

MINERVA

PEDIATRICA

VOLUME 60 • 2008

METCHNIKOFF AND THE CENTENARY
OF PROBIOTICS:
AN UPDATE OF THEIR USE
IN GASTROENTERIC PATHOLOGY
DURING THE AGE OF DEVELOPMENT

G. CARAMIA



EDIZIONI • MINERVA • MEDICA

Metchnikoff and the centenary of probiotics: an update of their use in gastroenteric pathology during the age of development

G. CARAMIA

Acute gastroenteritis, antibiotic-associated diarrhea, diarrhea due to *Clostridium difficile* and traveller's diarrhea, *Helicobacter pylori* infection and intestinal inflammatory diseases are primitive and/or secondary pathological conditions that alter the intestinal mucosa and microbiota. For years researchers have searched for solutions to restore and rebalance normal transit and intestinal flora. Elia Metchnikoff was the first one to introduce oral bacteriotherapy, that uses very efficient microorganisms that prevent putrefaction and aging. Oral bacteriotherapy has now evolved in probiotics, whose helpful action to prevent and treat some gastroenteric pathologies is currently being studied.

Key words: **Gastroenteritis - Diarrhea - *Lactobacillus* - Probiotics.**

Probiotics in gastroenteric pathologies

Acute gastroenteritis, antibiotic-associated diarrhea, diarrhea due to *Clostridium difficile* and traveller's diarrhea, *Helicobacter pylori* infection and intestinal inflammatory diseases are primitive and/or secondary pathological conditions that alter the intestinal mucosa and microbiota: these pathologies

Received on June 10, 2008.

Accepted for publication on June 13, 2008.

Address reprint requests to: G. Caramia, Neonatology and Pediatric Department, Specialized Pediatric Hospital "G. Salesi", Ancona, Italy.

*Emeritus Head of
Neonatology and Pediatric Department
Specialized Pediatric Hospital "G. Salesi"
Ancona, Italy*

have always drawn researchers' and doctors' attention, stimulating many in order to increase the *corpus* of knowledge, to find solutions to them, trying to restore and/or rebalance normal transit and intestinal flora.¹⁻³

"Oral bacteriotherapy" originated one hundred years ago when Elia Metchnikoff (1845-1916), Nobel Prize in Medicine in 1908 for his studies on phagocytosis, noticed that the diet of some Caucasian and Bulgarian long-lived sheperds, whose average life, according to the current reports, reached 87 years *vs* 48 years of the American population, was the fermented milk, that was particularly healthy thanks to the action of two microorganisms: namely, the *Lactobacillus Bulgaricus* and the *Streptococcus thermophilus*. After having carried out long studies, in his book "The prolongation of life. Optimistic studies" (1907 and 1908) he asserted that the sheperds' longevity was due to live milk bacteria, that are very efficient to prevent putrefaction and aging.⁴ From that moment on a fermented milk called "Lactobacilline" was released on the market. Afterwards yoghurt took its place, which is now being supplanted by probiotics (from the Greece "pro-bios" that means in favour of life).

The denomination “oral bacteriotherapy”, used for decades in the prevention and therapy of gastroenteritis in the age of development and in adults, has evolved and the current probiotics, due to the high level of evidence available, are acquiring significant scientific value.^{3, 5, 6} For this reason it is worth verifying what is currently known, in the light of the latest discoveries.

Infectious acute diarrhea

Until 50 years ago in the most industrialized countries the most frequently occurring pathology affecting the digesting system during the age of development was, by far, infectious acute gastroenteritis, defined by the World Health Organization (WHO) as the expulsion of liquid feces more than three times in 24 hours, even if some Authors lower the limit to one-three times in 24-48 hours for pediatric patients. This often makes it difficult to compare statistics and assess, in multicenter research studies, the results of various therapeutic facilities involved.^{7, 8}

This pathology, by now a minor one since fatal cases are absolute exceptions, is caused in 70% of cases by viruses, such as rotaviruses, accounting for 30-45% of all viral diarrheas, Caliciviruses, including Norwalk virus, enteric Adenoviruses serotypes 40 and 41, as well as Astroviruses. Diarrheas caused by bacteria (*Campylobacter jejuni*, main cause of diarrheic diseases in the USA in adults, Salmonellas, Shigellae, enteropathogenic *Escherichia coli*, enterocolic Yersinia) and those due to parasites (particularly *Giardia lamblia*) should also not be forgotten.

Despite this, infectious diarrhea is still a significant cause of morbidity, in particular infections due to rotaviruses, in the first two years of life, which entail Rotaviruses a high yearly cost for society and give rise to anxiety for the families of affected children.⁹ It has been calculated that in the United States the average cost for each single acute diarrhea episode managed in ambulatories is approximately 300 dollars, half of which are due to parents' missed working days. Therefore, its enormous impact on health costs should be clear, as well as the reason why attempts are

made to solve it by resorting to probiotics.¹⁰

A multicenter, randomized, double-blind study *vs* a placebo carried out on 287 children aged 1 month-2 years affected with diarrhea caused by various pathogens (39 by *Rotavirus*, 5 by *Adenovirus*, 9 by enteropathogenic *Salmonella enteritidis* or *Escherichia coli*) showed that administration of *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) at a dose of 10¹⁰ colony forming units (cfu) along with a rehydrating solution is statistically effective to reduce the duration of diarrhea, particularly if due to *Rotavirus*. Hospital stay was also reduced in length and longer-lasting cases of diarrhea were found in subjects not taking LGG, even if figures were not statistically significant.¹¹

A meta-analysis which included nine randomized double-blind clinical studies *vs* a placebo (765 children aged 1 month to 3 years) showed that probiotics of the *Lactobacillus strains* (4, among which LGG) can shorten the duration of diarrhea by 0.7 days (due to *Rotavirus* by 0.8 days; due to other pathogens by 0.5 days) and lower the number of daily discharges (-1.6 on the second day of treatment). The study also highlighted that the best results in reduction of the number of months of diarrhea are achieved with high doses of *Lactobacillus*, namely 10¹⁰-10¹¹ cfu, administered once or twice daily, with subsequent intestinal colonization which prevents the action of the various pathogens.¹²

In another meta-analysis including 18 studies on subjects aged less than five years, probiotics associated with a standard glucosaline rehydrating solution shortened the duration of diarrhea by about one day in comparison with the various control treatments, even in hospitalized patients.¹³

A meta-analysis by Cochrane collected the results of 23 controlled, randomized studies *vs* placebo (some of which already present in the previous two meta-analyses), carried out in various countries on 1 449 children with diarrhea of infectious origin.¹⁴ Treatment with various probiotics (administered in a wide range of dosages) can shorten the average duration of diarrhea by 1.3 days in comparison with a placebo or no treatment: for this

reason the authors deem probiotics to be a useful addition to a rehydrating therapy against diarrheas in children and adults.¹⁴

A randomized, double-blind clinical study *vs* placebo carried out on 87 children aged 2 months-6 years affected with diarrhea caused by various pathogens (39 by *Rotavirus*, 5 by *Adenovirus*, 9 by enteropathogenic *Salmonella enteritidis* or *Escherichia coli*) showed that administration of *LGG* at a dose of 1.2×10^{10} cfu twice daily for five days is statistically effective to reduce rehydration times in subjects with diarrhea due to *Rotavirus*. The duration of diarrhea was only lowered in subjects affected by *Rotavirus*. Duration shortening was statistically significant, particularly in subjects aged less than 12 months, if the therapy had been started within 72 hours from the onset of diarrhea. Intestinal colonization with *LGG* was highlighted with a molecular method in 80% of children treated after the V day of therapy and in 41% after 14 day following the end of the treatment.^{15, 16}

Similar results were also reported in a review of the literature and were achieved in a more recent meta-analysis using *LGG* only.^{17, 18} The study, carried out by assessing eight randomized clinical trials *vs* placebo involving a total of 988 subjects aged 1-36 months, 494 in the study group and 494 in the control group, showed that administration of 10^9 - 10^{11} cfu of *LGG* 1-3 times daily shortens the length of diarrhea due to *Rotavirus*, slightly shortens that due to unidentified infections agents but does not affect that due to invasive enteropathogens. *LGG* lowers the risk of diarrhea lasting longer than seven days and lowers the duration of hospital stay, even though to a moderate extent.¹⁹ There was no reduction in the number of alvine episodes, which is not considered to be a perfect index to evaluate the therapeutic effect in control of acute diarrhea by the WHO.

Some Italian pediatricians carried out a single blind randomised controlled trial over 12 months in collaboration with family paediatricians who, in the Italian Public Health System, care for children up to 12-14 years of age. Fivehundreds and seventyone children aged 3-36 months visiting a family pediatrician for mild to moderate acute diarrhea were

randomly assigned to receive written instructions to purchase oral rehydration alone, as control, or one of five probiotic preparations (*LGG*; *S boulardii*; *Bacillus clausii*; mix of *L delbrueckii str bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum*; or *E faecium strain SF68*) for five days for the treatment of acute diarrhea (defined as three or more outputs of loose or liquid stools a day). In the study were included all children with diarrhea lasting less than 48 hours. Primary outcomes were duration of diarrhea, daily number and consistency of stools; secondary outcomes were duration of vomiting and fever, rate of admission to hospital, safety and tolerance.²⁰

The total duration of diarrhea, daily stool output and consistency, were significantly lower ($P < 0.001$) in children receiving *LGG* and in those receiving the bacterial mix (*L delbrueckii var bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum*) than in patients receiving oral rehydration alone. None of the secondary outcome measures evaluated in children receiving probiotic preparations, was significantly modified.²⁰

In addition to this, a greater therapeutic efficacy was found with the administration of *LGG* or *Saccharomyces boulardii* if used at an early stage of the disease and at high doses, whereas in an oral rehydrating therapy the association with zinc noticeably improves the course of the pathology.²¹

Concluding, on the basis of the above, despite different definitions of diarrhea and the variability between probiotics tested, start, dose and duration of treatment, participant groups, potential health benefits attributed to some probiotics, as probiotic microorganism are not equivalent, has been confirmed in well-designed, well-conducted, randomized, controlled trials. This is especially true in the pediatric population and reviews concluded that probiotics, with standard rehydration therapy, decrease the duration of acute diarrhea.

Therefore there is level I evidence (as reported in the National Guideline Plan 2004) for the use of probiotics in treating acute infectious diarrhea.^{1, 15, 18-20, 22, 23}

LGG in doses not inferior to 10^{10} cfu per day for five days, is the most investigated and effective probiotic strain for this condition and appears particularly effective, when administered early in the course of disease, for watery diarrhea and viral gastroenteritis, particularly from *Rotavirus*, the most common cause of severe diarrhea in children worldwide, but not for invasive bacterial diarrhea. The results are statistically significant but, from a clinical point of view, oral rehydration solution (ORS) remains the most effective therapeutic method to improve the course of acute gastroenteritis. However, the economic benefits cannot be ignored, since in preventive medicine a shorter rebalance of intestinal flora, due to the administration of probiotics such as LGG together with ORS, might prove useful to prevent chronic inflammatory processes of the large intestine and their onset at later ages, since for the Crohn disease only 25% of this condition starts during the age of development.

