



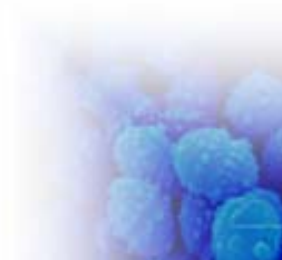
# "Probiotici per il benessere intestinale e genitale"

**Maria Luisa Callegari**

Pescara, 19 Ottobre 2007



Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore



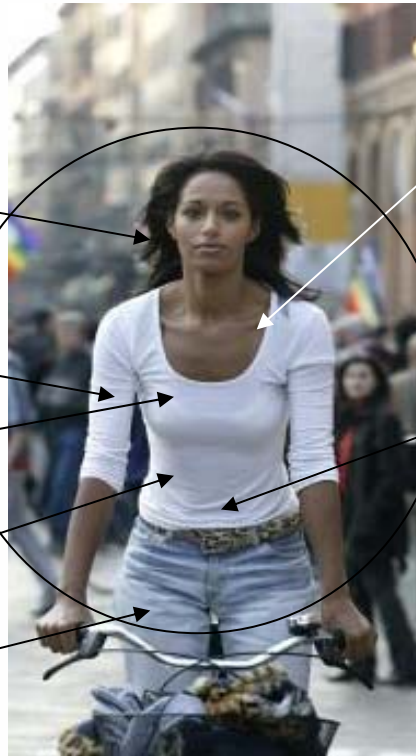
# In quali casi si sono ottenuti risultati dall'uso di probiotici?

Carie  
dentali

Dermatite  
atopica  
Asma

IBD

Infezioni  
vaginali



Infezioni  
respiratorie

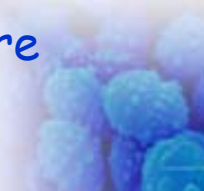
Infezioni  
intestinali

Parametri di crescita in  
bambini denutriti

Maggior benessere



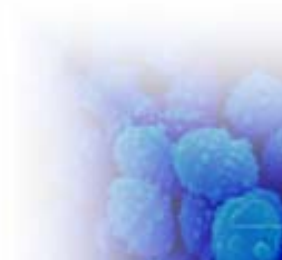
Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore

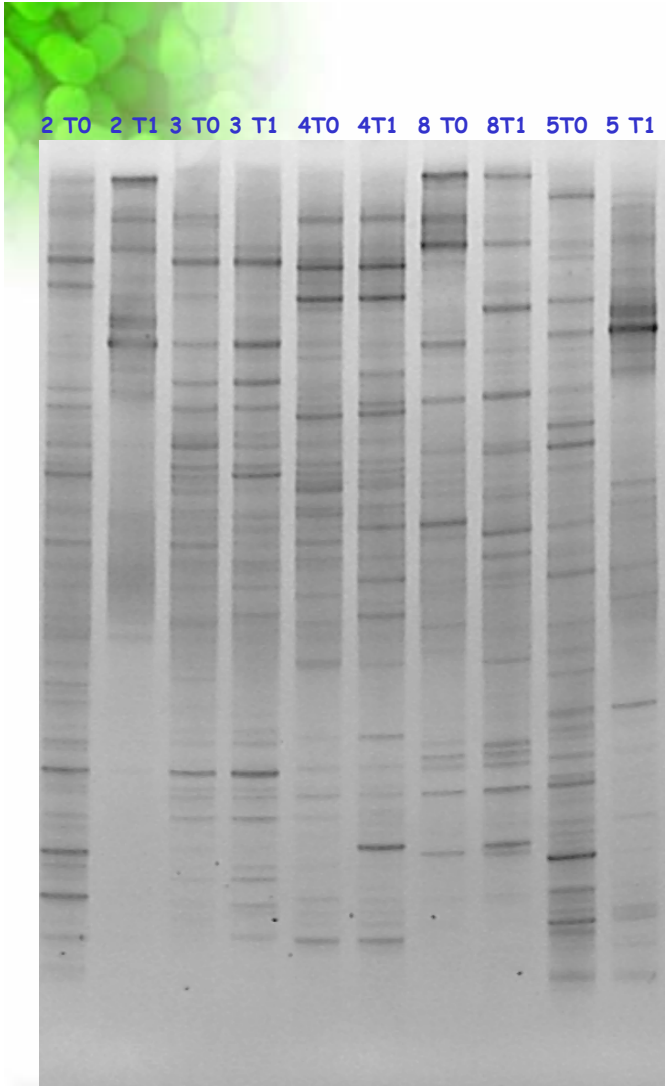




## L'ecosistema intestinale

- Composto da un numero rilevante di generi e specie batteriche (stime parlano di 1000 specie presenti)
- Questa ricchezza è data dalle diverse condizioni che i microrganismi trovano nel tratto GI
- L'abbondanza di nutrienti presenti sostiene la crescita batterica



