età pediatrica

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 (Rautava S, 2009). 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 (Leyer GJ, 2009).

Una recente revisione Cochrane del 2011 (Hao Q, 2011) ha analizzato dati provenienti da 10 RCTs (3541 soggetti tra bambini e adulti) il cui scopo era quello di verificare l'efficacia preventiva dei probiotici nelle infezioni respiratorie. I risultati hanno dimostrato nei soggetti supplementati, un ridotto numero di episodi acuti di infezione delle alte vie aeree, un minor numero di episodi/persona/anno e una riduzione nell'utilizzo di antibiotici. La conclusione degli autori è che i probiotici sembrano essere migliori del placebo nel prevenire le infezioni respiratorie delle alte vie aeree, ma gli studi analizzati presentano delle limitazioni.

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 (De Vrese M, 2006). Conclusioni simili sono state ottenute in uno studio che ha valutato l'effetto dell'assunzione a lungo termine di probiotici sulla stessa patologia (De Vrese M, 2005). 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 (Pregliasco F, 2008). 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 (Vouloumanou EK, 2009).

Effetti sull'apparato digerente

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 (Chmielewska A, 2010): 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 (Coccorullo P, 2010).

Un'altra review molto recente (Meneghin F, 2013) ha analizzato gli studi presenti in letteratura riguardo un disturbo altrettanto frequente in età pediatrica, le coliche del lattante. Riguardo la gestione di questi piccoli pazienti, c'è molta confusione e sono sempre di più le mamme che ricorrono all'utilizzo dei più svariati rimedi per controllare un disturbo che può causare molta ansia in famiglia. Dalla review emerge che in letteratura ci sono alcuni studi, anche ben condotti dal punto di vista metodologico, che dimostrano risultati promettenti soprattutto utilizzando il ceppo *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. In futuro ulteriori RCTs con minor eterogeneità potrebbero chiarire in modo definitivo se effettivamente anche in questo campo, l'utilizzo di probiotici può rivelarsi efficace.

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 influenzando aspetti della funzionalità delle cellule epiteliali intestinali o dei macrofagi (Tabella 2).

La Tabella 4 riporta i dati pubblicati in studi controllati su l'utilizzo di probiotici nella prevenzione e nel trattamento di alcuni disordini o malattie digestive.

Tabella 4.

Disordine	Ceppo	Dose	Rif.
Trattamento della diarrea acuta infettiva nei bambini	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 ¹⁰ -10 ¹¹ cfu	Allen 2004
	<i>L. reuteri</i> ATTC 55730	10 ¹⁰ -10 ¹¹ cfu x2/dì	Allen 2004
	<i>L. acidophilus</i> + B.inf.	10 ⁹ cfu x3/dì	Lee 2001
	<i>S. cerevisiae (boulardii)</i>	200 mg x3/dì	Allen 2004
Trattamento della diarrea acuta infettiva negli adulti	<i>Enterococcus faecium</i> LAB SF68	10 ⁸ cfu x3/dì	Allen 2004
Prevenzione della diarrea da antibiotici	<i>S. cerevisiae (boulardii)</i>	250 mg x2/dì	Sazawal 2006
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 ¹⁰ cfu x1-2/dì	Sazawal 2006
	<i>B. lactis</i> Bb12 + <i>S. thermophilus</i>	10 ⁷ + 10 ⁶ cfu/g formula	Sazawal 2006
	<i>Enterococcus faecium</i> LAB SF68	10 ⁸ cfu x2/dì	Sazawal 2006
	<i>S. cerevisiae (boulardii)</i>	1 g or 3x10 ¹⁰ cfu x1/dì	Sazawal 2006
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 ¹⁰ -10 ¹¹ cfu x2/dì	Sazawal 2006
Prevenzione della diarrea nosocomiale nei bambini	<i>L. casei</i> DN-114 001 in latte fermentato con <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	10 ¹⁰ cfu x2/dì	Hickson 2007
	<i>B. clausii</i>	2x10 ⁹ sporex3/dì	Nista 2004
	<i>L. acidophilus</i> CL1285 + <i>L. casei</i>	5x10 ¹⁰ cfu/dì	Beausoleil 2007
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10 ¹⁰ -10 ¹¹ cfu x2/dì	Sazawal 2006
	<i>B. lactis</i> BB12 + <i>S. thermophilus</i>	10 ⁸ + 10 ⁷ cfu/g formula	Sazawal 2006
Prevenzione della diarrea da <i>C. difficile</i> negli adulti	<i>B. lactis</i> BB12	10 ⁹ cfu x2/dì	Sazawal 2006
	<i>L. reuteri</i> ATTC 55730	10 ⁹ cfu x2/dì	Sazawal 2006
	<i>L. casei</i> DN-114 001 in latte fermentato con <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	10 ¹⁰ cfu x2/dì	Hickson 2007
	<i>L. acidophilus</i> + <i>B. bifidum</i>	2x10 ¹⁰ cfu x1/dì	Plummer 2008
Coadiuvante nella terapia per eradicazione <i>H.pylori</i>	<i>S. cerevisiae (boulardii)</i>	2x10 ¹⁰ cfu x1/dì	Sazawal 2006
	<i>L. rhamnosus</i> GG	6x10 ⁹ cfu x2/dì	Tong 2007
	<i>B. clausii</i>	2x10 ⁹ spore x3/dì	Tong 2007
	<i>S. cerevisiae (boulardii)</i>	1 g o 5x10 ⁹ cfu/dì	Tong 2007
Riduzione dei sintomi del malassorb. di lattosio	<i>L. casei</i> DN-114 001 in latte fermentato con <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	10 ¹⁰ cfu x2/dì	Sykora 2005
	Yogurth con <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	Yogurt	Montalto 2006
Riduzione dei sintomi della sindrome del colon irritabile	<i>B. infantis</i> 35624	10 ⁸ cfu x1/dì	Montalto 2006
	<i>L. rhamnosus</i> GG	6x10 ⁹ cfu x2/dì	Gawronska 2007
	VSL# 3 miscela 8 ceppi	4.5x10 ¹¹ cfux2/dì	Kim 2005
	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> LC705, <i>B. breve</i> Bb99 e <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. shermanii	10 ¹⁰ cfu x1/dì	Kajander 2005

	<i>B. animalis</i> DN-173 010 in latte ferm. con <i>L.bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	10 ¹⁰ cfu x2/dì	Guyonnet 2007
Remissione col. Ulcerosa	E. coli Nissle 1917	5x10 ¹⁰ x2/dì	Kruis 2004
Remissione pouchite	VSL# 3 miscela 8 ceppi	4.5x10 ¹¹ cfux2/dì	Gionchetti 2003
Prevenzione enterocolite necrotizzante	<i>B. infantis</i> , <i>S. thermophilus</i> <i>B. bifidum</i> <i>L. acidophilus</i> + <i>B. infantis</i>	0.35x10 ⁹ cfu per ogni ceppo x1/dì 10 ⁹ cfu per ogni ceppo x2/dì	Deshpande 2007 Deshpande 2007

L'ANZIANO

Le variazioni del microbiota associate all'invecchiamento sono ancora lontane dall'essere chiarite con certezza, ma sono certamente significative. Tali variazioni possono essere in realtà conseguenti al declino dello stato di salute generale, alla malnutrizione e alla maggiore necessità di farmaci, come antibiotici e farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), che si osserva frequentemente nel soggetto anziano (Dethlefsen L, 2008; Mäkivuokko H, 2010).