Diarrhea due to antibiotics

According to recent statistical data collected on 1 000 000 Canadian children, 14 of the 20 most frequently prescribed products are antibiotics whereas 76% of subjects examined (*i.e.* 760 000) had been prescribed antibiotics at least once.²⁴ The use of antibiotics in primary care in Europe varied greatly. The highest rate of use is in France and only 3 of 27 European countries use more than in the United States.²⁵

The data in question show the frequent use of these medicinal products, with their well-known positive effects but also their possible side effects. Among the latter, an alteration of the intestinal microflora should be mentioned, which enhances the development of pathogenic micro-organisms and may result in inflammation of the intestinal mucosa and gastroenteric disorders such as diarrhea, an event which may take place up to two months following the suspension of the therapy. Children taking broad-spectrum antibiotics, particularly clindamycin but also penicillins and cephalosporins, have diar-

rhea with a rate between 11% and 62%. This complication is more likely to take place in subjects repeatedly exposed to antibiotic therapies, hospitalized and/or immunodepressed, and is particularly serious when it is associated with infection due to *C. difficile*.²⁶⁻²⁸ Moreover, it should be noticed that 26-50% of diarrhea cases due to antibiotics are attributed to *C. difficile*, another 10-20% to bacteria or viruses while the remaining ones are of unknown etiology.²⁹

A meta-analysis of nine studies (1 214 patients) on antibiotic-associated diarrhea (AAD) carried out in the period between 1966 and 2000, two of which in pediatric patients, demonstrated that probiotics taken at the same time as an antibiotic therapy are more effective than placebo to diminish the frequency of antibiotic-associated diarrhea (10% *vs* 22%). In practical terms, expressed as Number Needed to Treat (NNT), it means that eight people should be treated with a probiotic agent in order to prevent one case of diarrhea.³⁰ However, it should be remarked that the variegated nature of clinical situations in the single studies limits the possibility of drawing any definite conclusions. Moreover, the nine studies show substantial differences relative to the probiotics used (*Lactobacilli* alone, including LGG, or as an association, *Enterococcus faecium* SF68, and *Saccharomyces boulardii* yeast), dosages, frequency of administration (2-4 times daily), treatment duration (5-49 days), antibiotics used and start of administration.

Therefore, the need to carry out some further studies confirming a clinical benefit of probiotics should appear evident. The use of LGG gave the best preventive results since, as reported by the authors, it produces some antimicrobial substances which inhibit *Escherichia coli*, *Streptococci*, *C. difficile*, *Bacteroides fragilis* and *Salmonellas*.³⁰

A meta-analysis carried out in compliance with the Cochrane criteria in order to evaluate adverse effects and efficacy of probiotics in the prevention of AAD took into consideration six randomized clinical studies *vs* placebo or no therapy, two of which treated with LGG, for a total of 307 subjects and conducted up to January 2005. A total of 707 children aged 2

weeks to 15 years (408 undergoing treatment and 428 controls for a total of 707 after withdrawals at follow-up) were involved in the study and then treated with probiotics from the beginning till the end of antibiotic therapy (7-14 days). A "Per Protocol" analysis, that is, an analysis of subjects in a group who actually complied with the protocol only, highlighted that administration of probiotics had resulted in a reduction of the risk of antibiotic-associated diarrhea in comparison with a placebo [relative risk (RR) 0.43; 95% confidence interval (CI) 0.25 to 0.75] and that the number of subjects who should be treated in order to prevent one case of diarrhea (NNT) was 6. The Intention To Treat (ITT) analysis, which also includes any untreated cases which should have been treated, gave non-significant results. However, it should be stressed as indicated by the authors of this review, the validity of ITT analysis is not robust if rates of loss to follow-up are high. Therefore, the authors conclude that, due to many variables (probiotics types and doses, different numbers and consistencies of the faeces with reference to subjects' age) and some missing information, further and deeper studies are necessary, with those probiotics which have proved to give the best results so far (*LGG*, *L. sporogens* or *S. boulardii*) and at suitable doses ($5-40 \times 10^9$ cfu).³¹

A meta-analysis of six randomized controlled clinical trials *vs* a placebo involving a total of 766 children aiming to ascertain the preventive action of probiotics in ADD, showed a reduction of cases of diarrhea if administered together with probiotics, with a variable between 28.5 and 11.9% (RR 0.44; 95% CI 0.25 to 0.77, random effect model). This investigation included two studies for a total of 307 subjects treated with *LGG*.³² For every seven patients that would develop diarrhea while being treated with antibiotics, one fewer will develop AAD if also receiving probiotics.

A more recent Cochrane meta-analysis aiming to evaluate adverse effects and efficacy of probiotics in the prevention of AAD took into consideration 10 studies, for a total of 1 946 subjects aged 0-18 years, who had been given probiotics at the same time as antibiotics. Patients had then been checked for a period

between 15 days and 3 months. A "Per Protocol" analysis, that is an analysis of subjects who actually complied with the protocol only, highlighted statistically and clinically valid results in the prevention of antibiotic-associated diarrhea, particularly for *LGG*. All this despite the heterogeneity of clinical situations and the range of different probiotics used (*Lactobacilli spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, or *Saccharomyces boulardii*). As regards the ITT analysis, it was not found to be statistically significant (RR 0.90; 95% CI 0.50 to 1.63, $I^2=92.9\%$). Five of ten trials monitored for adverse events (N.=647); none reported a serious adverse event.³¹

Summing up, on the basis of some more recent studies also including adults and according to some authors, there is level I evidence for the use of probiotics in treating AAD.^{23, 31, 32} If some more sensitive statistical parameters (ITT) are taken into consideration, some further investigation would be advisable, therefore the evidence level might be questioned.^{22, 30, 31}

The results obtained in particular with *LGG*, the most effective one, and with *Saccharomyces boulardii*, even though they are not statistically significant in some respects, are not such as to recommend their systematic administration. However, it should be noted that in cases at risk, such as subjects who repeatedly use antibiotics or those characterized by diarrheic episodes following the administration of antibiotics, their use may be justified. This aiming to prevent inflammatory processes of the intestinal mucosa during the age of development which, although rarely, may entail, even at following stages, chronic inflammatory diseases of the large intestine (irritable colon, ulcerous colitis, pouchitis, Crohn disease). Prevention of even a limited number of cases of AAD might therefore result in noticeable benefits in terms of patients' health as well as economic ones for their families and the health system.

Diarrhea due to *Clostridium difficile*

Diarrheic disease due to *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile* diarrhea, CDD) is

only due to strains of *C. difficile* producing two powerful toxins: A and B. The A toxin exerts a slight cytotoxic action, damages the mucosa and causes inflammation and intestinal secretions.³³⁻³⁵ The B toxin is one of the most powerful cytotoxins known and results in intracellular loss of potassium, inhibition of protein and nucleic acids synthesis. It is hypothesized that the invasion of *Clostridium difficile* toxins A and/or B from the gut mucosa, where they may play a role in inflammatory damage, is the basis for the CDD and of shock-like systemic symptoms, observed in severe cases of this infection.

C. difficile is generally swallowed as a spore which survives the acid environment of the stomach and converts into a vegetative form in the colon. It has been assessed that 50% of infants are colonized by toxinogenic *C. difficile* but, for unclear reasons, are asymptomatic and unresponsive to pseudomembranous colitis even if they have a high load of toxinogenic strains: children usually become susceptible after the age of five. In adults a low percentage is present in the large intestine and may be part of the normal intestinal flora.^{34, 35}

At various ages, therefore, there can be asymptomatic carriers, as well as patients subject to a slight diarrheic syndrome, fever (30-50% of patients) leukocytosis (50-60%), abdominal pain or cramps (20-33%), nausea, illness, anorexia, hypoalbuminemia, presence of hidden blood in the feces, dehydration or pseudomembranous colitis or other serious intestinal manifestations such as toxic megacolon, perforation, toxic shock with high mortality rates.³⁴

In a hospital, contamination of the environment (furnishings, floor) and personnel (especially their hands) is particularly dangerous and treacherous. In the environment, *C. difficile* may persist for months, since it is sporigenous and the pathologies it entails noticeably affect the costs for the health service and hospitalization and treatments at home.

C. difficile is the leading cause of nosocomial antibiotic-associated diarrhea and colitis (CDAD). It is reported to be responsible for 10% to 25% of all cases of antibiotic-associ-

ated diarrhea, for 60% of antibiotic-associated colitis and for almost all cases of pseudomembranous colitis. *C. difficile* is able to overgrow in the intestine of patients whose normal microflora has been disrupted by antimicrobial or antineoplastic drugs.³⁶

Therefore, factors enhancing the onset of the disease are the following: exposure to a polluted environment, colonization of the intestine by *C. difficile*, alteration of the intestinal microbial flora, mainly due to broad-spectrum antibiotic therapy (beta-lactamines and clindamycin), reduction of immune defences due to various causes.

Probiotics were used in the past in association with antibiotics, namely vancomycin and metronidazole, in the treatment and prevention of relapses of the disease due to *C. difficile* and *Saccharomyces boulardii* (1 g/day for 28 days) had proved rather satisfactory.^{37, 38} These findings were also confirmed recently by a review of the literature in pediatric patients and adults, also highlighting an important role of *S. boulardii* in recurring diarrhea due to *C. difficile*.³⁹

In a pediatric hospital of maritime provinces of Canada during the period 1991-1999, 32% of hospital diarrheas were due to *C. difficile*, the rest to *Rotavirus* (31%), *Adenovirus* (30%), while only 7% to other viruses, thus showing that *C. difficile* was the main cause of diarrhea in hospital environments.⁴⁰

To confirm this, in a study carried out in a Turkish pediatric hospital, diarrhea due to *C. difficile* was found in 16% of cases of diarrhea in a hospital environment during antibiotic treatment of children aged 2 months to 13 years (mean age 5.4 years), with a male:female rate of 1:2.⁴¹

An investigation carried out on 200 pediatric subjects (mean age 5.4 years, 2000-2003 time period) in order to evaluate the risk of diarrhea due to *C. difficile* following antibiotic therapy and the result of therapies including probiotics showed a high percentage of diarrheas due to antibiotics (74.5%) and previous hospitalization (55.5%). The effect of probiotics was found to be modest.⁴²

Another more recent study on epidemiology of diarrhea due to *C. difficile* in the period 2001-2006 in the USA detected an increase

from 46% to 64% of the frequency of this infection contracted by children in the community.⁴³ Moreover, it is well-known that diarrhea due to *C. difficile* in pediatric patients is the most serious complication during antibiotic therapies, especially in immunodepressed individuals, transplantations, subjects treated with chemotherapeutic agents.⁴²

These data do not simply stress a noticeable increase of the infection in pediatric patients, but also the high risk of contracting the infection following antibiotic therapies, especially if they are long-lasting or if the infection is contracted in a hospital environment.

