

RIAP

immunologia
pediatrica
rivista
Allergologia



Organo Ufficiale della Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Pediatrica

Direttore Editoriale e Scientifico
Alessandro Fiocchi

Comitato di Redazione

Mario Canciano Canciani, Lamia Dahdah, Ahmad Kantar,
Massimo Landi, Alberto Martelli, Caterina Rizzo

Direttore Responsabile

Patrizia Alma Pacini

Segreteria Scientifica

Manuela Moncada

Editore

Pacini Editore S.p.A. - Via Gherardesca - 56121 Pisa

Copyright by

Società Italiana di Allergologia ed Immunologia Pediatrica



CONSIGLIO DIRETTIVO SIAIP

Presidente

Roberto Bernardini

Vice Presidente

Giampaolo Ricci

Tesoriere

Giovanni Pajno

Consiglieri

Salvatore Barberi, Mauro Calvani, Gian Luigi Marseglia,
Umberto Pelosi

Revisori dei conti

Luigi Calzone, Nunzia Maiello

Supplemento 2

03

giugno 2013 • anno XXVII



Congress Report

**Influenza della composizione
del microbiota sulla salute del bambino:
dal laboratorio all'ambulatorio**

Sommario

**L'ecosistema intestinale nel bambino:
dalla composizione alla fisiologia**

1

Anna Maria Castellazzi

**Malattie intestinali pediatriche:
dai meccanismi di resistenza alle infezioni,
alla patologia**

4

Dario Dilillo, Gian Vincenzo Zuccotti

**Ceppi, agonismo, sinergia:
dal laboratorio all'ambulatorio**

8

Lorenzo Drago

**Bifidobatteri in medicina pediatrica:
prevenzione e trattamento**

10

Annamaria Staiano

Congress Report

Influenza della composizione del microbiota sulla salute del bambino: dal laboratorio all'ambulatorio

L'ecosistema intestinale nel bambino: dalla composizione alla fisiologia

Anna Maria Castellazzi

Centro Interuniversitario di Immunità e Nutrizione
Università degli Studi di Pavia
Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgico, Diagnostiche e Pediatriche, Unità di Pediatria
Fondazione Policlinico S. Matteo, Pavia

Il termine "microbiota" ha sostituito il termine "microflora": esso è considerato l'organo negletto del corpo umano e attualmente è oggetto di ricerche avanzate con risultati pubblicati su riviste prestigiose. Si può effettivamente parlare di organo riferendosi all'ecosistema intestinale, tanto che recentemente in un articolo apparso sul *New England Journal of Medicine* si è discusso della possibilità di effettuare un "trapianto di feci" da bambini sani nelle patologie infiammatorie intestinali resistenti alle comuni terapie. Sono già partiti due grandi progetti sul sequenziamento sistematico del DNA del microbiota sano, uno statunitense (*Human microbiome project*, HMP) e uno europeo (*Metagenomics of human intestine*, meta-HIT). In uno studio comparso su *Nature* nel 2010 sono state descritte circa 1000 specie batteriche nei 124 individui esaminati, pari a circa 160 specie per ognuno. Ogni individuo ha una sua "impronta digitale batterica" che lo identifica, anche se esiste un core di almeno 57 specie batteriche comuni a tutti gli individui. I due *phyla* dominanti sono i *Bacteroides* e i *Firmicutes*, che rappresentano circa il 90% delle categorie filogenetiche presenti nella parte distale dell'organismo umano. I geni più frequentemente isolati sono quelli che codificano per le molecole di adesione alle proteine dell'ospite (collagene, fibrinogeno, fibronectina) e per

gli enzimi coinvolti nella fermentazione degli zuccheri; va notato che il 15% delle sequenze determinate codifica per proteine con funzione non nota.