Per giunta sono state dimostrate differenze nella composizione del microbiota di soggetti anziani sani e di soggetti anziani ospedalizzati o istituzionalizzati (Bartosch S, 2004; Hopkins MJ, 2001). Questa situazione, infatti, indica ulteriormente come le condizioni di vita, lo stato di salute e di nutrizione e i farmaci abbiano un effetto significativo sulla composizione del microbiota.

Anche l'aumento dei tempi di transito, che correla con una ridotta massa cellulare batterica fecale (Stephen A M, 1987), e che si osserva spesso nei pazienti anziani ospedalizzati, può influenzare i cambiamenti del microbiota in questi individui, rispetto agli anziani sani.

Poichè il microbiota intestinale normale fornisce un importante meccanismo di difesa naturale contro l'invasione dei patogeni e impedisce la crescita eccessiva di microrganismi autoctoni opportunistici (resistenza alla colonizzazione), le alterazioni nella composizione del microbiota che si osservano nell'anziano possono determinare conseguenze negative, quali la maggiore incidenza di infezioni gastrointestinali che si osserva nelle persone anziane rispetto ai giovani (Lovat LB, 1996) e una diminuzione delle difese immunitarie. I cambiamenti immunologici legati all'invecchiamento comportano riduzioni dell'efficienza delle risposte mediate dalle cellule B e T (Smith JL, 1998); inoltre, l'aumento di anticorpi circolanti contro batteri intestinali commensali nelle persone anziane è stato associato a cambiamenti legati all'età, come la diminuzione della secrezione acida gastrica e l'aumento della permeabilità mucosale (Percival RS, 1996).

Negli anziani, rispetto alla popolazione giovane adulta, si manifesta inoltre una riduzione della diversità del microbiota (O'Toole PW, 2010), caratterizzata da una grande variabilità interindividuale, con numeri inferiori di Bifidobatteri e superiori in Enterobacteriaceae (Claesson MJ, 2011; Biagi E, 2010). Inoltre, i *Bacteroidetes* diventano più numerosi, mentre i *Firmicutes* risultano essere in numero inferiore (Woodmansey EJ, 2007).

Nell'anziano risultano diminuiti anche i livelli di *Clostridium* cluster XIVa e di *Faecalibacterium Prausnitzii*, i quali sono conosciuti come importanti produttori di butirrato (Mueller S, 2006; Rajilic-Stojanovic M, 2009).

Un recente studio (Biagi E, 2010) ha valutato, mediante "Human Intestinal Tract Chip" (HITChip) e PCR quantitativa dei 16S rRNA, il microbiota di soggetti centenari, di soggetti giovani e di anziani non centenari. I risultati dimostrano che *Bacteroidetes* e *Firmicutes* dominano il microbiota intestinale di soggetti centenari (rappresentando oltre il 93% dei batteri totali). Rispetto agli adulti e agli anziani non centenari, nei centenari sono stati osservati cambiamenti specifici nella relativa proporzione di sottogruppi di *Firmicutes*, con un diminuzione del contributo del genere *Clostridium* cluster XIVa (*Ruminococcus obeum* et rel., *Roseburia intestinalis* et rel., *E. ventriosum* et rel., *E. rectale* et rel., *E. hallii* et rel.), con un incremento in Bacilli, e un riarrangiamento del genere *Clostridium* cluster IV (*Papillibacter cinnamovorans* et rel., *E. F. Prausnitzii* et rel.) che, insieme *Clostridium* cluster XIVa, è uno dei principali batteri che producono butirrato, un acido grasso a catena corta, che rappresenta una fonte di energia per gli enterociti e è stato implicato nella protezione contro le malattie infiammatorie intestinali. Viceversa, altri batteri butirrato produttori quali *Anaerotruncus*

colihominis et rel. (Clostridium cluster IV), e Eubacterium limosum et rel. (Clostridium cluster XV) sono aumentati nei centenari. L'incremento di *E. limosum* è molto netto (circa 15 volte), e potrebbe indicare un gruppo di batteri caratteristici dei centenari. Infine, il microbiota intestinale dei centenari è maggiormente ricco in Proteobacteria, un gruppo contenente molti di quei batteri recentemente definiti come "patobionti". Questi sono considerati componenti minori e opportunisti dell'ecosistema intestinale umano che, in alcune circostanze, ad esempio in presenza di infiammazione, possono sfuggire al controllo e indurre patologia.

EFFICACIA DELL'USO DEI PROBIOTICI NELLA POPOLAZIONE ANZIANA

Gli studi ad oggi effettuati nella popolazione anziana per verificare l'attività dei probiotici sul microbiota in questa fascia di età, hanno valutato da un lato l'effetto sulla composizione del microbiota, dopo somministrazione, dall'altro hanno valutato l'efficacia sui sintomi delle principali patologie, anche iatrogene, che colpiscono l'anziano a livello gastrointestinale, quali **stipsi**, diarrea secondaria all'assunzione di antibiotici, in particolare legata alla presenza di *Clostridium difficile*.

Variazioni della composizione del microbiota

Tre importanti studi in doppio cieco contro placebo hanno valutato le variazioni della composizione del microbiota a seguito di assunzione di probiotici: lo studio di Lahtinen SJ (Lahtinen SJ, 2009) che ha considerato l'effetto di una bevanda di avena fermentata contenente 10^9 cfu mL^{-1} *Bifidobacterium longum* 46 (DSM 14583) e *B. longum* 2C (DSM 14579) somministrata quotidianamente per 6 mesi, lo studio di Ahmed M (Ahmed M, 2007) che ha considerato l'effetto di una bevanda costituita da latte scremato ricostituito contenente 3 dosi differenti [5×10^9 CFU/die, 1.0×10^9 CFU/die e 6.5×10^7 CFU/die] di *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) somministrata quotidianamente per 4 settimane e lo studio di Bartosch S (Bartosch S, 2004) che ha considerato l'effetto del *Bifidobacterium bifidum* e *B. lactis* in associazione a inulina.