In 2006 the results of a meta-analysis were reported, which is likely to be the largest ever, involving 31 randomized, double-blind clinical studies in the period 1977-2005. In order to verify the efficacy of probiotics (*S. boulardii*, *LGG* and a mix of various probiotics) in the prevention of diarrhea due to antibiotic intake (25 studies) and in the treatment of the disease due to *C. difficile* (6 studies).⁴⁴ In 25 studies, involving a total of 2 810 subjects undergoing antibiotic therapy, 64% of whom were adults and 36% children, the therapy resulted in lowered risk of the disease associated with the use of antibiotics (RR 0.43; 95% CI 0.31 to 0.58, $P < 0.001$). In the nine studies which involved children, 817 subjects were treated with *LGG* at an average dose of 1×10^{10} cfu and six were found to be statistically effective. Daily doses of probiotics ranged from 1×10^7 to 1×10^{11} , with a mean of 3×10^9 . Use of a high dose ($=10^{10}$ /day) of probiotic was associated with a significant efficacy for AAD. The duration of probiotic treatment also varied widely from 5 days to 8 weeks (median of 2 weeks).

Of the six studies evaluated for the infection due to *C. difficile*, all on adult subjects, five dealt with the treatment of the disease and only one with its prevention. Despite the limited number of trials, the pooled relative risk from this meta-analysis showed significant efficacy of the treatment associated with antibiotics/probiotics against the disease due to *C. difficile* (RR 0.59; 95% CI 0.41 to 0.85, $P = 0.005$). Daily doses of probiotics ranged from 2×10^{10} to 6×10^{11} , with a mean daily dose of 5×10^{10} . The duration of probi-

otic treatment also varied from 3 to 5 weeks, with a median of 3 weeks. The number of trials was too small to determine if a dose-response or duration-response effect was present.

Probiotics which proved to be effective in the prevention of ADD were *LGG* and *S. boulardii*, but for reductions in recurrences of CDD the best was *S. boulardii*.⁴⁴

This meta-analysis suggests that probiotics significantly reduce the incidence of AAD and are an effective treatment for CDD. Future studies should expand the types of probiotics tested and pay careful attention to proper study design and sample size considerations.

Subsequent studies and a meta-analysis showed that *LGG* or *S. boulardii* may be useful in treating or preventing recurrences of CDAD by replacing normal gastric flora. No cases of fungemia or bacteremia with the use of probiotics were reported in the studies evaluated but the different definitions of recurrence CDAD, the different probiotic doses and the heterogeneity of the studies makes definite conclusions difficult to recommend probiotic therapy as an adjunct to antibiotic therapy for preventing *C. difficile* diarrhea and/or colitis and to support the use of probiotics alone in the treatment of *C. difficile* colitis.⁴⁵

Summing up, *LGG* and *S. boulardii* are the most investigated probiotic strain for this condition. Since to date evidence was apparently found in only one study with a suitable design for prevention and therapy, particularly in adults, the evidence level for the use of probiotics in treating CDD is of type II.

Although generally safe and well tolerated, both *S. boulardii* and *LGG* should be used cautiously in immunocompromised patients. Not enough data exist to currently support the use of other probiotic preparations in these conditions. Further study of probiotics, including large, well-designed, randomized controlled dose-ranging trials, comparative trials, and cost-benefit analyses are necessary.^{23, 44-46}

Necrotising enterocolitis

Necrotising enterocolitis (NEC) is an inflam-

matory pathological condition of the intestine with an incidence of 1 to 3/1 000 live births. It is rather frequent in premature born babies and causes death in 10-30% of those weighing less than 1 500 grams and 20-40% of cases requiring surgery. The causes of the disease are not fully known yet, but there seem to be a range of factors as a lowered exposure to maternal microflora and an excessive exposure to the microflora typical of Neonatal Intensive Care Units (NICUs) (*Staphylococci*, *Enterobacteriae*, *Enterococci*, *Candida spp*), use of sterile nourishment, wide use of antibiotics. All this involves intestinal bacterial colonization, which is totally different from that of breast-fed babies, and intestinal defences exerting the role of intestinal ecosystem in the modulation of immunity and inflammation. According to some, the condition is triggered by nourishment, particularly lactose which, when it reaches the intestine of premature children, allegedly gives rise to excessive fermentation phenomena, enhanced by a peculiar intestinal flora, different from the normal one, and an excessive proliferation of intestinal micro-organisms. The latter allegedly trigger a strong inflammatory reaction, which may lead to necrosis of the intestinal mucosa and even perforation of the intestine, resulting in the need for an urgent surgical operation, which may be devastating.^{47, 48}

In this respect probiotics, by exerting a competitive action against pathogenic bacteria and fungi, enhancing intestinal maturation mechanisms, favouring a suitable immune response and preventing bacterial and fungal colonization and their migration through the intestinal mucosa, may exert a prophylactic action, especially *LGG*.^{49, 50}

A multicenter randomized double-blind study in 12 Italian NICUs, one of the first consistent well-designed, well-conducted, controlled trials on the subject, has been conducted in 495 newborn infants with a gestational age <33 weeks or birthweight <1 500 g, in order to check whether probiotics, by reducing pathogens in the bowels of preterm infants, contribute to the reduction of the incidence of nosocomial infections (urinary tract infections [UTIs], bacterial sepsis and

NEC). Five hundred eighty-five newborn infants were randomized to receive standard milk feed supplemented with *LGG* (N.=295), in a dose of 6×10^9 cfu, once a day until discharge, starting with the first feed, or placebo (N.=290). UTIs (3.4 vs 5.8%) and NEC (1.4 vs 2.7%) were found less frequently in the probiotic group compared to the control group, but these differences were not statistically significant.⁵¹

After some very positive experiences on rats, another study was conducted in order to evaluate the hypothesis that probiotics, by normalizing the intestinal flora, lower the rate and seriousness of necrotizing enteritis, during the 2001-2004 period. It involved 145 premature children weighing less than 1 500 g. Among these, 72 were treated with a mix of various probiotics (*Bifidobacteria infantis*, *Streptococcus thermophilus*, and *Bifidobacteria bifidus*; [Solgar, Israel]), at a dose of 10^9 cfu daily, up to the XXXVI week after birth, whereas 73 were kept as controls.⁵²

The incidence of NEC was reduced in the study group (4% vs 16.4%; P=0.03; RR 0.25; 95% CI 0.075 to 0.86). NEC was less severe in the probiotic-supplemented infants (Bell's criteria 2.3 ± 0.5 vs 1.3 ± 0.5 ; P=0.005). When the combined incidence of NEC and/or mortality was compared, significantly more infants in the control group (17/73) were affected as compared with the study group (6/72) (P=0.025; RR 0.358; 95% CI 0.150 to 0.856).

Three of 15 babies who developed NEC died, and all NEC-related deaths occurred in control infants. These very evident data confirmed the hypothesis that probiotic supplementation reduced both the incidence and severity of NEC in premature neonatal population.⁵²

Another attempt to verify the efficacy and safety of probiotics in the modification of the intestinal bacterial flora in the newborn and prevent the possible onset and seriousness of the NEC was made by Barclay *et al.*, who conducted a meta-analysis on five randomized clinical studies vs controls in subjects before the end of the gestational age < 33 weeks and with very low body weight (very low birth weight [VLBW]<1 500 g), for a total of 1 267, of which 640 treated and 627 con-

trols. The studies have variable entry criteria and feeding practices and also the heterogeneity of probiotics used, the administration methods and dosages, which still have to be defined, did not make it possible to draw any final indications, but all studies have shown, in the group of VLBW subjects treated, a lower frequency of the NEC and lower mortality rates. Insufficient numbers of infants were included in these trials to reach statistical significance for overall mortality. No adverse events attributable to probiotics were recorded in any of the studies.⁵³

Another review of randomized controlled clinical studies was conducted in order to evaluate efficacy and safety of the administration of probiotics started in the first 10 days of life and lasting seven or more days in the prevention of the NEC (stage 2 or greater) in premature VLBW subjects <1 500 g born of gestation <33 weeks (from 1980 in November, 2006). The meta-analysis of these seven randomized controlled clinical studies (for a total of 1 393 prematures, 605 of whom involved in the study with *LGG*), performed in compliance with the Cochrane Neonatal Review Group strategy, showed a lower risk of NEC in the group treated with probiotics (38 out of 690, 6%) in comparison with untreated ones (15 of 703, 2%; RR 0.36; 95% CI 0.20 to 0.65). NTT with probiotics to prevent one case of necrotising enterocolitis was 25 (95% CI 17 to 50). The risk of death was reduced in the probiotic group (RR 0.47; 95% CI 0.30 to 0.73) and the number needed to treat to prevent one death due to all causes by treatment with probiotics was 20 (95% CI 12 to 50).⁵⁴

The time to reach full feeds was also significantly shorter in the probiotic group than in controls. The risk of sepsis was not found to be different in the two groups. Sepsis caused by the specific organisms in the probiotic supplement was not reported in any of the trials included in this analysis. However, the dose, duration, and type of probiotic agents (species, strain, single or combined) used for supplementation are still to be defined.⁵⁴

Very recently, a Cochrane investigation evaluated efficacy and safety of some probiotics, namely *LGG*, *Bifidobacterium species*,

S. boulardii and a mix of two to three species of probiotics (*L acidophilus-B infantis*, and *Lactobacillus bifidus-Streptococcus thermophilus-Bifidobacterium infantis*), vs placebo or no treatment. The primary outcomes were: prevention of severe NEC (stage II or more) as per Bell criteria (Bell 1978; Walsh 1986), diagnosed prior to discharge, nosocomial sepsis, defined as positive blood or cerebrospinal fluid cultures taken beyond 5 days of age. Nine randomized studies were taken into consideration, for a total of 1 425 prematures of gestational age <37 weeks and weighing <2 500 g at birth (from 1966 to December 2006). Infants treated with probiotics were 717 (335 of whom with *LGG*) and controls were 708.⁵⁵

The meta-analysis of these studies showed that administration of probiotics significantly lowered the incidence of serious NEC (stage II or more) and death rate. A significant reduction was not found, instead, of sepsis in hospital environments an effect of probiotics on the number of days on TPN (total parenteral nutrition), hospitalization days and weight gain or apnea.

However, it was not possible to achieve any reliable data concerning extremely low birth weight infants (ELBW). The studies taken into consideration did not report any systemic infections secondary to the administration of probiotics.⁵⁵

Summing up, despite the variability between probiotics tested, start, dose and duration of treatment, participant groups, enteral supplementation of probiotics reduce the risk of severe NEC and mortality in preterm infants >1 000 g and potential health benefits attributed to some probiotics, has been confirmed in well-designed, well-conducted, randomized, controlled trials.^{51, 52, 54, 55} Therefore there is an evidence level I (as reported in the National Guideline Plan 2004), but a further understanding of the pathogenesis of NEC and the mechanisms by which probiotics prevent it may lead to evidence-based treatment strategies. These analysis support a change in practice in premature infants >1 000 g at birth and ask to investigate with a large randomized controlled trial the potential benefits and safety profile of probiotics supplementation in

ELBW infants.^{47, 49, 52, 54, 55}

Conclusions

Accumulating evidence indicates that the establishment and maintenance of a well-balanced gut microbiota, important component of the gut barrier, is essential for a healthy intestinal mucosa and contribute to reduce the risk of many diseases.