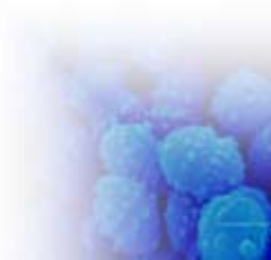


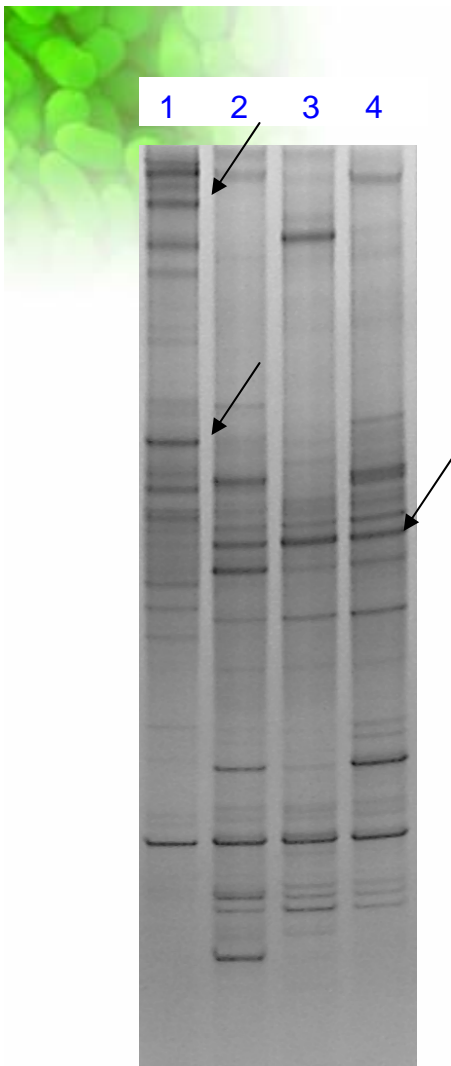
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

Permettono di studiare la microflora totale dominante.



Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore



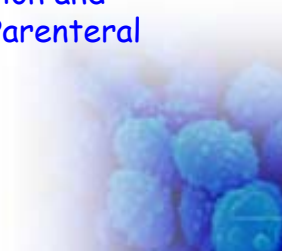


## DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

Permettono di confrontare nel tempo la microflora di un individuo.

Lane 1: T0, lane 2 : nutrizione esclusiva per 10 giorni; lane 3: nutrizione esclusiva per 10 settimane e lane 4 nutrizione parziale per 6 settimane.

LIONETTI P, CALLEGARI ML, FERRARI S, CAVICCHI MC, POZZI E, DE MARTINO M, MORELLI L. (2005). Enteral nutrition and microflora in pediatric Crohn's disease. JPEN Journal Parenteral Enteral Nutrition, 29(4 Suppl):S173-175;

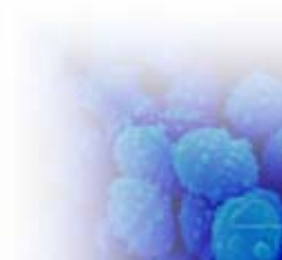




**I probiotici sono efficaci nella prevenzione e nella terapia delle infezioni intestinali?**



Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore

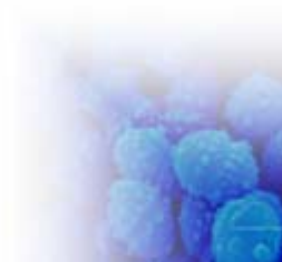




- **Integratore alimentare di microrganismi vivi che esercitano un effetto benefico migliorando l'equilibrio microbico intestinale**
- **Fuller, 1989**



- **Microrganismi vivi che, ingeriti in una certa quantità, esercitano effetti benefici**
- **Guarner e Schaafsma, 1998**



## Perché occorre valutare la dose giornaliera?

- Perché gli effetti sono dose dipendenti
- Perché la dose giornaliera varia notevolmente da ceppo a ceppo.

• Esempi:

*L.rhamnosus GG* -  $10^9$ - $10^{10}$  cellule/giorno

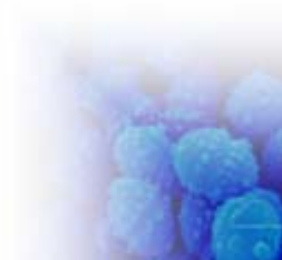
*L.johnsonii LA1* -  $10^{10}$  cellule/giorno