Nella tabella 5 sono riportate le variazioni significative, riscontrate dagli autori, nella composizione del microbiota del gruppo trattato rispetto al gruppo placebo

Efficacia sui sintomi delle principali patologie, anche iatrogene, che colpiscono l'anziano

In un ampio studio controllato effettuato in 360 persone con più di 60 anni, l'effetto di un intervento di 3 settimane con un latte fermentato contenente il probiotico *L. casei* DN-114001 ha mostrato che l'incidenza di infezioni invernali non era diversa rispetto al gruppo di controllo, ma la durata di tutte le patologie era significativamente più bassa nel gruppo che aveva assunto il probiotico rispetto al gruppo di controllo (Turchet P, 2003).

Uno studio in doppio-cieco, che ha coinvolto 24 pazienti anziani sottoposti a nutrizione artificiale enterale, ha valutato gli effetti della somministrazione per 12 settimane di latte fermentato contenente *Lactobacillus johnsonii* LA1 (LC1). Il gruppo che aveva assunto il probiotico presentava significativamente meno giorni con infezioni alla fine della somministrazione (Fukushima Y, 2007).

Numerosi studi condotti sulla popolazione anziana hanno dimostrato che l'assunzione di probiotici determina una ridotta frequenza e / o durata di episodi di diarrea associata agli antibiotici (AAD), oltre a ridurre la gravità delle sintomi.

- Probiotici sono stati utilizzati in associazione agli antibiotici come terapia per le infezioni da *Clostridium difficile*, che causa più del 95% dei casi di colite pseudomembranosa (Gougoulas C, 2007).
- Nello studio di Hickson (Hickson M, 2007) sono stati valutati 135 pazienti ricoverati, con età media di 74 anni, prima e dopo 1 settimana di consumo di 100 g (97 ml) di una bevanda contenente *Lactobacillus casei*, *L. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* assunta due volte al giorno nel corso di un ciclo di antibiotici. Il gruppo placebo ha ricevuto un frullato sterile. I risultati hanno mostrato che 7 su 57 soggetti (12%) del gruppo che assumeva il probiotico ha sviluppato diarrea associata all'uso di antibiotici rispetto a 19 su 56 (34%) nel gruppo placebo ($p = 0,007$). La regressione logistica per il controllo di altri fattori ha dato un odds ratio pari a 0,25 (intervallo di confidenza 95% 0,07-0,85) per l'uso di probiotici. La riduzione del rischio assoluto è stata del 21,6% (dal 6,6% al 36,6%). Nessuno nel gruppo che ha assunto probiotico e 9/53 (17%) nel gruppo placebo hanno avuto diarrea da *C. difficile* ($P = 0,001$). La riduzione del rischio assoluto è stata del 17% (7% al 27%).

Un ulteriore studio sull'uso dei probiotici come coadiuvanti alla terapia antibiotica per prevenire i disturbi gastrointestinali è stato condotto da Beausoleil su una popolazione anziana di 89 uomini con età media di 72 anni (Beausoleil M, 2007). La preparazione assunta era un latte fermentato, contenente almeno 50×10^9 unità formanti colonia di *L. acidophilus* CL1285 e *L. casei*. Il manifestarsi di diarrea associata agli antibiotici si è verificato in 7 dei 44 pazienti (15,9%) nel gruppo che ha assunto lattobacilli e in 16 dei 45 pazienti (35,6%) nel gruppo placebo (OR 0,34, 95% CI 0,125-0,944, $p = 0,05$). La mediana della durata della degenza ospedaliera è stata otto giorni nel gruppo che ha assunto probiotico, rispetto a 10 giorni nel gruppo placebo ($p=0,09$). La prevenzione della CDAD è un risultato importante da considerare nella popolazione anziana, perché questa condizione è stata associata a un aumento di mortalità e morbilità (Miller MA, 2002).

Negli anziani, **la stitichezza** è una condizione comune, caratterizzato da una costellazione di sintomi definiti dai criteri detti di "Roma III" (Higgins PD, 2004). Una recente review del 2010 (Chmielewska A, 2010), che ha incluso 3 studi in doppio cieco contro placebo condotti da Koebnick (Koebnick C, 2003), Möllenbrink (Möllenbrink M, 1994), e da Yang (Yang YX, 2008), considerando 266 pazienti, per la maggior parte anziani, ha confermato l'efficacia del trattamento con *Bifidobacterium lactis* DN-173 010, *Lactobacillus casei* Shirota, e *Escherichia coli* Nissle 1917 sulla frequenza di defecazione e sulla consistenza delle feci.

Questo miglioramento è secondario alla riduzione del pH nel colon che i probiotici determinano grazie alla produzione di acidi grassi a catena corta (acido butirrico, acido propionico e acido lattico). Un pH più basso migliora la peristalsi nel colon e, successivamente, potrebbe diminuire il tempo di transito intestinale (Chmielewska A, 2010). Un interessante studio cross over effettuato in un gruppo di 36 donne ha riportato una riduzione del tempo di transito, dopo l'intervento per 10 giorni con latte fermentato contenente *Bifidobacterium animalis* DN-173, 010 (Marteau P, 2002), assunto 3 volte al giorno nella dose di 125 grammi.

Per quanto riguarda la popolazione anziana, una ricerca in doppio cieco contro placebo condotta da Ouwehand AC (Ouwehand AC, 2009) ha studiato gli effetti di una combinazione simbiotica di lattitolo e *Lactobacillus acidophilus* NCFM (dose totale giornaliera di 10 g lattitolo e 2×10^{10} cellule di batteri probiotici) assunto due volte al giorno per 2 settimane, in un gruppo di soggetti anziani; i risultati dello studio hanno dimostrato una maggiore frequenza di evacuazione nel gruppo che ha assunto il probiotico, così come livelli significativamente

maggiori di PGE2, oltre che cambiamenti nel periodo di assunzione dei livelli di IgA e spermidina, dimostrando così risultati positivi sulla funzione della mucosa intestinale.

Lo stesso gruppo di lavoro (Björklund M, 2012) ha recentemente valutato, in uno studio in doppio cieco contro placebo, l'efficacia della medesima associazione di *Lactobacillus acidophilus* NCFM con il lattitolo in un gruppo di 51 anziani che seguivano una terapia antinfiammatoria non steroidea (FANS o non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)). I risultati dello studio hanno dimostrato un aumento dei lattobacilli e bifidobatteri e anche un possibile effetto stabilizzante sui livelli di *B. coccoides-E.* e di *Clostridium* cluster XIVab.