In this view, the rationale of probiotics, cultures of live microorganisms characteristic of the healthy gut microbiota with species-specific and strain-specific beneficial and therapeutic potentials, is to restore a physiological equilibrium of microbiota, occupies intestinal mucosal sites, inhibits the attachment and growth of pathogenic organisms by competitive exclusion, elaborates antimicrobial substances, provide a microbial stimulus for the host immune system and contribute to the anti-inflammatory tone of the intestinal milieu.

Despite the considerable progress made by research in the knowledge of probiotics, many data are still only in a preliminary phase, particularly in humans, although a large number of probiotic strains have been included in many food products. As a matter of fact, for the various types of probiotics, which have different characteristics and properties, mechanisms of action, interactions with epithelial cells of the intestinal mucosa, immune response, the possible associations with other substances (zinc, prebiotics), the optimal time of therapy onset and doses necessary to get the best therapeutic effect still have to be defined.

Lactic acid bacteria such as *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*, have been tried in many double-blinded, randomized, placebo-controlled studies, several well-conducted meta-analyses are now available and current evidence is more convincing for probiotics' efficacy in prevention and treatment.

Although the way of clinical trials has been started, due to which studies on probiotics have left behind the approximate and empiric nature they used to have, their quality has increased considerably and, although there

are valid conceptual premises for probiotics to be helpful their usefulness, even when it is statistically significant, does not seem to date to be such as to suggest their routine use in the various pathological conditions mentioned above.⁵⁶

However, there are grounds to believe that as more scientific evidence occurs, there also may be opportunities to develop these products as drugs by the FDA.⁵⁷

Some further and larger-scale controlled studies are necessary and, in order to get in shorter times suitable replies to the above-mentioned issue, they should be carried out using the best-known and most promising probiotics, that is those which resulted in the best evidence, such as *LGG*, at suitable doses, distinguishing subjects according to their age (infants, first, second and third infancy), starting the therapy as early as possible and suitably evaluating therapy doses and duration.

In daily practice probiotics, such as *LGG* and *S. boulardii*, are indicated in children and infants undergoing prolonged antibiotic therapy, especially if they manifest recurrent infections, in the treatment of infectious diarrhea (*Rotavirus*).

References

1. Giovannini M, Agostoni C, Riva E, Salvini F, Ruscitto A, Zuccotti GV *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. *Felicita Study Group. Pediatr Res* 2007;62:215-20.
2. Zuccotti GV, Meneghin F, Raimondi C, *et al.* Probiotics in clinical practice: an overview. *J Int Med Res* 2008; 36(Suppl 1):1A-53A.
3. Guslandi M. A natural approach to treatment of inflammatory bowel disease. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65: 468-9.
4. Metchnikoff E. *The Prolongation of life. Optimistic studies.* London; William Heinemann; 1907. Oxford: Putman and sons; 1908. p. 1-38.
5. Damaskos D, Kolios G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora on the scope. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65:453-67.
6. Goldin BR, Gorbach SL. Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin Infect Dis* 2008;46(Suppl 2):S96-100.
7. Tankanow RM, Ross MB, Ertel IJ, Dickinson DG, McCormick LS, Garfinkel JF. A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP* 1990;24:382-4.

8. Johnston BC, Supina AL, Vohra S. Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *CMAJ* 2006;175:377-83.
9. Ansaldi F, Lai P, Valle L, Riente R, Durando P, Sticchi L *et al*. Burden of rotavirus-associated and non-rotavirus-associated diarrhea among nonhospitalized individuals in central Italy: a 1-year sentinel-based epidemiological and virological surveillance. *Clin Infect Dis* 2008;46:e51-5.
10. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-9.
11. Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoekstra H *et al*. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:54-60.
12. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002;109:678-84.
13. Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ. Efficacy of probiotics use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2002; 47:2635-34.
14. Allen S, Okoko B, Martinez E, Gregorio G. Probiotics for treating infectious diarrhoea Cochrane Review. In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2004.
15. Szymafski H, Pejcz J, Jawief M, Chmielarczyk A, Strus M, Heczko PB. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosus strains--a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:247-53.
16. Szymanski H, Chmielarczyk A, Strus M, Pejcz J, *et al*. Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic L. rhamnosus strains in acute diarrhoea in children. *Dig Liver Dis* 2006;38(Suppl 2):S274-6.
17. Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:454-75.
18. Szajewska H, Skórka A, Ruszczyfski M, Gieruszczak-Białk Tek D. Meta-analysis: Lactobacillus GG for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:871-81.
19. Szajewska H. Probiotics and prebiotics in pediatrics: where are we now? *Turk J Pediatr* 2007;49:231-44.
20. Canani RB, Cirillo P, Terrin G, Cesarano L, Spagnuolo MI, De Vincenzo A *et al*. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. *BMJ* 2007;335:340.
21. Salvatore S, Hauser B, Devreker T, Vieira MC, Luini C, Arrigo S *et al*. Probiotics and zinc in acute infectious gastroenteritis in children: are they effective? *Nutrition* 2007;23:498-506.
22. Lemberg DA, Ooi CY, Day AS. Probiotics in paediatric gastrointestinal diseases. *J Paediatr Child Health* 2007;43:331-6.
23. Pham M, Lemberg DA, Day AS. Probiotics: sorting the evidence from the myths. *Med J Aust* 2008;188:304-8.
24. Khaled A, Ahmad F, Brogan T, *et al*. Prescription medicine use by one million Canadian children. *Paediatr Child Health* 2003;8(Suppl A):43A-5A
25. Goossens H, Ferech M, Coenen S, Stephens P. Comparison of outpatient systemic antibacterial use in 2004 in the United States and 27 European countries. European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Group. *Clin Infect Dis* 2007;44:1091-5.
26. Wiström J, Norrby SR, Myhre EB, Eriksson S, Granström G, Lagergren L *et al*. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:43-50.
27. La Rosa M, Bottaro G, Gulino N, Gambuzza F, Di Forti F, Ini G *et al*. Prevention of antibiotic-associated diarrhea with Lactobacillus sporogens and fructo-oligosaccharides in children: a multicentric double-blind vs placebo study. *Minerva Pediatr* 2003;55:447-52.
28. Turck D, Bernet JP, Marx J, Kempf H, Giard P, Walbaum O *et al*. Incidence and risk factors for oral antibiotic associated diarrhea in an outpatient pediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:22-6.
29. McFarland LV. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis* 1998;16:292-307.
30. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhea: meta-analysis. *BMJ* 2002;324:1361-7.
31. Johnston BC, Supina AL, Ospina M, Vohra S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;2:CD004827.
32. Szajewska H, Ruszczyfski M, Radzikowski A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2006;149:367-72.
33. Giesemann T, Egerer M, Jank T, Aktories K. Processing of Clostridium difficile toxins. *J Med Microbiol* 2008;57:690-6.
34. Barbut F, Gariazzo B, Bonné L, Lalande V, Burghoffer B, Luiuz R *et al*. Clinical features of Clostridium difficile-associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000-2004. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:131-9.
35. Elliott B, Chang BJ, Golledge CL, Riley TV. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Intern Med J* 2007;37:561-8.
36. Du T, Alfa MJ. Translocation of Clostridium difficile toxin B across polarized Caco-2 cell monolayers is enhanced by toxin A. *Can J Infect Dis* 2004;15:83-8.
37. Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME *et al*. The search for a better treatment for recurrent Clostridium difficile disease: use of high-dose vancomycin combined with Saccharomyces boulardii. *Clin Infect Dis* 2000;31:1012-7.
38. Surawicz CM. Treatment of recurrent Clostridium difficile-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1:32-8.
39. Katz JA. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:249-55.
40. Langley JM, LeBlanc JC, Hanakowski M, Goloubeva O. The role of Clostridium difficile and viruses as causes of nosocomial diarrhea in children. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:660-4.
41. Ouz F, Uysal G, Dafldemir S, Oskovi H, Vidinlanis S. The role of Clostridium difficile in childhood nosocomial diarrhea. *Scand J Infect Dis* 2001;33:731-3.
42. Morinville V, McDonald J. Clostridium difficile-associated diarrhea in 200 Canadian children. *Can J Gastroenterol* 2005;19:497-501.
43. Benson L, Song X, Campos J, Singh N. Changing epidemiology of Clostridium difficile-associated disease in children. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:1233-5.
44. McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of Clostridium difficile disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:812-22.
45. Segarra-Newnham M. Probiotics for Clostridium difficile-associated diarrhea: focus on Lactobacillus rhamnosus GG and Saccharomyces boulardii. *Ann Pharmacother* 2007;41:1212-21.

46. Pelleschi ME. Clostridium difficile-Associated Disease: Diagnosis, Prevention, Treatment, and Nursing Care. Crit Care Nurse 2008;28:27-35.
47. Martin CR, Walker WA. Probiotics: role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterocolitis. Semin Perinatol 2008;32:127-37.
48. Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. Semin Perinatol 2008;32:70-82.
49. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C *et al.* Oral supplementation with Lactobacillus casei subspecies rhamnosus prevents enteric colonization by Candida species in preterm neonates: a randomized study. Clin Infect Dis 2006;15:1735-42.
50. Hunter CJ, Upperman JS, Ford HR, Camerini V. Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis (NEC). Pediatr Res 2008;63:117-23.
51. Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. Biol Neonate 2002;82:103-8.
52. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M *et al.* Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. J Pediatr 2005;147:192-6.
53. Barclay AR, Stenson B, Simpson JH, Weaver LT, Wilson DC. Probiotics for necrotizing enterocolitis: a systematic review. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007;45:569-76.
54. Deshpande G, Rao S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. Lancet 2007;369:1614-20.
55. Alfaleh K, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev 2008;CD005496.
56. Elmer GM, McFarland LV. Properties of evidence-based probiotics for human health. In: Goklepe I, Juneja V, editors. Probiotics in food safety and human health.

Metchnikoff e il centenario dei probiotici: up date del loro impiego nella patologia gastroenterica in età evolutiva

I probiotici nelle patologie gastroenteriche

La gastroenterite acuta, la diarrea da antibiotici, la diarrea da *Clostridium difficile* e quella del viaggiatore, l'infezione da *Helicobacter pylori* e le malattie infiammatorie intestinali, sono condizioni patologiche nelle quali si verificano alterazioni della mucosa e del microbiota intestinali, primitive e/o secondarie: queste patologie hanno da sempre attratto l'attenzione di ricercatori e medici stimolando molti, alla luce dell'evoluzione delle conoscenze, a porvi rimedio cercando di ristabilire e/o riequilibrare il normale transito e la flora intestinale¹⁻³.