*L.plantarum 299V* -  $5 \times 10^8$  cellule/giorno

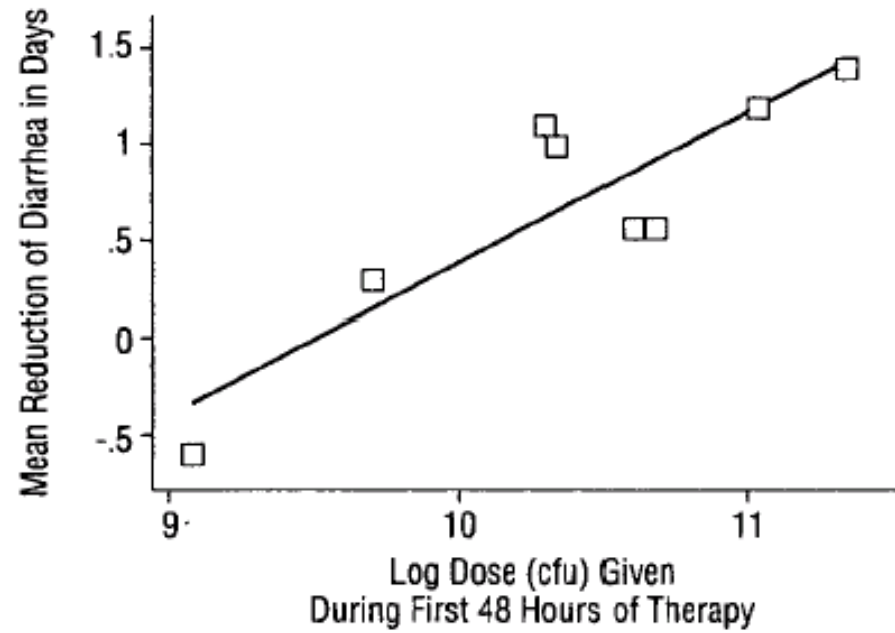
*L. reuteri SD2112* e *B. infantis 35264* -  $1 \times 10^8$  cellule/giorno

VSL#3 (miscela di 4 ceppi di lattobacilli, 3 di bifidobatteri ed 1 di *S.thermophilus*) -  $1.8 \times 10^{10}$  cellule/giorno

• La dose giornaliera: è la dose trovata essere efficace in studi clinici



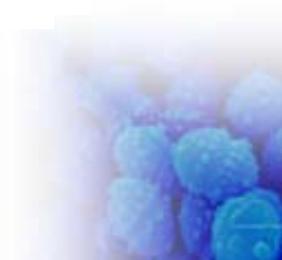




Van Niel, et al. 2002. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. Pediatrics 109:678-684



Centro Ricerche Biotechnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore





## Per quali infezioni intestinali è stata studiata l'efficacia dell'uso di probiotici?

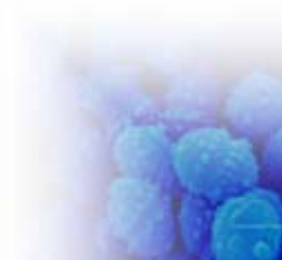
Infezioni intestinali associate a.....

rotavirus

batteri produttori di tossine

*Helicobacter pylori*

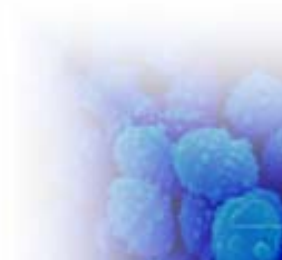
terapia antibiotica e da *Clostridium difficile*





## Rotavirus

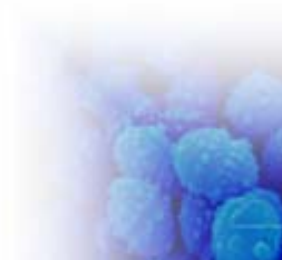
- Interessa neonati e bambini sia di paesi sviluppati che in via di sviluppo
- La combinazione di reidratazione e somministrazione di probiotici può ridurre la durata della diarrea
- Il meccanismo con cui agiscono non è chiaro.





## Infezioni da enteropatogeni produttori di enterotossine

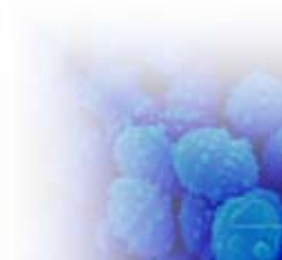
- Numerosi studi *in vitro* in cui ceppi probiotici hanno la capacità di prevenire la colonizzazione di batteri enteropatogeni produttori di tossine come *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella*. (es *Lactobacillus* GG and *L. rhamnosus* LC-705 riduce notevolmente l'adesione di *E. coli*, *L. johnsonii* LJ1 e *L. casei* Shirota bloccano inibiscono *S. typhimurium*)
- Le prove cliniche spesso non confermano i risultati delle prove *in vitro* o gli effetti sono poco rilevanti.



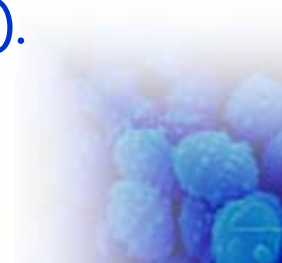


## Diarrea associata a trattamenti antibiotici

- E' presumibilmente il risultato dell'alterazione più o meno drastica della normale microflora intestinale. Questo squilibrio provoca una disfunzione dell'ecosistema intestinale e batteri patogeni possono così trovare accesso alla mucosa e colonizzarla.