Tabella n. 5

Disegno dello studio	Soggetti	Età	Probiotici	Risultati	Bibliografia
Studio randomizzato controllato contro placebo	n=33 placebo; n=33 probiotico	83±7 anni 84±8 anni	Bevanda all'avena fermentata con <i>Bifidobacterium longum</i> and <i>B. longum</i>	↑ <i>B. catenulatum</i> ↑ <i>B. bifidum</i> ↑ <i>B. breve</i>	Lahtinen SJ, 2009
Studio randomizzato, in doppio cieco, controllato contro placebo	n= 20 placebo; n= 20 bassa dose di probiotici; n=20 media dose di probiotici; n=20 alta dose di probiotici	> 60 anni	Latte scremato ricostituito contenente <i>Bifidobacterium lactis</i>	↑ bifidobatteri ↑ lactobacilli ↑ enterococchi ↓ enterobatteri	Ahmed M, 2007
Studio randomizzato, in doppio cieco, controllato contro placebo	n= 9 placebo n=9 simbiotici (miscela di probiotici e prebiotici)	Media 71 anni Media 73 anni	<i>Bifidobacterium bifidum</i> e <i>B. lactis</i> (probiotici) insieme ad inulina prebiotica	↑bifidobacteria ↑ lactobacilli ↑ <i>B. bifidum</i>	Bartosch S, 2004

Probiotici ed epigenetica

Il microbiota intestinale può essere influenzato da fattori ambientali, tra cui la nutrizione, che possono determinare conseguenze a breve, medio e lungo termine sull'individuo e sul suo stato di salute.

E' noto che una colonizzazione ritardata dell'intestino da parte di batteri commensali o alterazioni dell'ecosistema del microbiota intestinale, possono predisporre all'insorgenza di disordini cronici immuno-mediati come allergie e malattie autoimmuni (Canani RB, 2011; Licciardi PV, 2010), ad esempio è stato dimostrato che bambini affetti da patologie allergiche hanno a livello intestinale una popolazione più esigua di specie benefiche come i Bifidobatteri e una popolazione più rappresentativa di specie patogene come Clostridi e Stafilococchi rispetto ai bambini non allergici (Licciardi PV, 2010).

Dalle evidenze che l'introduzione di una singola specie batterica a livello del microbiota intestinale può modificare alcune dinamiche sfavorevoli (Canani RB, 2011), il ruolo dei probiotici nella prevenzione e nel trattamento di patologie immuno-mediate viene sempre più studiato.

Probiotico è definito un microorganismo che, quando presente in adeguate concentrazioni, apporta benefici in termini di salute all'organismo (Canani RB, 2011; Brown C, 2004); i probiotici possono ripristinare l'equilibrio del microbiota intestinale.

I meccanismi conosciuti attraverso cui si esplicita l'azione benefica dei probiotici sono modificazioni dell'ecosistema microbico intestinale, mantenimento delle proprietà della barriera del lume intestinale e modulazione della risposta immune a livello mucosale e sistemico (Licciardi PV, 2010; Oelschlaeger TA, 2010).

Per spiegare l'ampia varietà di effetti osservati, è stato ipotizzato che le funzioni biologiche dei probiotici siano il risultato di eventi epigenetici (Canani RB, 2011).

L'epigenetica studia gli effetti che l'ambiente può avere nei confronti dei geni attraverso modifiche non della loro sequenza, ma della loro espressione.

I meccanismi epigenetici, in termini di variazioni interindividuali del pattern di metilazione del DNA e di modificazioni istoniche (acetilazioni, fosforilazioni, metilazioni) responsabili di cambiamenti strutturali della cromatina, influenzano il modo in cui i geni vengono espressi e forniscono una possibile spiegazione di come fattori ambientali e nutrizionali possano modificare il rischio individuale di sviluppare alcune patologie.

Considerando che la patogenesi di neoplasie e patologie infiammatorie croniche frequentemente dipende da una trascrizione genica aberrante (Licciardi PV, 2010), un esempio dell'influenza positiva dei probiotici sull'espressione genica è fornito dalla riduzione della sintesi di alcune interleuchine infiammatorie legate all'insorgenza di malattie infiammatorie intestinali.

Un recente lavoro del 2012 (Ghadimi D, 2012) condotto su modelli in vitro di mucosa intestinale, ha dimostrato che, a determinate concentrazioni, *Bifidobacterium breve* e *Lactobacillus rhamnosus* GG (principali probiotici commensali) sono in grado di antagonizzare l'attivazione trascrizionale di citochine proinfiammatorie (IL-17 e IL-23) attraverso l'inibizione dello stato di acetilazione degli istoni promosso da stimoli infiammatori (nello studio in oggetto il LPS) e attraverso la riduzione dell'attività del fattore di trascrizione nucleare NF-κB (Ghadimi D, 2012).

Altri studi condotti al fine di chiarire il possibile ruolo epigenetico dei probiotici si sono focalizzati sugli acidi grassi a corta catena (SCFAs) ed in particolare sul butirrato (Canani RB, 2011; Licciardi PV, 2010; Canani RB, 2012)

I batteri probiotici a livello del colon sono responsabili della fermentazione di composti alimentari, in particolare fibre, in seguito alla quale si ha produzione di acidi grassi a corta catena (SCFAs) tra cui acido acetico, acido propionico e acido butirrico (Licciardi PV, 2010; Canani RB, 2012).

Il butirrato è il composto che più di altri ha molteplici effetti benefici sull'intestino e sui tessuti periferici; localmente il butirrato migliora l'integrità della barriera epiteliale intestinale modulando l'espressione di alcune proteine giunzionali come la cingulina e l'occludina. Localmente e sistemicamente il butirrato può ridurre lo stato infiammatorio e regolare la risposta immunitaria (Licciardi PV, 2010).

Per tutte queste proprietà e per il fatto che i livelli di acidi grassi a corta catena sono ridotti nelle malattie infiammatorie intestinali come risultato di un microbiota alterato (Licciardi PV, 2010), il butirrato potrebbe essere considerato una strategia terapeutica e preventiva nei confronti di differenti disordini cronici quali malattie infiammatorie intestinali, neoplasie, sindrome metabolica, patologie cardiovascolari, patologie croniche immuno-mediate e patologie ereditarie (Canani RB, 2011; Licciardi PV, 2010; Canani RB, 2012).

Alcuni outcome positivi del butirrato possono essere spiegati con il modello epigenetico in quanto il butirrato è un determinante epigenetico a tutti gli effetti (Canani RB, 2011; Licciardi PV, 2010; Canani RB, 2012); esso appartiene alla classe degli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) che, favorendo lo stato di acetilazione degli istoni, permettono il mantenimento di una conformazione della cromatina tale da promuovere l'attivazione della trascrizione genica (Canani RB, 2011; Licciardi PV, 2010; Canani RB, 2012).

Le maggiori evidenze riguardano i meccanismi epigenetici antineoplastici e antinfiammatori del butirrato (Canani RB, 2012; Kumar M, 2013).