La "batterioterapia orale" ha avuto origine cento anni fa quando Elia Metchnikoff (1845-1916), premio Nobel della Medicina nel 1908 per gli studi sulla fagocitosi, aveva constatato che l'alimento base di alcune popolazioni di pastori molto longeve del Caucaso e della Bulgaria, la cui vita media, in base ai rapporti dell'epoca, era di 87 anni contro i 48 degli statunitensi, era il latte fermentato per l'azione di due microrganismi, il *Lactobacillus Bulgaricus* e lo *Streptococcus thermophilus*. Dopo lunghi studi, nel suo libro "The prolongation of life. Optimistic studies" (1907 e 1908) aveva pertanto sostenuto che la longevità era dovuta ai batteri lattici attivi contro la putrefazione e l'invecchiamento⁴. Questo ha dato l'avvio dapprima alla commercializzazione di un latte fermentato il "Lactobacilline", poi dello "yogurt" e, successivamente al concetto di probiotico, dal greco "pro-bios" a favore della vita. L'iniziale "batterioterapia orale", usata per decenni nella prevenzione e

terapia delle gastroenteriti nell'età evolutiva e nell'adulto, è così mutata, evolvendosi nel corso di un secolo e, gli attuali probiotici, per l'elevato livello di evidenze, stanno assumendo una veste scientifica significativa^{3, 5, 6}. Tutto ciò ci ha indotto a verificare lo stato attuale delle conoscenze alla luce delle più recenti acquisizioni.

Diarrea acuta infettiva

Nei Paesi più industrializzati, fino a 50 anni fa, la condizione morbosa di gran lunga più frequente in età evolutiva a carico dell'apparato digerente era la gastroenterite acuta infettiva definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come emissione di feci liquide in numero superiore a 3 nelle 24 ore, anche se in età pediatrica alcuni autori riducono tuttavia il numero di emissioni a 1-3 nelle 24-48 ore. Questo rende spesso difficile confrontare la casistica e valutare, in indagini multicentriche, i risultati dei vari presidi terapeutici messi in atto^{7, 8}.

Tale patologia, divenuta oggi una patologia minore in quanto i casi fatali sono del tutto eccezionali, è determinata da agenti virali per circa il 70%, quali *Rotavirus*, responsabili del 30-45% di tutte le diarreie virali, *Calicivirus*, incluso il virus di Norwalk, *Adenovirus* enterici sierotipi 40 e 41, e gli *Astrovirus*. Non vanno poi dimenticate le diarreie causate da batteri (*Campylobacter jejuni*, principale causa di malattia diarroica negli USA nell'adulto, *Salmonelle*, *Shigelle*, *Escherichia coli* enteropatogeni, *Jersinia enterocoli-*

tica), e quelle da parassiti (in particolare la *Giardia lamblia*).

Nonostante ciò, la diarrea infettiva rappresenta ancora un'importante causa di morbidità, in particolare l'infezione da *Rotavirus*, nei primi due anni di vita, che arreca annualmente un elevato costo sociale ed è fonte di ansia per le famiglie dei bambini affetti⁹. Negli Stati Uniti si calcola che il costo medio per un singolo episodio di diarrea acuta a gestione ambulatoriale è di circa 300 dollari, la metà dei quali dovuti ai giorni di lavoro persi dai genitori. È quindi chiaro l'enorme impatto sui costi sanitari e il motivo per tentare di porvi rimedio facendo ricorso ai probiotici¹⁰.

Uno studio multicentrico randomizzato in doppio cieco verso placebo su 287 bambini di età compresa fra 1 mese e 2 anni, affetti da diarrea causata da agenti patogeni diversi, (39 da *Rotavirus*, 5 da *Adenovirus*, 9 da *Salmonella enteritidis* o da *Escherichia coli* enteropatogeni) ha evidenziato che la somministrazione del *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG), alla dose di 10^{10} unità formanti colonie (*colony forming units*, cfu) unitamente a soluzione reidratante, è statisticamente efficace nel ridurre la durata della diarrea, in particolare quella da *Rotavirus*. Anche il tempo di ospedalizzazione è stato ridotto e le diarree più durature sono state rilevate nei soggetti che non assumevano LGG anche se i valori non sono risultati statisticamente significativi¹¹.

Una metanalisi che ha incluso nove studi clinici randomizzati in doppio cieco verso placebo (765 bambini di età compresa tra 1 mese e 3 anni) dimostra che i probiotici del genere *Lactobacillus*, (4 tra cui LGG), sono in grado di abbreviare la durata della diarrea di 0,7 giorni (da *Rotavirus* 0,8 giorni; da tutti i vari patogeni 0,5 giorni) e diminuire il numero delle scariche giornaliere (-1,6 in seconda giornata di trattamento). L'indagine ha inoltre evidenziato che i risultati migliori nella riduzione della durata della diarrea si ottengono con dosi elevate di *Lactobacillus* pari a 10^{10} - 10^{11} cfu, somministrato per due o più volte al giorno, con conseguente colonizzazione intestinale che impedisce l'azione dei vari patogeni¹².

In un'altra metanalisi di 18 studi su soggetti di età inferiore a 5 anni, i probiotici, associati alla soluzione reidratante gluco-salina standard, hanno ridotto il decorso della diarrea di circa 1 giorno rispetto ai vari trattamenti di controllo anche nei soggetti ospedalizzati¹³.

Una metanalisi della Cochrane ha raccolto i risultati di 23 studi controllati, randomizzati verso placebo (alcuni dei quali già presenti nelle due precedenti metanalisi), realizzati in diversi paesi su 1 449 bambini con diarrea di origine infettiva¹⁴. Il trattamento con vari probiotici (somministrati in un'ampia gamma di dosaggi) è in grado di abbreviare la durata media della diarrea di 1,3 giorni rispetto al placebo o a nessun trattamento: gli autori ritengono quindi che i probiotici costituiscano un'utile aggiunta alla terapia reidratante nelle diarree del bambino e dell'adulto¹⁴.

Uno studio clinico randomizzato in doppio cieco verso placebo su 87 bambini di età compresa fra 2 mesi e 6 anni, affetti da diarrea causata da agenti patogeni diversi, (39 da *Rotavirus*, 5 da *Adenovirus*, 9 da *Salmonella enteritidis* o da *Escherichia coli* enteropatogeni) ha evidenziato che la somministrazione di LGG alla dose di $1,2 \times 10^{10}$ cfu due volte al dì per 5 giorni, è statisticamente efficace nel ridurre il tempo di reidratazione dei soggetti con diarrea da *Rotavirus*. La durata della diarrea è stata ridotta solo nei soggetti affetti da *Rotavirus*. La riduzione della durata era statisticamente significativa, in particolare nei soggetti di età inferiore a 12 mesi, se la terapia era iniziata entro le 72 ore dalla comparsa della diarrea. La colonizzazione dell'intestino con LGG è stata evidenziata con metodo molecolare nell'80% dei bambini trattati dopo il V giorno di terapia e nel 41% dopo 14 giorni dalla fine della cura^{15,16}.

Simili risultati sono stati riportati in una revisione della letteratura e sono stati ottenuti da una più recente metanalisi, con l'uso del solo LGG^{17,18}. L'indagine, condotta valutando otto studi clinici randomizzati verso placebo per un totale di 988 partecipanti, di età compresa fra 1 e 36 mesi, 494 nel gruppo di studio e 494 nel gruppo controllo, ha evidenziato che la somministrazione di 10^9 - 10^{11} cfu di LGG, 1-3 volte al dì, riduce la durata della diarrea da *Rotavirus* e lievemente quella da agenti infettivi non identificati ma non influenza quella da enteropatogeni invasivi. LGG riduce il rischio di diarrea della durata superiore a sette giorni e riduce la durata dell'ospedalizzazione anche se in maniera modesta¹⁹. Non vi è stata invece una riduzione del numero delle scariche alvine che è considerato dall'OMS l'indice ottimale per valutare l'effetto terapeutico nel controllo della diarrea acuta.

Alcuni pediatri italiani hanno condotto un trial controllato randomizzato in singolo cieco della durata di 12 mesi in collaborazione con i pediatri di famiglia i quali, nel sistema sanitario italiano, si occupano dei bambini fino all'età di 12-14 anni. Cinquecentosettantuno bambini di età compresa tra 3 e 36 mesi, visitati dal pediatra per una diarrea acuta da leggera a moderata, sono stati randomizzati per ricevere la somministrazione della sola soluzione reidratante orale o, come controllo, di uno dei cinque preparati probiotici (LGG, *S. boulardii*, *Bacillus clausii*, mix di *L. delbrueckii* var *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* o *E. faecium* ceppo SF68) per cinque giorni come trattamento della diarrea acuta (definita come tre o più evacuazioni con feci molli o liquide al giorno). Lo studio comprendeva tutti bambini con una diarrea in corso da meno di 48 ore. I risultati primari riguardavano la durata della diarrea, il numero giornaliero delle evacuazioni e la consistenza delle feci; i risultati secondari si riferivano invece alla durata di vomito e febbre, tasso di ospedalizzazione, sicurezza e tolleranza²⁰.

La durata complessiva della diarrea, le evacuazioni quotidiane e la consistenza delle feci si sono rive-

late significativamente inferiori ($P < 0,001$) nei bambini cui era stato somministrato il solo *LGG* e in quelli che ricevevano il mix di batteri (*L delbrueckii var bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*) rispetto ai pazienti sottoposti alla sola terapia reidratante. Nessuna delle misurazioni dei risultati secondari valutate nei bambini cui erano stati somministrati i preparati probiotici aveva subito un cambiamento significativo ²⁰.

È stata inoltre rilevata una maggiore efficacia terapeutica della somministrazione di *LGG* o *Saccharomyces boulardii* se usati nella fase iniziale della malattia e in dosi elevate mentre nella terapia reidratante orale l'associazione con zinco, migliora notevolmente il decorso della patologia ²¹.

In conclusione, da quanto ora riportato, indipendentemente dalle diverse definizioni di diarrea e dalla variabilità tra i diversi probiotici testati in termini di inizio, dosaggio e durata del trattamento e gruppi partecipanti, i potenziali benefici sulla salute attribuiti ad alcuni probiotici, dal momento che i microrganismi probiotici non sono equivalenti, sono stati confermati in studi ben progettati, ben condotti, randomizzati e controllati. Questo è particolarmente vero nella popolazione pediatrica e le revisioni hanno concluso che i probiotici, associati a una terapia reidratante standard, riducono la durata della diarrea acuta.

Vi è pertanto un'evidenza di livello I (come riportato nel Piano Nazionale Linee Guida 2004) a favore dell'uso dei probiotici nel trattamento della diarrea acuta infettiva ^{1, 15, 18-20, 22, 23}.