I microrganismi sono stati sempre presenti nell'intestino attraverso tutta l'evoluzione dell'uomo, a testimoniare il ruolo significativo di questa stretta relazione tra l'ambiente umano e l'ambiente microbico. Questo connubio porta a descrivere l'essere umano come un "metaorganismo" derivato da millenni di coevoluzione con il proprio microbiota intestinale. Nell'ecosistema intestinale giocano un ruolo, oltre al microbiota, la mucosa intestinale, il sistema immune della mucosa e le cellule neuroendocrine.

Il vantaggio biologico della presenza di un microbiota particolarmente ricco a livello gastrointestinale sono almeno di due tipi: 1) vantaggi di tipo nutrizionale (il genoma microbico può contenere informazioni codificate che non sono state sviluppate nell'uomo durante l'evoluzione, il microbiota può immagazzinare energia da polisaccaridi introdotti con la dieta e non digeribili dall'uomo, oltre a regolare la produzione di vitamine del gruppo B e K e acidi grassi a corta catena); 2) vantaggi nei meccanismi di difesa (resistenza alla colonizzazione da parte di potenziali patogeni, degradazione di xeno-biotici, stimolazione delle cellule dell'immunità innata e acquisita). Il ruolo del microbiota nella resistenza alla colonizzazione batterica è stato individuato già nel 1916 da Nissle nella resistenza alle infezioni tifoidi da *Salmonella*: in effetti, il microbiota intestinale rappresenta la prima barriera di difesa contro l'invasione da parte di batteri patogeni. Per quanto riguarda la produzione di acidi grassi a corta catena, essi sono metaboliti finali dei processi fermentativi primari e secondari e svolgono importanti funzioni nella fisiologia umana: l'acido acetico a livello muscolare, cardiaco e cerebrale, l'acido propionico nella gluconeogenesi, l'acido butirrico è un eccellente nutriente per

gli enterociti. La produzione di vitamine del gruppo B e della vitamina K è un bell'esempio di mutualismo fra procarioti ed eucarioti; peraltro la presenza di geni per la sintesi di vitamine è una costante nei genomi del core del microbiota. In alcuni individui vi sono specie batteriche contenenti geni in grado di sintetizzare enzimi per la degradazione di composti xeno-biotici, tra cui composti aromatici alogenati (diossine).

La funzione fondamentale consiste nell'interazione sinergica del microbiota intestinale con l'epitelio intestinale e il sistema immune associato alle mucose al fine di assicurare l'ottimale funzionalità del sistema immune intestinale. In effetti il feto ha una bassa esposizione agli antigeni in utero, per cui alla nascita il sistema immune del neonato è naïf; nei primi giorni di vita vi sono modificazioni della flora batterica, per cui l'intestino, che alla nascita è sterile, viene colonizzato già dopo 48 ore da *E. coli* e streptococchi della flora fecale materna e dopo 2-4 giorni, a seconda del tipo di alimentazione (latte materno o artificiale) viene arricchito da altri batteri, come bifidobatteri, *Bacteroides* e clostridi. Il tipo di colonizzazione dipende dal tipo di parto, dalla maturazione della mucosa intestinale, dalla presenza di promotori o inibitori di crescita nel meconio e da fattori esogeni come la dieta (tipo di allattamento). Allo svezzamento i cambiamenti nella flora intestinale sono strettamente correlati con i cambiamenti dietetici, con un andamento caratteristico. Le cellule del sistema immune delle mucose intestinali (sia innato che acquisito) sono localizzate a livello delle placche del Peyer, dell'epitelio intestinale e della lamina propria. Le placche di Peyer rappresentano il sito induttivo della risposta immune: gli antigeni della dieta e quelli dei batteri rappresentano lo stimolo per la risposta immune. I linfociti intraepiteliali (IEL) aumentano di numero di circa 10 volte nei primi 1-2 anni dopo la nascita, sotto l'influenza dello stimolo antigenico. Esistono due fenotipi di linfociti T (IEL), con funzioni diverse: i $\gamma\delta$ TCR, che proliferano nel duodeno e sono coinvolti nell'induzione e nel mantenimento della tolleranza alle proteine alimentari, e gli $\alpha\beta$ TCR, che sono più abbondanti nel colon, sono profondamente influenzati dalla presenza della microflora e agiscono contro i batteri patogeni del colon. È stato dimostrato recentemente che tra i linfociti intraepiteliali è presente anche una popolazione CD101+ e CD103+, che è attivata dal contatto con il ligando gp180 presente sulle cellule epiteliali e ha funzioni soppressive sulla risposta immune infiammatoria; questa sottopopolazione è deficitaria nei modelli animali di IBD.