Il butirrato può riattivare la trascrizione di geni epigeneticamente silenziati nelle cellule tumorali come ad esempio il gene per la proteina inibitoria del ciclo cellulare p21 e il gene per la proteina proapoptotica BAK (Canani RB, 2012; Kumar M, 2013); in questo modo può essere promossa l'apoptosi cellulare, può essere arrestato il ciclo cellulare e possono essere inibiti angiogenesi e processi metastatici (Canani RB, 2012; Kumar M, 2013).

Un recente lavoro del 2013 ha ipotizzato il possibile effetto preventivo e terapeutico del butirrato nei confronti del carcinoma del colon (Kumar M, 2013).

Anche lo stato infiammatorio può essere modulato dalla presenza di butirrato. I principali meccanismi attraverso cui il butirrato esercita le sue peculiarità antinfiammatorie, sono la soppressione dell'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B (Canani RB, 2012; Place RF, 2005; Segain JP, 2000; Hamer HM, 2008) e l'inibizione della produzione di interferon γ coinvolti nella sintesi di citochine proinfiammatorie, nell'attivazione linfocitaria e nella regolazione della risposta immunitaria (Canani RB, 2012; Place RF, 2005; Segain JP, 2000; Hamer HM, 2008).

A questo proposito è plausibile considerare l'utilizzo terapeutico del butirrato nelle malattie infiammatorie intestinali: studi condotti su pazienti affetti da colite ulcerosa hanno dimostrato un miglioramento dello stato infiammatorio e della sintomatologia in seguito sia alla

somministrazione di butirrato sia alla stimolazione della produzione luminale di butirrato grazie ad una dieta basata sulle fibre (Canani RB, 2012; Hallert C, 2003; Vernia P, 2003).

Effetti epigenetici del butirrato su obesità e su patologie cardiovascolari, sul sistema immunitario, su disordini ereditari, sulle cellule staminali e sulla neuroprotezione sono ancora in fase di valutazione (Canani RB, 2012).

La modulazione dell'espressione genica determinata dai probiotici attraverso la produzione di SCFAs può essere considerata la chiave per la comprensione degli effetti benefici dei probiotici sia sull'intestino che sullo stato di salute generale dell'individuo (Canani RB, 2011). Sono però necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi molecolari coinvolti.

Nonostante le numerose evidenze sul ruolo preventivo e terapeutico dei probiotici nei disordini cronici soprattutto di natura immuno-mediata, attualmente non sono ancora state stilate raccomandazioni generali per il loro uso nella pratica clinica.

Quello che rimane imprescindibile è la raccomandazione e la promozione di corretti stili di vita, come ad esempio una sana alimentazione e l'allattamento al seno, fin dalle prime epoche di vita poiché stimoli ambientali positivi sono fondamentali per il mantenimento dell'equilibrio del microbiota intestinale e quindi per la salute dell'intero organismo.

Conclusioni e Consensus

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 etc) o per esclusione competitiva.
- Alcuni probiotici contribuiscono alla prevenzione della diarrea infettiva nei bambini.
- Alcuni probiotici sono associati ad un globale miglioramento dei disordini funzionali intestinali (gonfiore, fastidio addominale etc) tipici della sindrome dell'intestino irritabile.
- Alcuni probiotici riducono la frequenza e la severità dell'enterocolite necrotizzante (NEC) nei prematuri.
- E' 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.

Bibliografia

- Abrahamsson TR, Jakobsson T, et al. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:184-191.
- Adams, M.R. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 1999; 68: 171-78.
- Adams, M.R., Marteau, P. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Intern J Food Microbiol* 1995; 27: 263-64.
- AFSSA: Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte, 2005.
- Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 1993; 75: 95-107
- Ahmed M, Prasad J, Gill H, Stevenson L, Gopal P. Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. *J Nutr Health Aging* 2007;11:26-31.
- AlFaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 3. Art. No.: CD005496
- Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 11. Art. No.: CD003048.
- Are A, Aronsson L, Wang S, Greicius G, Lee YK, Gustafsson JA, 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.
- Arvola T, Laiho K, et al. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* 1999;104,64.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307:1915-20.
- 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. *The EFSA J* 2007;587:1-16.
- Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:3575-81.
- Beausoleil M, Fortier N, Guénette S. 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 of Gastroenterol* 2007;21:732-6.
- Beck MA. Antioxidants and viral infections: host immune response and viral pathogenicity. *J Am Coll Nutr* 2001; 20 (5 Suppl):384S-388S.
- Belletti N, Gatti M, Bottari B et al. Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *J Food Prot* 2009; 72:2162-2169
- Biagi E, Nylund L, Candela M et al. Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *PLoS One* 2010;5: e10667.
- Björklund M, Ouwehand A C, Forssten S D et al. Gut microbiota of healthy elderly NSAID users is selectively modified with the administration of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol. *Age (Dordr)* 2012;34: 987-999.

Bjorksten B, Naaber P, et al. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999;29:342–346.

Boyle RJ. Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review. *Clinical & Experimental Allergy*, 2009 (39) 1117–1127.

Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutrition in Clinical Care* 2004 Apr-Jun; 7(2):56-68.

Caballero-Franco 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-G322

Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Bedogni G, Brambilla P, Cianfrani S, Nobili V, Pietrobelli A, Agostoni C. Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. *Nutrition Research Reviews* 2011 Dec; 24(2):198-205.

Canani RB, Costanzo MD, Leone L. The epigenetics effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. *Clinical Epigenetics* 2012; Feb 27; 4(1):4.

Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 2009; 15:1546-58.

Castagliuolo I, Riegler MF, et al. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* 1999;67:302–307.

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L et al. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 1998b; 84:759–768

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot* 1998; 61:1636–1643

Chmielewska A, Szajewska H. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. *World J Gastroenterol*. 2010 Jan;16(1):69-75

Claesson M J Cusack S, O'Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108 (Suppl 1) 2011;4586–4591.

Claud EC, Walker WA. Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB J* 2001;15:1398–140.

Coccorullo P, Strisciuglio C, Martnelli M, Miele E, Greco L, Staiano A. *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) in Infants with Functional Chronic Constipation: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *J Pediatr* 2010 Jun 12.

Costa-Ribeiro H, Ribeiro TCM, et al. Limitations of probiotic therapy in acute, severe dehydrating diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:112-115.

Cremonini F, Di Caro S, et al. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1461-1467.

Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN* 1997,21(6):357-65.

Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, Rossi B, Rampal P. *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.

D'Aimmo MR, Modesto M, Biavati B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int J Food Microbiol* 2007; 115:35– 42

D'Souza AL, Rajkumar C, et al. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis. *BMJ* 2002;324:13.

Davidson GP, Butler RN. Probiotics in pediatric gastrointestinal disorders. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:477–481.

de la Cruz F, Davies J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 2000; 8:128–133.

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;24:6670–6674.

De Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, Harder T, Noah C, Laue C, Ott S, Hampe J, Schreiber S, Heller K, Schrezenmeir J. 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.