LGG in dosi non inferiori a 10^{10} cfu al giorno per cinque giorni è il ceppo probiotico più studiato ed efficace per il trattamento di questa condizione e sembra essere particolarmente efficace se somministrato precocemente nel corso della patologia in caso di diarrea liquida e gastroenterite virale, soprattutto se da *Rotavirus*, la causa più comune di diarrea grave nei bambini di tutto il mondo, ma non per la diarrea batterica invasiva. I risultati sono statisticamente significativi ma da un punto di vista clinico la terapia reidratante orale (ORS) permane il presidio terapeutico più efficace per il miglioramento del decorso della gastroenterite acuta. Non si può tuttavia non considerare il risparmio economico che, in ambito di medicina preventiva, il più rapido riequilibrio della flora intestinale, ottenuto con la somministrazione di probiotici quali *LGG* insieme alla ORS, potrebbe rivelarsi utile nel prevenire processi infiammatori cronici del grosso intestino ad espressione nelle età successive, dato che, solo per quanto riguarda il morbo di Crohn, almeno il 25% di tale condizione morbosa inizia in età evolutiva.

Diarrea da antibiotici

Secondo recenti dati statistici condotti su 1 000 000 di bambini canadesi, fra i 20 farmaci più prescritti 14 sono antibiotici e il 76% dei soggetti presi in

esame (cioè 760 000) avevano avuto almeno una prescrizione di antibiotici ²⁴. L'uso degli antibiotici nell'assistenza primaria è cambiato considerevolmente in Europa. Il tasso d'uso più elevato si riscontra in Francia e soltanto 3 dei 27 paesi europei vi ricorrono più degli Stati Uniti ²⁵.

Questi dati indicano l'enorme uso di tali farmaci con i ben noti effetti positivi ma anche con i possibili effetti collaterali. Fra questi ultimi va ricordata l'alterazione della microflora intestinale che favorisce lo sviluppo di microrganismi patogeni e può dar luogo a flogosi della mucosa intestinale e a turbe gastroenteriche fra cui la diarrea, evento verificabile fino a due mesi dalla sospensione della terapia. I bambini che assumono antibiotici a largo spettro, in particolare la clindamicina ma anche penicilline e cefalosporine, vanno incontro a una diarrea con una frequenza che oscilla fra l'11-62%. Tale complicanza si verifica più facilmente nei soggetti ripetutamente sottoposti a terapie antibiotiche, ospedalizzati e/o immunodepressi, ed è particolarmente grave quando si associa a una infezione da *C. difficile* ²⁶⁻²⁸. Va inoltre rilevato che il 26-50% delle diarree da antibiotici vengono attribuite al *C. difficile* mentre un altro 10-20% a batteri o virus e il rimanente è di eziologia sconosciuta ²⁹.

Una metanalisi di nove studi (1 214 pazienti) sulla diarrea da antibiotici (*antibiotic-associated diarrhea*, AAD), nel periodo 1966-2000, due dei quali condotti in età pediatrica, i probiotici, assunti contemporaneamente a una terapia antibiotica, sono più efficaci del placebo nel diminuire la frequenza della diarrea indotta da antibiotici (10% contro 22%). In termini pratici, espressi come *number needed to treat* (NNT), significa che bisogna trattare otto persone con un probiotico per prevenire una diarrea ³⁰. Va però segnalato che l'eterogeneità delle situazioni cliniche nei singoli studi limita la possibilità di trarre conclusioni definitive. I nove studi presentano, inoltre, differenze sostanziali per ciò che riguarda i probiotici utilizzati (*Lattobacilli* soli, compreso *LGG*, o in associazione, *Enterococcus faecium* SF68, e il lievito *Saccharomyces boulardii*), i dosaggi, la frequenza delle somministrazioni (da 2 a 4 volte al giorno), la durata del trattamento (da 5 a 49 giorni), gli antibiotici coinvolti e il tempo di inizio della loro somministrazione.

Viene pertanto sostenuta la necessità di ulteriori studi a conferma del beneficio clinico dei probiotici. L'uso di *LGG* ha dato i miglior risultati preventivi in quanto, come riportato dagli autori, produce sostanze antimicrobiche che inibiscono *Escherichia coli*, *Streptococchi*, *C. difficile*, *Bacteroides fragili* e *Salmonelle* ³⁰.

Una metanalisi condotta secondo i criteri della Cochrane, per valutare gli effetti avversi e l'efficacia di probiotici per la prevenzione della AAD, ha preso in esame sei studi clinici randomizzati verso placebo o nessuna terapia, due dei quali trattati con *LGG* per un totale di 307 soggetti, ed eseguiti fino al gennaio

2005. Un totale di 707 bambini, di età compresa fra 2 settimane e 15 anni (408 sottoposti a trattamento e 428 come controllo per un totale di 707 dopo i casi persi al follow-up), è stato coinvolto nello studio e sono stati trattati con probiotici dall'inizio alla fine della terapia antibiotica (7-14 giorni). L'analisi "Per Protocol", cioè solo dei soggetti del gruppo che hanno effettivamente rispettato il protocollo, ha evidenziato che la somministrazione di probiotici ha determinato una riduzione del rischio di diarrea associata alla terapia antibiotica rispetto al placebo [rischio relativo (RR): 0,43; 95% CI da 0,25 a 0,75] e che il numero dei soggetti che devono essere trattati per prevenire un caso di diarrea (NNT) era di sei pazienti. L'analisi *intention to treat* (ITT), che comprende anche i casi sfuggiti al trattamento ma che avrebbero dovuto essere trattati, ha dato dei valori non significativi. Va tuttavia rilevato, come indicato dagli autori di questa revisione, che la validità dell'analisi ITT non è robusta se i tassi di perdita al follow-up sono elevati. Gli autori perciò concludono che, a causa di molte variabili (tipi e dosi dei probiotici, feci diverse per numero e consistenza in rapporto all'età dei soggetti) e alcune lacune, sono necessari ulteriori e più approfonditi studi con quei probiotici che hanno dimostrato a tutt'oggi i migliori risultati (*LGG*, *L. sporogenes* o *S. boulardii*), e in dosi adeguate ($5-40 \times 10^9$ cfu)³¹.

Una metanalisi di sei studi clinici randomizzati controllati verso placebo per un totale di 766 bambini, per verificare l'azione preventiva dei probiotici sull'AAD, ha evidenziato una riduzione dei casi di diarrea, durante la contemporanea somministrazione di probiotici, variabile dal 28,5% all'11,9% (RR 0,44; 95% CI da 0,25 a 0,77, modello ad effetti casuali). Tale indagine comprendeva due studi per un totale di 307 soggetti trattati con *LGG*³². Per ogni sette pazienti che sviluppano diarrea durante il trattamento antibiotico, sei svilupperanno la AAD se ricevono anche probiotici.

Una più recente metanalisi della Cochrane per valutare gli effetti avversi e l'efficacia di probiotici nel prevenire la AAD ha preso in esame 10 studi, per un totale di 1 946 soggetti di età compresa tra 0 e 18 anni, ai quali sono stati somministrati dei probiotici contemporaneamente agli antibiotici. I pazienti sono stati quindi controllati per un periodo che ha oscillato da 15 giorni a 3 mesi. L'analisi "Per Protocol", cioè l'analisi solo di quei pazienti che dovevano essere trattati e hanno rispettato il protocollo, ha evidenziato risultati statistici e clinici validi per la prevenzione della diarrea associata alla terapia antibiotica in particolare per *LGG*. Questo anche se vi era una eterogeneità di situazioni cliniche e vari erano i probiotici usati (*Lactobacilli spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, or *Saccharomyces boulardii*). Prendendo poi in considerazione l'analisi ITT, questa non è risultata statisticamente significativa (RR 0,90; 95% CI da 0,50 a 1,63, $I^2=92,9\%$). Cinque trial su dieci hanno cercato di individuare eventi avversi (N.=647); nessuno ha riportato eventi avversi gravi³¹.

In sintesi, in base ad alcuni studi più recenti anche negli adulti e secondo alcuni studiosi, vi sarebbe un'evidenza di livello I a favore dell'uso dei probiotici nel trattamento della AAD^{23, 31, 32}. Se invece si prendono in considerazione alcuni parametri statistici più sensibili (ITT), sarebbero opportune ulteriori indagini per cui il livello di evidenza, potrebbe essere messo in discussione^{22, 30, 31}.

I risultati ottenuti in particolare con *LGG*, il migliore per efficacia, e con il *Saccharomyces boulardii* anche se sotto alcuni aspetti statisticamente significativi, non risultano però tali da raccomandare sistematicamente la loro somministrazione. Va però rilevato che nei casi a rischio, come nei soggetti in cui vi è un ripetuto uso di antibiotici o in quelli in cui si verificano episodi diarroici dopo la somministrazione di antibiotici, il loro uso può essere giustificato. Questo nel tentativo di prevenire processi infiammatori della mucosa intestinale in età evolutiva che, non raramente possono sfociare, anche in età successive, in malattie infiammatorie croniche del grosso intestino (colon irritabile, colite ulcerosa, pouchite, morbo di Crohn). La prevenzione di un numero anche limitato di AAD, potrebbe pertanto dar luogo a vantaggi notevoli per la salute del paziente ed economici per la famiglia ed il servizio sanitario.

Diarrea da *Clostridium difficile*

La malattia diarroica da *Clostridium difficile* (*Clostridium difficile diarrhoea*, CDD) è determinata solo da ceppi di *C. difficile* produttori di due potenti tossine: A e B. La tossina A svolge una lieve attività citotossica e provoca danno alle mucose, infiammazione e secrezioni intestinali³³⁻³⁵. La tossina B è una delle più potenti citotossine conosciute e determina perdita di potassio intracellulare, inibizione della sintesi proteica e degli acidi nucleici. Si è ipotizzato che l'invasione delle tossine A e/o B da *C. difficile* dalla mucosa dell'intestino, dove esse hanno un ruolo nei danni da infiammazione, è la base del CDD e dei sintomi sistemici shock-like osservati nei casi gravi di questa infezione.

Il *C. difficile* viene di solito ingerito come spora che sopravvive all'ambiente acido dello stomaco e si converte nella forma vegetativa nel colon. È stimato che il 50% o più dei neonati vengano colonizzati con *C. difficile* tossinogenico ma, per cause non accertate, sono asintomatici e refrattari alla colite pseudomembranosa anche nel caso in cui presentino una elevata carica di ceppi tossinogenici: di solito il bambino diventa suscettibile dopo i 5 anni. Nell'adulto è presente in bassa percentuale nel grosso intestino e può fare parte della normale flora intestinale^{34, 35}.

Nelle diverse età si possono pertanto avere dei portatori asintomatici, soggetti con lieve sindrome diarroica, febbre (30-50% dei pazienti), leucocitosi (50-60%), dolori addominali o crampi (20-33%); sono stati descritti anche nausea, malessere, anoressia,

ipoalbuminemia, presenza di sangue occulto nelle feci, disidratazione, o colite pseudomembranosa o altre gravi manifestazioni intestinali come megacolon tossico, perforazione, shock tossico con elevata mortalità³⁴.

In ambiente ospedaliero la contaminazione ambientale (arredo, pavimenti) e del personale (soprattutto mani), è particolarmente pericolosa e insidiosa. Nell'ambiente il *C. difficile* può persistere per mesi essendo sporigeno e le patologie che determina incidono notevolmente sull'aumento dei costi del servizio sanitario per la degenza e le cure a domicilio.