- *Lactobacillus rhamnosus GG* previene la diarrea associata a terapia antibiotica in bambini con infezioni respiratorie. L'incidenza di diarrea era del 5% per i bambini che assumevano il probiotico mentre saliva al 16% nel gruppo placebo (Arvola et al. 1999)
- La somministrazione di *L. rhamnosus GG* riduceva i casi di diarrea all'8% nel gruppo dei bambini a cui veniva somministrato rispetto ad un'incidenza del 26% che si registrava nel gruppo placebo (Vanderhoof et al 1999).
- Nessun effetto è stato riscontrato utilizzando lo stesso ceppo batterico in pazienti adulti. Il 29% dei pazienti a cui veniva somministrato il probiotico andavano incontro a diarrea contro il 30% dei pazienti trattati con placebo (Tomas et al 2001).





## Meta-analisi

- I 6 studi selezionati prendevano in considerazione 707 individui.
- È evidente una forte eterogeneità per quanto riguarda il numero di individui presi in considerazione, i ceppi somministrati, la dose giornaliera, l'età dei bambini e il tipo di antibiotici somministrati. Il periodo di follow-up è in tutti i casi limitato.
- L'analisi è resa difficile dalla variabilità della definizione dei parametri. In alcuni casi non è definito.



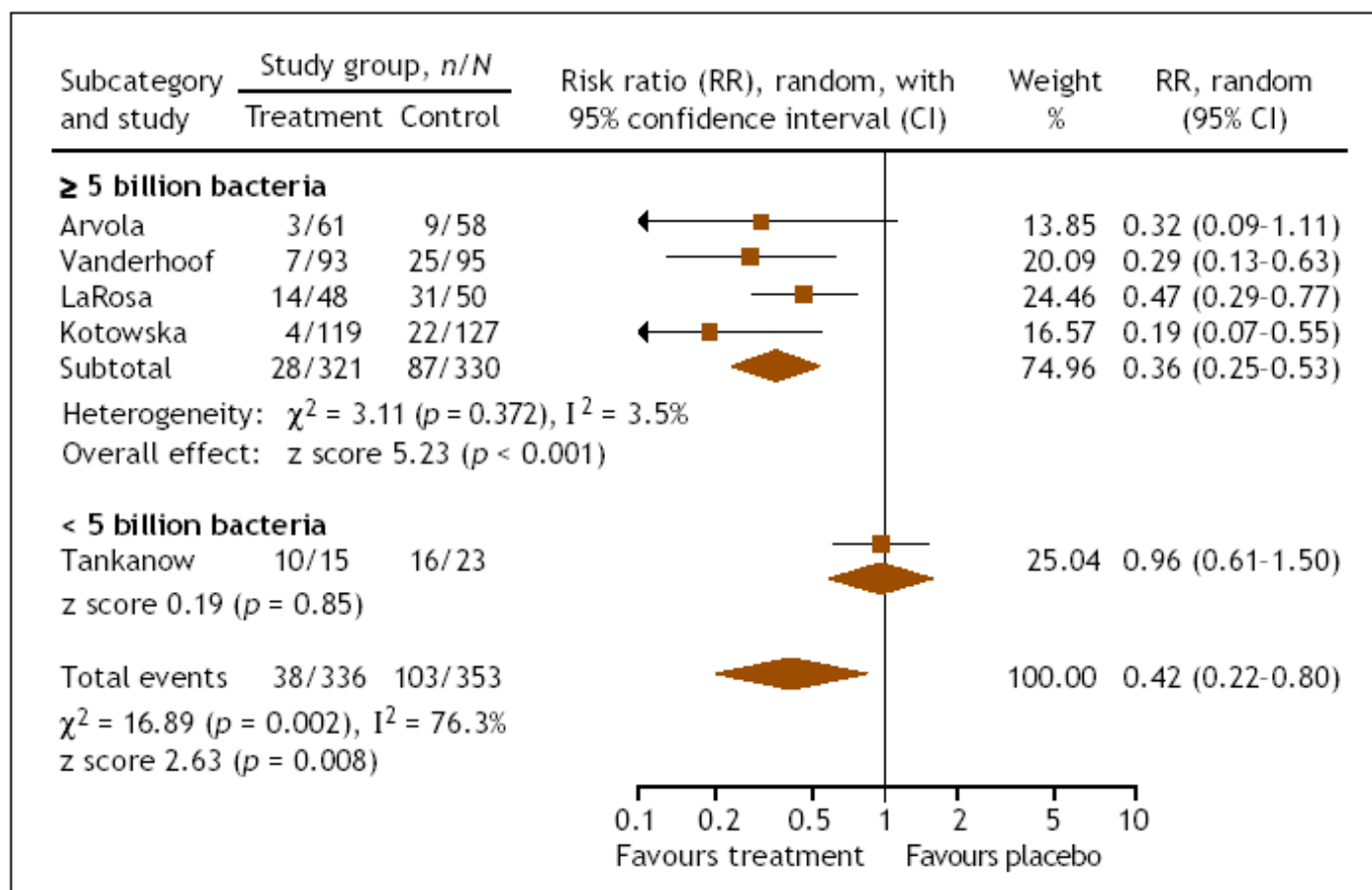
**Table 1:** Characteristics of studies included in the meta-analysis