Deshpande G. Updated Meta-analysis of Probiotics for Preventing Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. *Pediatrics* 2010;125:921–930.

Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008; 6:2383–2400.

Donohue DC, Salminen SJ. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1996;5: 25±28.

Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124:1265- 76.

EFSA. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 2012; 10: 2740.

EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 2007; 587:1–16.

EFSA. Maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 2011; 9:1–82.

European Commission, Health and consumer protection directorate-general. On a generic approach to the safety assessment of microorganisms used in feed/food and feed/food production - A working paper open for comment; 2003. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf.

European Food Safety Authority. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European 13-14 December 2004, Brussels.

Falk PE, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JL. Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need To Know from Gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, 62, 1157–7015.

FAO/WHO Expert Consultation. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (2001). www.fao.org;

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2002). www.fao.org

Foolad N, Brezinski EA, Chase EP, Armstrong AW. Effect of nutrient supplementation on atopic dermatitis in children: a systematic review of probiotics, prebiotics, formula, and fatty acids. *JAMA Dermatol* 2013 Mar;149(3):350-5.

Fukushima Y. Improvement of nutritional status and incidence of infection in hospitalised, enterally fed elderly by feeding of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus johnsonii* la1 (ncc533). *Brit J Nutr* 2007;98:969–77.

Gasser, F. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull Inst Pasteur* 1994; 92: 45–67.

Ghadimi D, Helwig U, Schrezenmeir J, Heller KJ, de Vrese M. Epigenetic imprinting by commensal probiotics inhibits IL-23/IL-17 axis in an vitro model of the intestinal mucosal immune system. *Journal of Leukocyte Biology* 2012 Oct; 92(4):895-911.

Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, et al: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006 Jun 2;312(5778):1355-9.

Giovannini M, Agostoni C, Riva E, Salvini F, Ruscitto A 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 Research* 2007; 62:215-220.

Goldenberg JZ, Ma SSY, Saxton JD, Martzen MR, Vandvik PO, Thorlund K, Guyatt GH, Johnston BC Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 May 31;5:CD006095

Goodwin K, Viboud C, Simonsen L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine* 2006; 24:1159- 1169.

Gougoulias C, Tuohy KM, Gibson GR. Dietary based gut flora modulation against *Clostridium difficile* onset. *Food Science and Technology Bulletin Functional Foods* 2007;4:31-41.

Guandalini S, Pensabene M, 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.

Guandalini S: Probiotics for children: use in diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:244-248.

Guarino A, Lo Vecchio A, Berni Canani R. Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:18-23.

Hallert C, Bjorck I, Nyman M, Pousette A, Granno C, Svensson H. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflammatory Bowel Diseases* 2003 Mar; 9(2):116-21.

Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2008 Jan 15; 27(2):104-19.

Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections (Review) *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 9. Art. No.: CD006895

Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Korpela R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day caer centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 2001;322(7298):1327.

Hickson M, D'souza A, Muthu N. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007;335:80.

Higgins PD, Johanson JF. Epidemiology of constipation in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:750-9.

Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292:1115-8.

Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001;48:198-205.

Huys G, D'Haene K, Cnockaert M et al. Intra-and Interlaboratory Performances of Two Commercial Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Bifidobacteria and Nonenterococcal Lactic Acid Bacteria. *Antimicrob Agent Chemother* 2010; 54: 2567-2574.

Iliev ID, et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTCGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice. *Scand J Immunol* 2008; 67:370-76.

Iliev ID, et al. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell Microbiol* 2005;7:403-14.

International Standard organization (ISO). Milk and milk products — Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB)- ISO Standard 10932:2010

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; 53:411-418.

Jansen WT, van der Bruggen JT, Verhoef J, Fluit AC. Bacterial resistance: a sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe. *Drug Resist Updat* 2006,9,123-33.

Johannsen H, Prescott SL. Practical prebiotics, probiotics and synbiotics for allergists: how useful are they? *Clin Exp Allergy* 2009;39:1801-14.

Johnston BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2011 Nov 9;(11):CD004827.

Jones BV, Marchesi JR. Accessing the mobile metagenome of the human gut microbiota. *Mol Biosyst* 2007;3:749-58.

Jones BV, Sun F, Marchesi JR. Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome. *BMC Genomics*. 2010 Jan 19;11:46.

Kaila M, Isolauri E, et al. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-145.

Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002; 15:1-9.

Kazuyoshi, Takeda and Ko Okumura. Effects of a Fermented Milk Drink Containig *Lacobacillus casei* Strain Shirota on the Human NK-Cell Activity. *The Journal of Nutrition* 2007 Jul; 137:791S-793S.

Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004; 5:104-12.

Koebnick C, Wagner I, Leitzmann P, Stern U, Zunft HJ. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastroenterol* 2003;17:655-659.

Kukkonen K, Savilahti E, et al. Probiotics and prebiotic galactooligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:192-198.

Kumar M, Nagpal R, Verma V, Kumar A, Kaur N, Hemalatha R, Gautam SK, Singh B. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutrition Reviews* 2013 Jan; 71(1):23-34.

Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007 Aug31;14(4):169-81.

Lahtinen SJ, Tammela L, Korpela J et al. Probiotics modulate the *Bifidobacterium* microbiota of elderly nursing home residents. *Age (Dordr)* 2009; 31:59-66.

Lanning DK, Rhee KJ, Knight KL. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol* 2005,26(8):419-25.

- Lee Y-K, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6: 241±245.
- Levander OA. Nutrition and newly emerging viral diseases: an overview. *J Nutr* 1997; 127(5 Suppl):948S-950S.
- Lewis SJ, Potts LF, et al. The lack of therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-related diarrhoea in elderly patients. *J Infect* 1998;36:171-174.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008;320,1647-51.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837-48.
- Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26:5-11.
- Leyer GJ, Li S, Mubasher ME, Reifer C, Ouwehand AC. Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. *Pediatrics* 2009 Aug;124(2):e172-9.
- Licciardi PV, Wong SS, Tanq ML, Karagiannis TC. Epigenome targeting by probiotic metabolites. *Gut Pathogens* 2010 Dec 21;2(1):24.
- Lin JS, Chiu YH, Lin NT, Chu CH, Huang KC, Liao KW, Peng KC. Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: a double-blind, randomized, controlled study. *Vaccine* 2009;27,1073-1079.
- Lovat L B. Age related changes in gut physiology and nutritional status. *Gut* 1996;38:306-309.
- Lu L, Walker WA. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1124S-1130S.
- Mack DR, Michail 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-G950.
- Mackay, A.D., Taylor, M.B., Kibbler, C.C. et al. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 1999;5: 290±292.
- Mäkivuokko H, Tiihonen K, Tynkkynen S, Paulin L, Rautonen N. The effect of age and non-steroidal antiinflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *Br J Nutr* 2010;103:227-234.
- Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17:204-210.
- Marseglia GL, Tosca M, Cirillo I, Licari A, Leone M, Marseglia A, Castellazzi AM, Ciprandi G. Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. *Ther clin Risk Manag* 2007; 3, 13-17.
- Marteau P. *Bifidobacterium animalis* strain dn-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol ther* 2002;16:587-93.
- Mastretta E, Longo P, et al. Effect of *Lactobacillus GG* and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:527-531.
- Mathur S, Singh R . Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int J Food Microbiol* 2005; 105:281-295
- McFarland LV. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 15 (2009) 274-280.
- Meneghin F, Dilillo D, Mantegazza C, Galli E, Stucchi S, Torcoletti M, Ramponi G, Colella G, Penagini F, and Zuccotti GV. Live Probiotic Culture Supplementation in the Treatment of Infantile Colic: A Review of Literature. *J Prob Health* 2013, 1:1