La lamina propria alla nascita è ben strutturata e ha una scarsa cellularità; i linfociti T hanno un fenotipo CD4+, mentre le cellule che secernono IgA secretorie compaiono dopo la nascita. Le IgA secretorie sono in grado di attraversare l'epitelio intestinale e bloccare i patogeni a livello del lume intestinale. Le IgA proteggono la mucosa impedendo l'adesione e la traslocazione microbica, interferiscono con la moltiplicazione virale, neutralizzano le tossine. Le due sottoclassi, IgA1 e IgA2, sembrano svilupparsi in tempi differenti e rispondere a differenti stimoli antigenici; infatti nel digiuno-ileo sono presenti per lo più IgA1 (che riconoscono soprattutto antigeni proteici), mentre nel colon sono prodotte prevalentemente IgA2 (che riconoscono soprattutto antigeni polisaccaridici). Le IgA secretorie hanno la capacità di agglutinare diversi batteri già alla prima esposizione, sono importanti per l'adesione batterica alla mucosa e possono essere in grado di evitare la penetrazione della flora residente all'interno della mucosa. La colonizzazione progressiva dell'intestino da parte di diversi batteri è responsabile della presenza di anticorpi naturali del tipo IgA secretorie. Va tenuto presente che il neonato ha prevalentemente un profilo Th2, che lo aiuta ad essere tollerato dalla madre durante la vita fetale, ma differenti stimoli antigenici lo portano ad acquisire una tolleranza verso antigeni non pericolosi (es. alimentari) e a raggiungere un profilo bilanciato Th1/Th2. Durante il primo periodo postnatale l'esposizione agli antigeni è un prerequisito fondamentale per promuovere l'espansione del sistema immune. Infatti, come per il sistema nervoso, lo sviluppo del sistema immune è basato sull'esperienza e la risposta agli antigeni innesca e determina il tipo di risposta immune funzionale. Gli antigeni alimentari, così come la microflora endogena, hanno un effetto stimolatorio sui linfociti B intestinali. Nell'intestino il sistema immune deve riconoscere la flora batterica e gli antigeni alimentari senza originare una risposta attiva e controproducente e al tempo stesso deve rispondere ai microrganismi patogeni in modo efficace e reattivo. Il tessuto linfatico dell'intestino (GALT) assolve a queste due funzioni con la produzione di IgA secretorie e attraverso meccanismi regolatori, che inducono la soppressione della risposta immune locale e periferica e permettono la tolleranza verso antigeni ambientali presenti nell'intestino.

La tolleranza orale, ovvero lo stato di mancata risposta immunologica sistemica indotto da una prima somministrazione orale dell'antigene e da una successiva esposizione sistemica allo stesso, dipende da diver-