Il *C. difficile* è la causa principale della diarrea da antibiotici e della colite nosocomiali (CDAD). È stato indicato come responsabile di una percentuale compresa dal 10% al 20% di tutti i casi di diarrea da antibiotici, del 60% delle coliti da antibiotici e di quasi tutti i casi di colite pseudomembranosa. Il *C. difficile* è in grado di crescere in modo abnorme nell'intestino dei pazienti la cui normale microflora è stata compromessa da farmaci antimicrobici o antineoplastici³⁶.

Fattori favorevoli la comparsa della malattia sono pertanto: esposizione in ambiente inquinato, colonizzazione da parte del *C. difficile* dell'intestino, alterazione della flora microbica intestinale prevalentemente per terapia antibiotica ad ampio spettro (beta-lattamine e clindamicina), riduzione delle difese immunitarie per cause diverse.

I probiotici usati in associazione con gli antibiotici vancomicina e metronidazolo, per curare e prevenire le recidive della malattia da *C. difficile* e il *Saccharomyces boulardii* (1 g/die per 28 giorni) avevano dimostrato un certo risultato^{37, 38}. Tale riscontro è stato confermato anche recentemente da una rassegna della letteratura in età pediatrica e nell'adulto evidenziando anche un importante ruolo del *S. boulardii* nella diarrea ricorrente da *C. difficile*³⁹.

In un ospedale pediatrico delle province marittime del Canada nel periodo 1991-1999, il 32% delle diarree nosocomiali era determinata dal *C. difficile* e il restante da *Rotavirus* (31%), *Adenovirus* (30%) e solo il 7% da altri virus evidenziando così che il *C. difficile* era la principale causa di diarrea nosocomiale⁴⁰.

A conferma di ciò, in un'indagine condotta in un ospedale pediatrico turco, la diarrea da *C. difficile* è stata evidenziata nel 16% delle diarree nosocomiali durante il trattamento antibiotico di bambini di età compresa fra 2 mesi e 13 anni (media 5,4 anni) con un rapporto maschi-femmine 1:2⁴¹.

Un'indagine condotta su 200 soggetti in età pediatrica (età media 5,4 anni, periodo 2000-2003) per valutare il rischio di diarrea da *C. difficile* in seguito alla terapia antibiotica e l'esito delle terapie che prevedevano anche l'uso di probiotici ha evidenziato una percentuale elevata di diarree da antibiotici (74,5%) e da precedenti ospedalizzazioni (55,5%). Modesto è risultato l'effetto dei probiotici⁴².

Un'altra indagine più recente sull'epidemiologia

della diarrea da *C. difficile* nel periodo 2001-2006 negli USA ha rilevato un aumento dal 46% al 64% della frequenza di tale infezione contratta dai bambini in comunità⁴³. È inoltre noto che la diarrea da *C. difficile* in età pediatrica è la complicanza più grave in corso di antibioticotera, soprattutto negli individui immunodepressi, nei trapiantati, nei soggetti in trattamento con chemioterapici⁴².

Tali dati evidenziano non solo il notevole aumento dell'infezione in età pediatrica ma anche il grande rischio di contrarre l'infezione in seguito a terapie antibiotiche, soprattutto se protratte e in ambiente ospedaliero.

Nel 2006 sono stati riportati i risultati di una meta-analisi, molto verosimilmente la più vasta fino a tale data, su 31 studi clinici randomizzati in doppio cieco nel periodo 1977-2005. Per verificare l'efficacia dei probiotici (*S. boulardii*, *LGG*, e una miscela di vari probiotici) nella prevenzione della diarrea determinata dall'assunzione di antibiotici (25 studi) e nel trattamento della malattia da *C. difficile* (6 studi)⁴⁴. Nei 25 studi, per un totale di 2 810 soggetti in terapia antibiotica, di cui il 64% adulti e il 36% bambini, la terapia ha determinato una riduzione del rischio della malattia associata all'uso degli antibiotici, (RR 0,43; 95% CI da 0,31 a 0,58, P<0,001). Dei nove studi che hanno coinvolto i bambini, 817 soggetti sono stati trattati con *LGG* a una dose media di 1×10^{10} cfu e 6 sono risultati statisticamente efficaci. Le dosi quotidiane di probiotici variavano da 1×10^7 a 1×10^{11} , con una media di 3×10^9 . L'uso di una dose elevata ($\geq 10^{10}$ /giorno) di probiotici era associata a un'efficacia significativa contro la AAD. Inoltre, la durata del trattamento con probiotici variava considerevolmente da 5 giorni a 8 settimane (con una media di 2 settimane).

Dei sei studi clinici valutati per l'infezione da *C. difficile*, tutti soggetti adulti, cinque riguardavano il trattamento della malattia e solo uno la prevenzione. Nonostante il numero limitato di trial, il rischio relativo complessivo da questa meta-analisi ha evidenziato una efficacia significativa del trattamento associato antibiotici/probiotici della malattia da *C. difficile* (RR 0,59; 95% CI da 0,41 a 0,85, P=0,005). Le dosi quotidiane di probiotici variavano da 2×10^{10} a 6×10^{11} , con una dose quotidiana media di 5×10^{10} . La durata del trattamento probiotico inoltre variava da tre a cinque settimane, con una media di tre settimane. Il numero dei trial era troppo piccolo per permettere di determinare la presenza di un effetto dose-risposta o durata-risposta.

I probiotici che si sono dimostrati efficaci nella prevenzione dell'AAD sono stati *LGG* e *S. boulardii* ma per la riduzione delle ricorrenze della CDD il migliore è risultato il *S. boulardii*⁴⁴.

Questa meta-analisi suggerisce che i probiotici sono in grado di ridurre in modo significativo l'incidenza della AAD e che rappresentano un trattamento efficace contro la CDD. Gli studi futuri consentiranno di espandere le tipologie dei probiotici testati e di considera-

re con attenzione la più adeguata preparazione dello studio e le problematiche attinenti al dimensionamento dei campioni.

Studi successivi e una metanalisi hanno mostrato che *LGG* o *S. boulardii* possono essere di aiuto nel trattamento o nella prevenzione delle ricorrenze di CDAD sostituendo la normale flora gastrica. Gli studi valutati non hanno riportato casi di fungemia o batteriemia associati all'uso di probiotici, ma le diverse definizioni di CDAD ricorrente, le diverse dosi di probiotici e l'eterogeneità degli studi rendono difficile raccomandare in modo definitivo la terapia probiotica come integrazione della terapia antibiotica nella prevenzione della diarrea e/o colite da *C. difficile* e sostenere l'uso dei soli probiotici nel trattamento della colite da *C. difficile*⁴⁵.

In conclusione, *LGG* e *S. boulardii* sono i ceppi di probiotici più studiati in relazione a questa condizione patologica. Poiché a tutt'oggi sembra che siano state ottenute delle prove di evidenza da un solo studio di disegno adeguato, per la prevenzione e per la terapia, in particolare negli adulti, il livello di evidenza a favore dell'uso dei probiotici nel trattamento della CDD è di tipo II.

Per quanto siano generalmente sicuri e ben tollerati, *S. boulardii* e *LGG* dovrebbero essere usati con cautela nei pazienti immunocompromessi. Mancano ancora dati sufficienti per supportare l'uso di altri preparati probiotici in queste condizioni. Sono necessari a tal riguardo ulteriori studi sui probiotici, compresi trial di grande portata, con un disegno adeguato, randomizzati, controllati e a dosaggio differenziato, trial comparativi e analisi costi-benefici^{23, 44-46}.

Enterocolite necrotizzante

L'enterocolite necrotizzante (*necrotising enterocolitis*, NEC) è una condizione patologica infiammatoria dell'intestino con un'incidenza da 1 a 3/1 000 nati vivi. È alquanto frequente nei prematuri, e porta a morte il 10-30% di quelli con peso inferiore a 1 500 grammi e il 20-40% dei casi che richiedono un intervento chirurgico. Le cause della malattia non sono ancora completamente note, ma sembrano essere multifattoriali e sono rappresentate da ridotta esposizione alla microflora materna ed eccessiva esposizione a quella tipica dei reparti di terapia intensiva neonatale (NICU) (*Staphylococchi*, *Enterobacteriae*, *Enterococchi*, *Candida spp*), utilizzazione di alimento sterile, largo uso di antibiotici. Tutto ciò coinvolge la colonizzazione batterica intestinale, che risulta completamente diversa da quella del neonato allattato al seno, e le difese dell'intestino con il ruolo dell'ecosistema intestinale nel modulare immunità e infiammazione. Secondo alcuni, il quadro sarebbe scatenato dall'alimentazione e in particolare dal lattosio che, al suo arrivo nell'intestino del bambino prematuro, darebbe luogo a fenomeni di fermentazione in eccesso, favoriti da una flora batterica particolare e

diversa da quella normale, e a un'eccessiva proliferazione dei microrganismi a livello intestinale. Questi scatenerrebbero una forte reazione infiammatoria, che può portare alla necrosi della mucosa intestinale fino alla perforazione dell'intestino e, quindi alla necessità di un intervento chirurgico d'urgenza a volte anche demolitore^{47, 48}.

In tale ambito i probiotici, svolgendo un'azione competitiva nei confronti di batteri e miceti patogeni, promuovendo i meccanismi di maturazione dell'intestino, favorendo una adeguata risposta immune e, prevenendo la colonizzazione batterica e micotica e la loro migrazione attraverso la mucosa intestinale, possono svolgere un'azione profilattica, in particolare *LGG*^{49, 50}.

Uno studio multicentrico, randomizzato e a doppio cieco realizzato in 12 Unità di Terapia Intensiva Neonatale italiane, uno dei primi studi consistenti, ben disegnati, ben condotti e controllati in materia, è stato condotto su 495 neonati con un'età stazionale <33 settimane o un peso alla nascita <1 500 g, per controllare se i probiotici, riducendo gli agenti patogeni nell'intestino dei bambini prematuri, possano contribuire alla riduzione dell'incidenza delle infezioni nosocomiali (infezioni del tratto urinario [ITU], sepsi batterica e NEC). Cinquecentottantacinque neonati sono stati randomizzati al fine di ricevere latte standard arricchito con *LGG* (N.=295), con una dose di 6×10^9 cfu, una volta al giorno fino all'evacuazione, cominciando con il primo pasto, o placebo (N.=290). Si è osservato che le infezioni del tratto urinario (3,4% vs 5,8%) e l'enterocolite necrotizzante (1,4% vs 2,7%) erano meno frequenti nel gruppo trattato con probiotici rispetto al gruppo di controllo, per quanto le differenze non possono dirsi statisticamente significative⁵¹.

Dopo alcune esperienze molto positive sui ratti, per valutare l'ipotesi che i probiotici, normalizzando la flora intestinale, riducono l'incidenza e la gravità dell'enterite necrotizzante, un altro studio è stato condotto, nel periodo 2001-2004, in 145 prematuri di peso inferiore a 1 500 g. Di questi, 72 sono stati trattati con una miscela di vari probiotici (*Bifidobacteria infantis*, *Streptococcus thermophilus*, and *Bifidobacteria bifidus*; [Solgar, Israel]), alla dose di 10^9 cfu al giorno fino al raggiungimento della XXXVI settimana dal concepimento, e 73 sono stati tenuti come controllo⁵².