Meneghin F, Fabiano V, Mameli C and Zuccotti GV. Probiotics and Atopic Dermatitis in Children. *Pharmaceuticals* 2012, 5, 727-744

Miller MA, Hyland M, Ofner-Agostini M, Gourdeau M, Ishak M, for the Canadian Hospital Epidemiology Committee Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:137-40.

Ministero della Salute. Linee Guida Nutrizione/Probiotici (2005).

Möllenbrink M, Bruckschen E. Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor). *Med Klin (Munich)* 1994;89:587-593.

Morimoto K, Takeshita T, Nanno M, Tokudome S, Nakayama K. Modulation of natural cell activity by supplementation of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in habitual smokers. *Preventive Medicine* 40 (2005): 589 - 594.

Mueller S, Saunier K, Hanisch C et al. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:1027-1033.

NASPGHAN Nutrition Report Committee; Michail S, Sylvester F, et al: Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children. *J Ped Gastroenterol Nutr* 2006;43:550-557.

Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 2000; 289:1560-3.

Niers LE et al. Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic disease: immunomodulation of neonatal dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 149: 344-52 (2007).

Nissle S. Ueber die Grundlagen einer neuen ursaechlichen Bekaempfung der pathologischen Darmflora. *Deutsch Med Woch* 1916; 42: 1181-4.

Nixon AF, Cunningham SJ, Cohen HW, Crain EF. The effect of *Lactobacillus GG* on acute diarrheal illness in the pediatric emergency department. *Pediatr Emerg Care* 2012 Oct;28(10):1048-51.

O'Toole PW, Claesson MJ. Gut microbiota: changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal* 2010;20:281-91.

Oberhelman R, Gilman RH, et al. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus GG* to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 1999;134:15-20.

Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions-A review. *Int J Med Microbiol* 2010 Jan; 300 (1):57-62.

Ouwehand AC, Tiihonen K, Saarinen M, Putaal H, Rautonen N. Influence of a combination of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and lactitol on healthy elderly: intestinal and immune parameters. *Brit J Nutr* 2009;3:367-75.

Percival R S, Marsh P D and Challacombe S J. Serum antibodies to commensal oral and gut bacteria vary with age. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;15:34-42.

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.

Petrof EO, Claud EC, Sun J, Abramova T, Guo Y, Waypa TS, et al. Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NFkappaB pathways and inhibits proteasome function. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15:1537.

Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, et al. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 2004; 127:1474-87.

Place RF, Noonan EJ, Giardina C. HDAC inhibition prevents NF- kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha. *Biochemical Pharmacology* 2005 Aug 1; 70(3):394-406.

Pregliasco F, Anselmi G, Fonte L, Giussani F, Schieppati S, Soletti L. A new chance of preventing winter diseases by the administration of synbiotic formulations. *J Clin Gastroenterol* 2008,42 Suppl 3 Pt 2:S224-33.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010,4;464(7285):59-65.

Rajilic-Stojanovic M, Heilig HGJ, Molenaar D et al. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of the universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* 2009;11:1736-1751.

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.

Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H et al. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1160-1161

Resta SC. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. *J Physiol* 2008;587(Pt17):4169-74.

Rizzardini G, Eskesen E, Calder PC, Capetti A, Jespersen L, Clerici M. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12[®] and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. casei 431[®] in an influenza vaccination model; a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *British J Nut* 2012;107:876-884.

Ruiz PA, Hoffmann M, Szcesny S, Blaut M, Haller D. 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.

Saarela M, Mogensen G, Fondén R et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 2000; 84: 197-215.

Salazar-Lindo E, Miranda-Langschwager P, 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.

Salminen S, von Wright, A., Morelli, L. et al. Demonstration of safety of probiotics—a review. *Int J Food Microbiol* 1998;.44: 93-106.

Salminen S, von Wright A, Laine M. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. *Biosci Microbiol* 1996;15: 61±67.

Santos JI. Nutrition, infection, and immunocompetence. *Infect Dis Clin North Am* 1994, 8,243-267.

Santos S, Farnworth E, Jones PJH. Probiotics and their potential health claim. *Nutr Rev* 2006; 64:265.

Sarker SA, Sultana S, 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;221-228.

Saxelin M, Chuang, NH, Chassy, B et al. *Lactobacilli* and bacteremia in Southern Finland, 1989-1992. *Clin Infect Dis* 1996a;22: 564-566.

Saxelin M, Rautelin H, Salminen S et al. Safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Inf Dis Clin Pract* 1996b; 5: 331-335.

Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000 Sep; 47(3):397-403.

Smith J L. Foodborne illnesses in the elderly. *J Food Prot* 1998;61:1229-1239.

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* 115,1260-67 (2005).

Stephen A M, Wiggins S, Cummings J H. Effect of changing transit time on colonic microbial metabolism in man. *Gut* 1987 ;28:601-609.

Szajewska H, Kotowska M, et al. Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of diarrhea in infants. *J Pediatr* 2001;138:361-365.

Szajewska H, Ruszczynski M et al. Probiotics in the prevention of antibiotic associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2006;149:367-372.

Szajewska H, Wanke M, Patro B. Meta-analysis: the effects of Lactobacillus rhamnosus GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 1079–1087

Szymanski H, Pejcz J, et al. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosustrains – a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Heczko Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:247–253.

Takeda K, Suzuki T, Shimada SI, Shida K, Nanno M, Okumura K. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by Lactobacillus casei Shirota. *Clinical and Experimental Immunology* 2006;146(1):109-115.

Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, 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.

Taylor AL, Dunstan JA, et al. 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;119:184-191.

Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication. Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 2010;1:1-16

Tien MT et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella* infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2006;176:1228-37.

Tsuji M, Suzuki K, Kinoshita K, Fagarasan S. Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. *Semin Immunol* 2008;20(1):59-66.