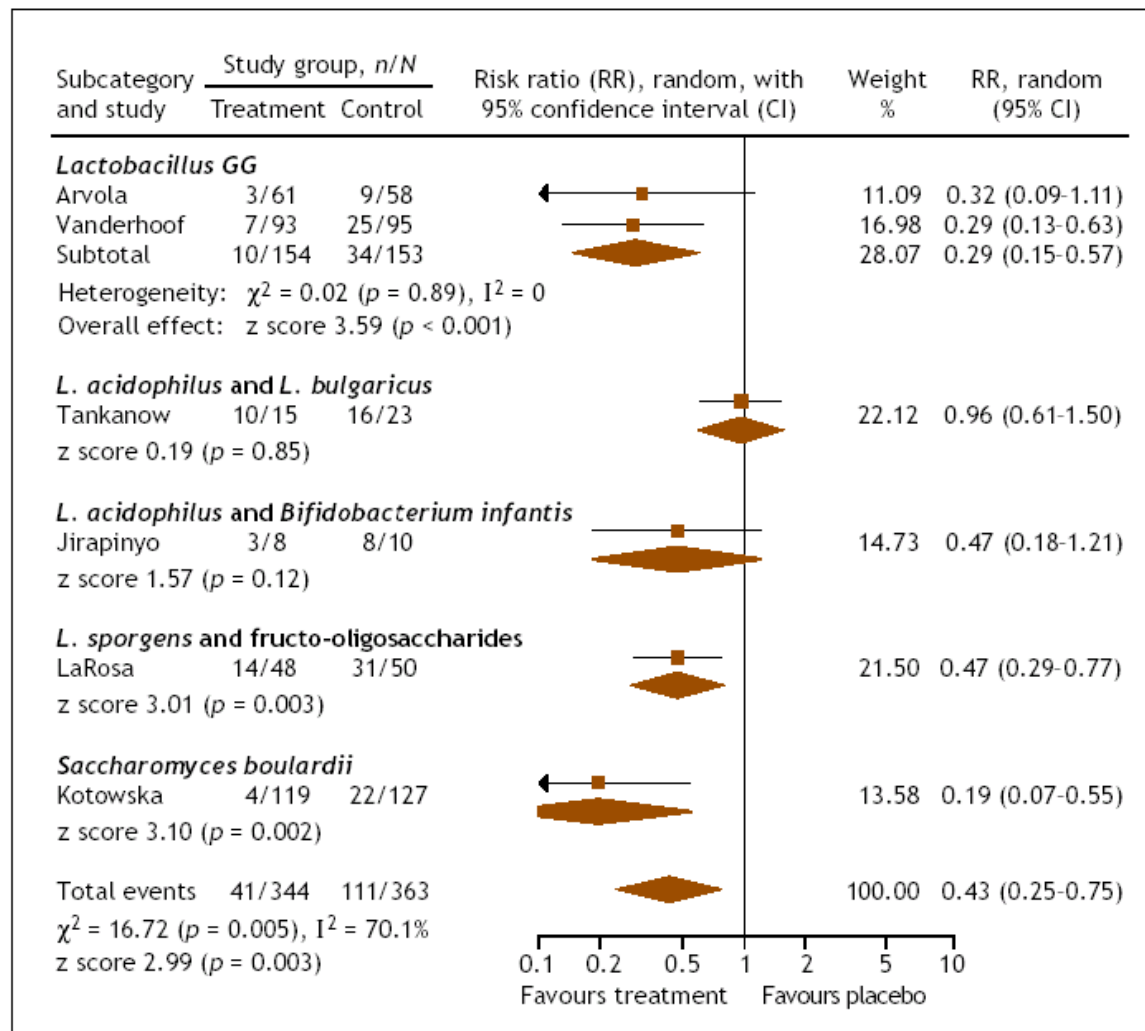
Study	No of participants (loss to FU); age range*	Probiotic (antibiotic) interventions with dosages, if reported	Definition of diarrhea for purposes of incidence	Study quality: Jadad score† (allocation concealment)
Arvola 1999 <sup>25</sup>	167 (48) 2 wk-12 yr	<i>Lactobacillus GG</i> , 20-40 billion CFU/d for 7-14 d (antibiotics not specified)	≥ 3 watery or loose stools per day for ≥ 2 consecutive days	2 (unclear)
Jirapinyo 2002 <sup>23</sup>	18 (0) 1-36 mo	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> 7 d of probiotic treatment, dose not stated (cefprozil, ampicillin, gentamycin, cloxacillin)	Not reported	2 (unclear)
Kotowski 2005 <sup>24</sup>	269 (23) 5 mo-15 yr	<i>Saccharomyces boulardii</i> 10 billion CFU/d for 7-9 days (a mixture of antibiotics)	≥ 3 loose or watery stools daily for ≥ 48 h, during or ≤ 2 wk after therapy	5 (adequate)
LaRosa 2003 <sup>4</sup>	120 (10) Mean age 6.6 yr	<i>L. sporogens</i> 5.5 billion CFU/d for 10 d (amoxicillin, amoxicillin + clavulanate, cephalosporin, erythromycin)	≥ 2 liquid stools over 24 h during study period	4 (unclear)
Tankanow 1990 <sup>7</sup>	60 (22) 5 mo-6 yr	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> 3 billion CFU/d for 10 days (amoxicillin)	≥ 1 abnormally loose stool daily throughout entire study period	3 (adequate)
Vanderhoof 1999 <sup>26</sup>	202 (14) 4-12 yr	<i>Lactobacillus GG</i> for 7-10 d, 10 billion for children < 12 kg, 20 billion for ≥ 12 kg (amoxicillin, cefprozil, clarithomycin)	≥ 2 liquid stools per day, twice or more during study period	4 (adequate)

Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. Bradley C. Johnston, Alison L. Supina, Sunita Vohra; *CMAJ*2006;175(4):377-383



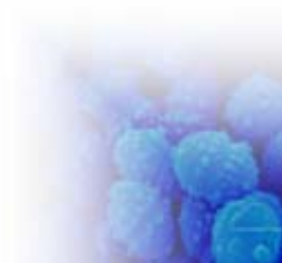






## Conclusioni

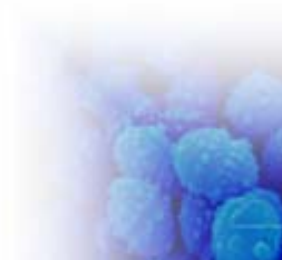
- La possibilità di utilizzare i probiotici nelle terapie di infezioni intestinali e i meccanismi di azione di questi batteri nel prevenirle non sono ancora completamente chiare e occorrono studi ulteriori.
- A volte promettenti risultati *in vitro* non trovano conferma negli studi clinici
- La mancanza di standardizzazione degli studi in termini di lunghezza del trattamento, dose giornaliera, lunghezza del follow-up ecc possono essere delle variabili che influenzano notevolmente la chiarezza e la ripetibilità dei risultati.

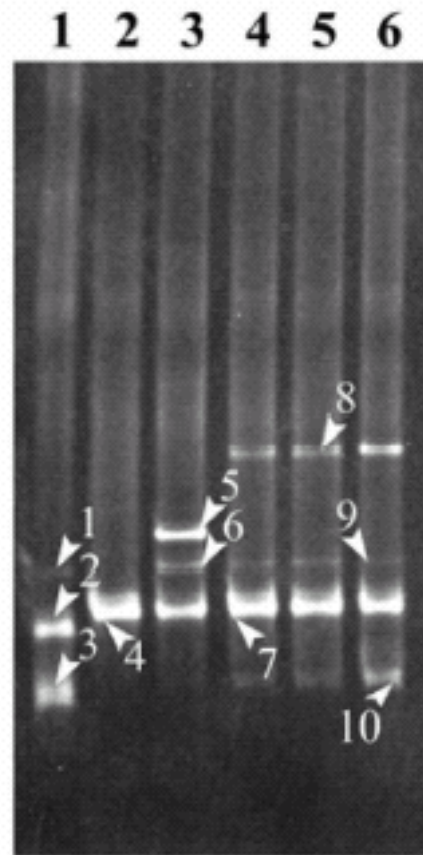
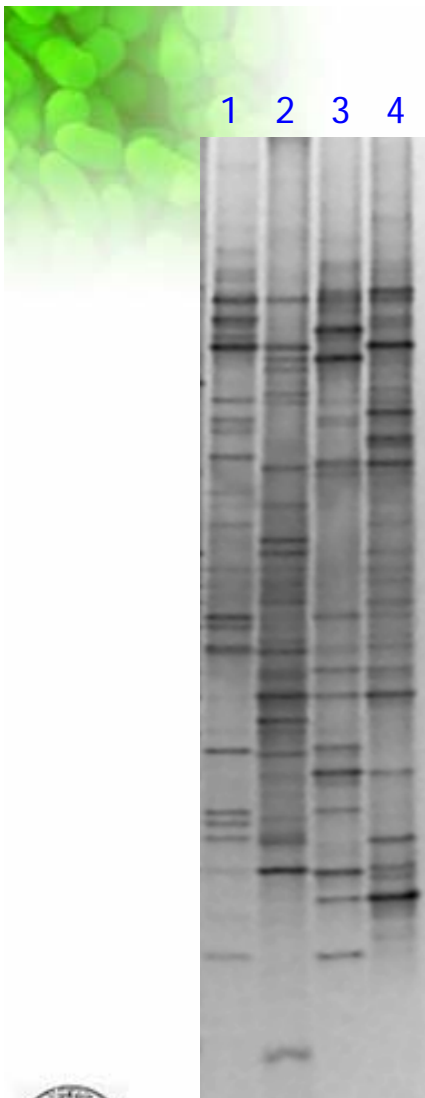