L'incidenza della NEC si presentava ridotta nel gruppo di studio (4% vs 16,4%; P=0,03; RR 0,25; 95% CI da 0,075 a 0,86). La NEC appariva meno grave nei neonati supplementati con probiotici (Criterio di Bell $2,3 \pm 0,5$ vs $1,3 \pm 0,5$; P=0,005). Confrontando l'incidenza combinata della NEC e/o la mortalità, significativamente, risultava colpito un numero maggiore di neonati appartenenti al gruppo di controllo (17/73) rispetto al gruppo di studio (6/72) (P=0,025; RR 0,358; 95% CI da 0,150 a 0,856).

Dei 15 neonati che avevano sviluppato la NEC tre morirono e tutte le morti da NEC si produssero nei bambini appartenenti al gruppo di controllo. E tali dati

molto evidenti hanno così confermato l'ipotesi che la supplementazione probiotica riduceva tanto l'incidenza che la gravità della NEC nella popolazione neonatale prematura ⁵².

Un altro tentativo di verificare l'efficacia e la sicurezza dei probiotici nel modificare la flora batterica intestinale del neonato e prevenire l'eventuale comparsa e gravità della NEC, è stato fatto da Barclay *et al.*, i quali hanno condotto una metanalisi su cinque studi clinici randomizzati verso controllo in soggetti pretermine di età gestazionale <33 settimane e di peso molto basso (very low birth weight [VLBW] <1 500 g), per un totale 1 267 di cui 640 trattati e 627 controllo. Gli studi hanno criteri di registrazione e pratiche di somministrazione differenti. Inoltre, l'eterogeneità dei probiotici usati, le modalità di somministrazione ed il dosaggio, che devono essere ancora stabiliti, non hanno permesso di trarre delle indicazioni definitive ma tutti gli studi hanno evidenziato, nel gruppo trattato di soggetti VLBW, una minor frequenza della NEC e una riduzione della mortalità. Questi studi considerano un numero di neonati insufficiente a garantire il raggiungimento di un valore statistico dei risultati sulla mortalità generale. Nessuno degli studi ha evidenziato alcun evento avverso attribuibile ai probiotici ⁵³.

Un'altra revisione di studi clinici randomizzati controllati è stata anche condotta per valutare efficacia e sicurezza della somministrazione di probiotici iniziata nei primi 10 giorni di vita e durata sette o più giorni nel prevenire la NEC (stadio 2 o superiore) nei pretermine VLBW <1 500 g di gestazione <33 settimane (dal novembre 1980 al 2006). La metanalisi dei sette studi clinici randomizzati e controllati (per un totale di 1 393 pretermine 605 dei quali coinvolti nello studio con *LGG*), eseguita secondo la strategia della Cochrane Neonatal Review Group, ha evidenziato un più basso rischio di NEC nel gruppo trattato con probiotici (38 di 690, 6%) rispetto a quelli non trattati (15 di 703, 2%; RR 0,36; 95% CI da 0,20 a 0,65). L'NNT con probiotici per prevenire un caso di enterocolite necrotizzante era 25 (95% CI da 17 a 50). Il rischio di morte risultava ridotto nel gruppo trattato con probiotici (RR 0,47; 95% CI da 0,30 a 0,73) e il numero da trattare per prevenire una morte attribuibile a qualunque causa mediante trattamento con probiotici era 20 (95% CI da 12 a 50) ⁵⁴.

Anche il tempo per raggiungere risultati pieni si è dimostrato significativamente più breve nel gruppo trattato con probiotici rispetto al gruppo di controllo. Il rischio di sepsi non è risultato diverso nei due gruppi. La sepsi causata dagli organismi specifici nel supplemento probiotico non è stata osservata in nessuno dei trial compresi nell'analisi. Rimane però sempre da stabilire la dose, la durata e il tipo di agenti probiotici (specie, ceppo, singolo o combinato) usati per la supplementazione ⁵⁴.

Del tutto recentemente una indagine della Cochrane ha valutato efficacia e sicurezza di alcuni probiotici *LGG*, *Bifidobacterium species*, *S. bouardii*

e una miscela di due delle tre specie di probiotici (*L acidophilus* - *B infantis*, and *Lactobacillus bifidus-streptococcus thermophilus-bifidobacterium infantis*), vs placebo o nessun trattamento. I risultati primari erano: prevenzione delle NEC severe (stadio II o superiore) secondo i criteri di Bell (Bell 1978; Walsh 1986), diagnosi prima dell'evacuazione, sepsi nosocomiale definita come colture di sangue o di fluido cerebrospinale positive prese oltre 5 giorni di età. Sono stati presi in esame nove studi randomizzati per un totale di 1 425 prematuri con età gestazionale < a 37 settimane e di peso <2 500 g alla nascita (periodo dal 1966 fino a dicembre 2006). I neonati trattati con probiotici erano 717 (dei quali 335 con *LGG*) e quelli di controllo 708 ⁵⁵.

La metanalisi degli studi ha evidenziato che la somministrazione dei probiotici ha ridotto significativamente l'incidenza delle NEC severe (stadio II o più) e la mortalità. Non è stata invece evidenziata una riduzione significativa delle sepsi nosocomiali, alcun effetto dei probiotici nel numero di giorni di nutrizione parenterale totale o nei giorni di ricovero in ospedale, aumento di peso o apnea.

Non è stato però possibile ottenere dei dati attendibili per quanto riguarda i neonati di peso estremamente basso (*extremely low birth weight infants*, ELBW). Gli studi presi in esame non hanno riportato infezioni sistemiche secondarie alla somministrazione dei probiotici ⁵⁵.

In sintesi, nonostante le differenze tra i probiotici testati in termini di inizio, dose e durata del trattamento e gruppi partecipanti, la supplementazione enterale di probiotici riduce il rischio di NEC grave e la mortalità nei neonati prematuri con peso >1 000 g e i potenziali benefici sulla salute attribuiti ad alcuni probiotici sono stati confermati in trial ben disegnati, ben condotti, randomizzati e controllati ^{51, 52, 54, 55}. Vi è pertanto un livello di evidenza I (come riportato nel Piano Nazionale Linee Guida 2004) ma una maggiore comprensione della patogenesi della NEC e dei meccanismi per mezzo dei quali i probiotici sono in grado di prevenirla potranno portare ad elaborare strategie di trattamento basate sull'evidenza. Questa analisi supporta un cambiamento verificatosi nel trattamento dei neonati prematuri di peso >1 000 g alla nascita ed è un invito a realizzare un trial randomizzato e controllato di ampio respiro per indagare sui potenziali benefici e sul profilo di sicurezza della supplementazione di probiotici nei neonati ELBW ^{47, 49, 52, 54, 55}.

Conclusioni

Le prove raccolte mostrano che la costruzione e il mantenimento di un equilibrato microbiota intestinale, un componente essenziale della barriera intestinale, è indispensabile per una mucosa intestinale sana e contribuisce a ridurre il rischio di contrarre diverse malattie.

In quest'ottica, lo scopo dei probiotici, colture di microrganismi vivi caratteristici di un microbiota intestinale sano e con potenzialità benefiche e terapeutiche specie-specifiche e ceppo-specifiche, è quello di restaurare l'equilibrio fisiologico del microbiota. Essi occupano i siti mucosali dell'intestino, inibiscono l'attecchimento e la crescita di organismi patogeni mediante esclusione competitiva, elaborano sostanze antimicrobiche, forniscono uno stimolo microbico al sistema immunitario ospite e contribuiscono al tono antinfiammatorio dell'ambiente intestinale.

A dispetto di notevoli progressi nella ricerca sul ruolo di probiotici, molti dati sono ancora solamente preliminari, in particolare nell'uomo, anche se numerosi ceppi probiotici sono inseriti in molti prodotti alimentari. Devono infatti essere ancora chiariti, per i vari tipi di probiotici, che hanno caratteristiche e proprietà differenti, i meccanismi d'azione, le interazioni con le cellule epiteliali della mucosa intestinale, la risposta immune, l'eventuale associazione con altre sostanze (zinco, prebiotici), il tempo ottimale di inizio della terapia e le dosi necessarie per ottenere il migliore risultato terapeutico.

I *LAB* come i *Lactobacilli* e i *Bifidobatteri* sono stati testati in molti studi a doppio cieco, randomizzati, placebo controllati. Sono attualmente disponibili diverse metanalisi ben condotte e le prove attuali circa l'efficacia dei probiotici nella prevenzione e nel trattamento sono convincenti.

Nonostante sia stata intrapresa la strada dei clinical trial, per cui gli studi sui probiotici, abbandonando approssimazione ed empirismo del passato, hanno fatto un salto di qualità importante, e nonostante ci siano valide premesse concettuali a favore dei probiotici la loro utilità, quand'anche statisticamente significativa, non appare oggi tale da consigliare l'uso routinario nelle diverse condizioni patologiche su riportate ⁵⁶.

Vi sono però fondati motivi per ritenere che col presentarsi di nuove prove scientifiche, potranno sorgere anche nuove opportunità per sviluppare questi

prodotti come farmaci da parte della Food and Drug Administration ⁵⁷.

Sono pertanto necessari ulteriori studi controllati di maggiori dimensioni e, per ottenere più rapidamente risposte adeguate alle molteplici problematiche su riportate, dovrebbero essere condotti utilizzando i probiotici più conosciuti e promettenti, cioè quelli che hanno dimostrato le migliori evidenze, come *LGG*, in dosi adeguate distinguendo i soggetti per le varie età (lattanti, prima, seconda e terza infanzia), iniziando la terapia il più precoce possibile e valutando adeguatamente le dosi e la durata della terapia.

Nella pratica quotidiana i probiotici, come *LGG* e *S. boulardii*, sono indicati nei bambini e nei lattanti sottoposti a terapia antibiotica prolungata, specialmente se manifestano infezioni ricorrenti e nel trattamento delle diarree infettive (*Rotavirus*).

Riassunto

La gastroenterite acuta, la diarrea da antibiotici, la diarrea da *Clostridium difficile* e quella del viaggiatore, l'infezione da *Helicobacter pylori* e le malattie infiammatorie intestinali, sono condizioni patologiche nelle quali si verificano alterazioni della mucosa e del microbiota intestinali. Per molti anni i ricercatori si sono dedicati alla ricerca di soluzioni per porvi rimedio cercando di ristabilire e/o riequilibrare il normale transito e la flora intestinale. Elia Metchnikoff per primo introdusse il concetto di batterioterapia orale, che sfrutta l'azione di due microrganismi attivi contro la putrefazione e l'invecchiamento. Nel corso di un secolo la batterioterapia orale è mutata, evolvendosi ed è stata soppiantata dagli attuali probiotici, la cui azione è utile per prevenire e curare le patologie gastroenteriche è attualmente oggetto di studi e approfondimenti.

Parole chiave: Gastroenteriti - Diarrea - *Lactobacillus* - Probiotici.