Turchet P, Laurenzan M, Auboiron S, Antoine JM. Effect of fermented milk containing the probiotic lactobacillus casei dn-114001 on winter infections in freelifing elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J Nutr Health Aging* 2003;7:75–7.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009 Jan 22;457(7228):480-4

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.

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.

- Van Niel CW, Feudtner C, et al. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002;109:678-684.
- Vernia P, Annese V, Bresci G, d'Albasio G, D'Incà R, Giaccari S, Ingrosso M, Mansi C, Riegler G, Valpiani D, Caprilli R, Gruppo Italiano per lo Studio del Colon e del Retto. Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial. *Eur J of Clin Invest* 2003 Mar; 33(3):244-8.
- Voltan S, Martines D, Elli M, Brun P, Longo S, Porzionato A, et al. *Lactobacillus crispatus* M247- derived H₂O₂ acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activatedreceptor-gamma in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 2008; 135:1216-27.
- Vouloumanou EK, ma kris GC, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. *Int J Antimicrob Agents*. 2009,34(3):197.e1-10.
- Watanabe S, Narisawa Y, et al. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:587-591.
- Wessels S, Axelsson L, Hansen E B, De Vuyst L et al. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci Technol* 2004; 15:498-505.
- Woodmansey EJ. Intestinal bacteria ageing. *Journal of Applied Microbiology* 2007;102:1178-86.
- Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 2007; 132:562-75.
- Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:50959-65.
- Yang YX, He M, Hu G, et al. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173010 on Chinese constipated women. *World J Gastroenterol* 2008;14:6237-6243.
- Yao TC, Chang CJ, Hsu YH, et al. Probiotics for allergic diseases: Realities and myths. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21(6): 900-19.
- Zajewska H, Setty M, et al. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:454-475.
- Zuccotti GV, Meneghin F, Raimondi C, Dilillo D, Agostoni C, Riva E, Giovannini M. Probiotics in clinical practice: an overview. *J Int Med Res* 2008; 36 Suppl 1: 1A-53A

Allegato

Modulazione da parte dei Probiotici dei sistemi di segnalazione nelle cellule epiteliali intestinali (CEI) e nei macrofagi (dalla ref. 24)				
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	NFκB	Aumenta esportazione RelA via PPARγ	Kelly, et al. 2004
<i>Bacteroides vulgatus</i>	CEI	NFκB	> fosforilazione IκBα	Haller, et al. 2002
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	Macrofagi	NFκB	< fosforilazione IκBα; incrementa SOCS	Okada, et al. 2009
<i>Bifidobacterium bifidum</i> B536	Macrofagi	NFκB	< legame LPS CD14	Menard, et al. 2004
<i>Bifidobacterium breve</i> BbC50	Macrofagi	NFκB	< legame LPS CD14	Menard, et al. 2004
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	CEI	NFκB	Attiva RelA	Ruiz, et al. 2005
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	CEI	MAPK	> fosforilazione p38	Ruiz, et al. 2005
<i>Bifidobacterium longum</i>	CEI	NFκB	< translocazione p65	Bai, et al. 2004 Bai, et al. 2006
<i>Enterococcus faecalis</i> EC1/EC3/EC15/EC16	CEI	PPARγ	Induce fosforilazione PPARγ1	Are, et al. 2008
<i>Escherichia coli</i> M17	Macrofagi	NFκB	Inibisce legame nucleare p65	Fitzpatrick, et al. 2008
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	CEI	NFκB	Inibisce attivazione NFκB	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	NFκB	< fosforilazione IκBα	Resta-Lenert, et al. 2006
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	CEI	NFκB	< translocazione p65	Bai, et al. 2004
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	CEI	NFκB	Previene degradaz. IκBα	Tien, et al. 2005
<i>Lactobacillus casei</i>	CEI	PPARγ	> PPARγ mRNA	Eun, et al. 2007
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Macrofagi	NFκB	Inibisce fosforil. IκBα	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	NFκB	Attivazione NFκB	Matsuguchi, et al. 2003
<i>Lactobacillus crispatus</i> M247	CEI	PPARγ	> attività transcriptzionale	Voltan, et al. 2008
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Macrofagi	NFκB	attivazione NFκB	Klebanoff, et al. 1999
<i>Lactobacillus fermentum</i> DSMZ 20052	CEI	NFκB	Blocca attivazione NFκB	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	NFκB	Attivazione NFκB	Matsuguchi, et al. 2003
<i>Lactobacillus fermentum</i> YIT 0159	Macrofagi	MAPK	Attivazione JNK	Matsuguchi, et al. 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CEI	NFκB	Inibisce proteosoma	Petrof, et al. 2009
<i>Lactobacillus plantarum</i> K8	Macrofagi	NFκB	Inibisce degradaz. IκBα	Kim, et al. 2008 Kim, et al. 2008
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Macrofagi	MAPK	< p38, JNK,	Kim, et al. 2008;63 Kim, et
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CEI	NFκB	Previene degradaz. IκBα	Ma, et al 2004
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475	Macrofagi	apoptosi	Sopprime Bcl-2 e Bcl-x _L	Iyer, et al. 2008
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 6475	Macrofagi	NFκB	< ubiquitizz. IκBα	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, <i>heat shock</i> 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	NFκB	Previene ubiquitizzazione e degrad. IκBα	Kumar, 2007 Lin, et al. 2009
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	CEI	MAPK	Up-regolazione di geni-f MAPK relati	Di Caro, 2005; Lin, 2008
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	CEI	apoptosi	Attiva Akt/PI3K	Yan, 2002 Yan, 2007
<i>Lactobacillus</i>	Macrofagi	NFκB	Induce attività	Miettinen, et al.

<i>rhamnosus</i> GG ATCC 53103			NFκB	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>Ruminococcus gnavus</i> FRE1	Macrofagi	NFκB	< 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	NFκB	Previene degradaz. IκBα	Sougioultzis 2006
<i>Salmonella typhimurium</i> PhoP	CEI	NFκB	Inibisce ubiquitizz. IκBα	Neish. 200
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	CEI	MAPK	Attivazione di ERK1/2 e p38	Resta-Lenert 2006
<i>Streptococcus thermophilus</i> St065	Macrofagi	NFκB	< legame di LPS a CD14	Menard, 2004

Abbreviazioni: **ERK**, extracellular signal-regulated kinases; **hsp**, heat shock protein; **CEI** cellule epiteliali , intestinali; **IκBα**, inhibitor NFκB; **JNK**, c-Jun N-terminal kinase; **LPS**, lipopolisaccaridi; **MAPK**, mitogen-activated protein kinase; **NFκB**, nuclear factor-kappaB; **PPARγ**, peroxisome proliferator activated receptor-gamma; **SOCS**, suppressor of cytokine signaling; **STAT**, signal transducer and activator of transcription.