## L'ecosistema vaginale

- Composto da un numero limitato di generi e specie
- L'ambiente vaginale è molto selettivo
- La scarsità di nutrienti presenti consente la crescita di quei batteri capaci di adattarsi



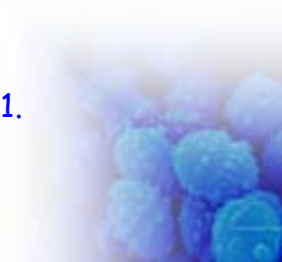


Devillard E, Burton JP, Reid G.

*Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005; 13:25-31.

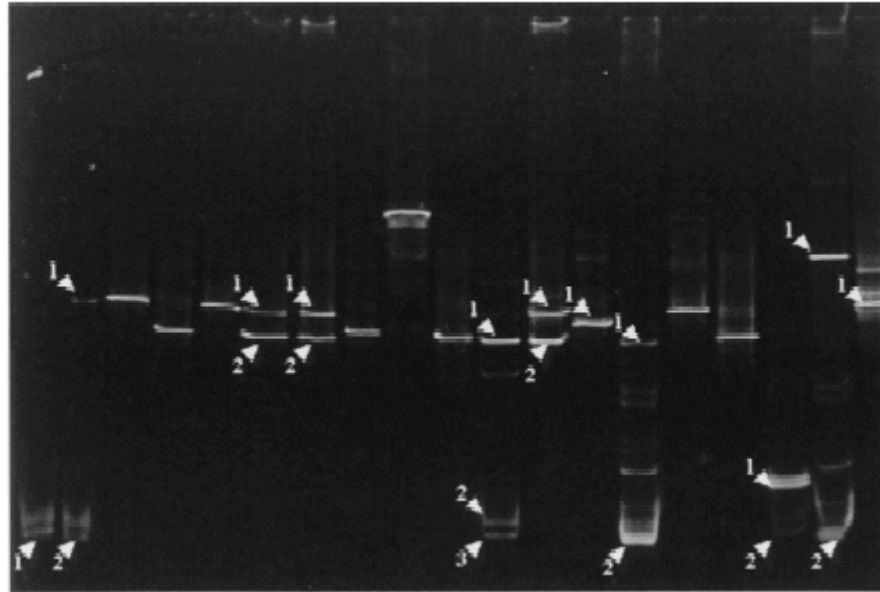


Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore





Subject 250 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269



Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:97-101.



Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore

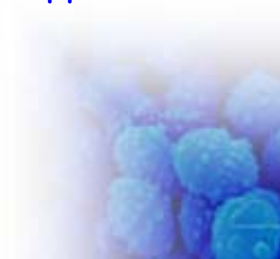
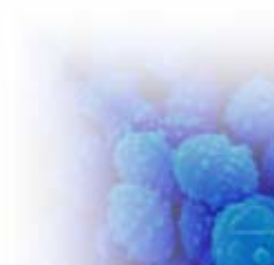




TABLE 1. BLAST analysis of vaginal bacterial V2-V3 16S rRNA sequences of excised fragments from DGGE gels (zero time)

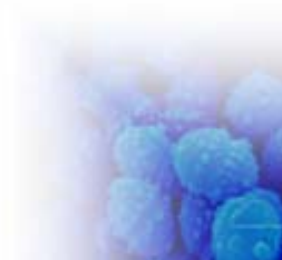
Subject	Fragment in gel	Most closely related bacterial sequence	% Identity	Accession no.
250	1	<i>Gardnerella vaginalis</i>	98	M58744
252	1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	100	AF257097
	2	<i>Gardnerella vaginalis</i>	98	M58744
253	1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	98	AF257097
254	1	<i>Lactobacillus iners</i>	100	Y16329
255	1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	97	AF257097
256	1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	100	AF257097
	2	<i>Lactobacillus iners</i>	99	Y16329
257	1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	98	AF257097
	2	<i>Lactobacillus iners</i>	100	Y16329
258	1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	AF015927
259	1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	100	AF243165
260	1	<i>Lactobacillus iners</i>	100	Y16329
261	1	<i>Lactobacillus iners</i>	99	Y16329
	2	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	AJ243423
	3	<i>Gardnerella vaginalis</i>	99	M58744
262	1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	97	AF375937
	2	<i>Lactobacillus iners</i>	96	Y16329
263	1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	97	AF375917
264	1	<i>Lactobacillus iners</i>	92	Y16329
	2	<i>Gardnerella vaginalis</i>	98	M58744
265	1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	98	AF257097
266	1	<i>Lactobacillus iners</i>	96	Y16329
267	1	<i>Caulobacter</i> sp.	98	M83799
	2	<i>Gardnerella vaginalis</i>	97	M58744
268	1	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	95	AF125217
	2	<i>Gardnerella vaginalis</i>	97	M58744
269	1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	99	AF257097







- In una donna sana il microbiota dominante è costituita specie appartenenti al genere *Lactobacillus*
- Le più comuni sono *L. crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus gasseri*



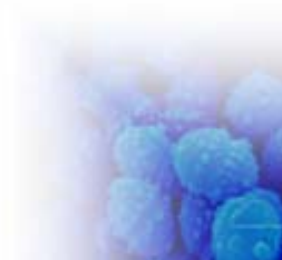





Nelle donne soggette a vaginiti batteriche il microbiota vaginale è composto da *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus* e *Bacteroides*.



Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore

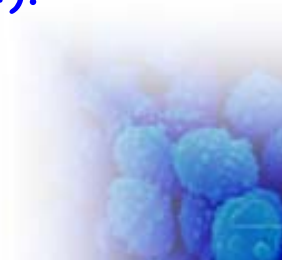




•Hellberg et al (2001) hanno evidenziato la presenza di lattobacilli nel 73.7% dei soggetti appartenenti ad un gruppo di donne senza vaginite mentre questo era possibile solo nel 29.8% dei casi quando i soggetti erano affetti da vaginite.

•Thorsen et al (1998) ha ottenuto gli stessi risultati studiando la microflora vaginale di un gruppo di 2729 donne sane e di un gruppo di 445 donne affette da vaginite batterica.

•Gli stessi risultati sono stati ottenuti mediante tecnica di real-time PCR da Zariffard et al (2002).

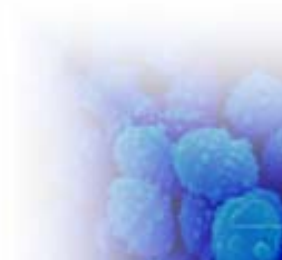




Il consumo di yogurt che conteneva un ceppo di *L.acidophilus* aumentava il numero statisticamente significativo di cellule di lattobacilli in vagina rispetto ad un gruppo controllo.

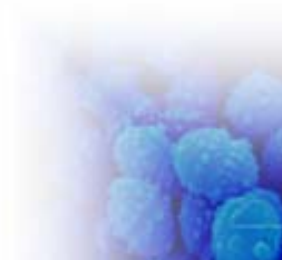


Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore



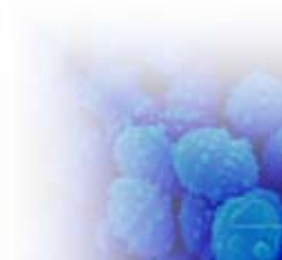


- Uso locale di *L.acidophilus* (ceppo non ben specificato) ha consentito di ridurre lo score di Nugent. Lo score si manteneva ridotto anche nel periodo di follow-up (Drago et al. J Altern Med 13:435-438; 2007).
- La somministrazione orale di *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in uno studio randomizzato con gruppo controllo aumentava il numero di lattobacilli (Reid G et al FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 35:131-134).



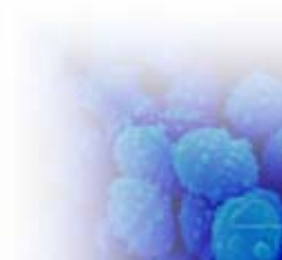


- La somministrazione in vagina di ceppi di *L.gasseri*, *L.fermentum* e *L.rhamnosus* non fornivano differenze significative rispetto al placebo (Eriksson et al 2005 Acta Derm Venereol; 85: 42-46).
- Il trattamento locale con *L.acidophilus* non aumentava il numero di lattobacilli nella vagina delle donne trattate (Fredricsson et al 1989 Gynecol Obstet Invest 28: 156-160)





- La mancanza di dati circa la capacità dei ceppi somministrarti di colonizzare e persistere in vagina rende difficile l'interpretazione dei risultati
- Le caratteristiche che rendono un ceppo, un probiotico sono assolutamente ceppo specifiche cosicché valutando gli studi clinici occorre considerare l'inefficacia del ceppo preso in esame ma questo giudizio non può essere esteso a tutti i ceppi appartenenti alla stessa specie.

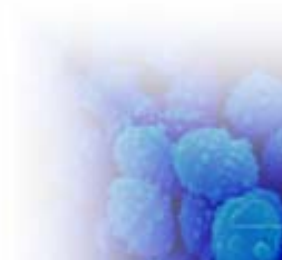




## Conclusioni

I risultati a volte discordanti possono essere dovuti:

- alla scelta non idonea, ceppi selezionati con prove in vitro sono incapaci di persistere in vagina
- La mancanza di standardizzazione degli studi in termini di lunghezza del trattamento, dose giornaliera, lunghezza del follow-up ecc possono essere delle variabili che influenzano notevolmente la chiarezza e la ripetibilità dei risultati.





*Grazie per  
l'attenzione!*



Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica del Sacro Cuore