VARIAZIONE DEL MICROBIOTA AL VARIARE DELL'ETÀ

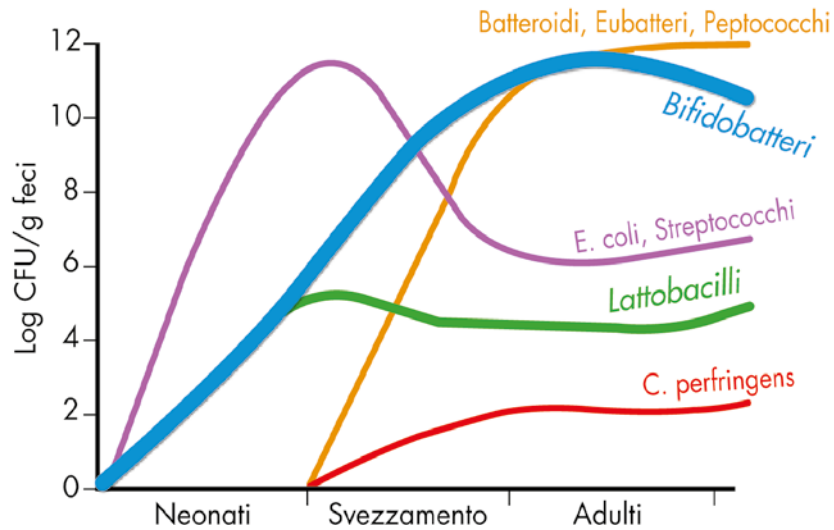


Fig. 1. (da Mitsuoka e Hayakawa, mod.).

se variabili: età, dose, periodo di somministrazione postnatale, struttura antigenica e composizione della proteina alimentare, integrità della barriera epiteliale, microflora intestinale. La microflora intestinale è importante sia per l'induzione che per la ricostituzione della tolleranza dopo la sua abrogazione sperimentale. L'induzione della tolleranza orale è particolarmente importante al fine di evitare reazioni di ipersensibilità verso antigeni alimentari. Questo stato di tolleranza potrebbe stabilirsi attraverso la microflora intestinale indigena.

Una colonizzazione batterica non corretta è associata al rischio di sviluppare patologie, ad esempio: la colonizzazione con *E. coli* e *C. difficile* è associata ad eczema e dermatite atopica; bambini allergici hanno meno Bifidobatteri e più *S. aureus* (Fig. 1).

Soggetti obesi hanno una microflora con una maggiore concentrazione di *Firmicutes* e un rapporto sbilanciato tra *Firmicutes* e *Bacteroides* (da 3:1 a 35:1).

I neonati prematuri sono una popolazione a rischio per lo sviluppo di una microflora alterata per:

- la ritardata colonizzazione del tratto gastroenterico
- la ridotta diversità microbica
- l'aumentato numero di batteri potenzialmente patogeni
- la ridotta colonizzazione con Bifidobatteri

In questo senso, il progetto futuro che ci proponiamo di sviluppare comprende lo studio, in neonati pretermine e/o basso peso alla nascita, del profilo del microbiota, del livello di IgA secretorie fecali e di calprotectina prima e dopo la somministrazione di un prodotto composto da tre bifidobatteri, per comprendere come i bifidobatteri possano influenzare la composizione del microbiota e lo sviluppo dell'immunità mucosale e come possano interferire con i processi infiammatori.

Malattie intestinali pediatriche: dai meccanismi di resistenza alle infezioni, alla patologia

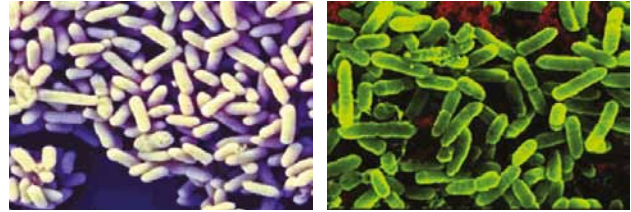
Dario Dilillo, Gian Vincenzo Zuccotti

Clinica Pediatrica AO Luigi Sacco,
Università degli Studi di Milano

La mucosa intestinale è la superficie più ampia dell'organismo in contatto con l'ambiente esterno (200-300 m²) ed è un complesso ecosistema rappresentato dall'epitelio intestinale, dalle cellule immunitarie e dal microbiota residente. L'epitelio intestinale costituisce una barriera fisica all'ingresso dei microrganismi tramite i complessi giunzionali intercellulari; inoltre esso crea una barriera chimica tramite la produzione di muco, peptidi antimicrobici (defensine e catelecidine) e altre molecole come il lisozima prodotti dalle cellule di Paneth.

Nel tratto intestinale è presente un'alta densità di microrganismi, pari a 10¹¹-10¹² microbi/ml di contenuto luminale. Nel solo colon umano si stima che siano presenti più di 400 specie di batteri.

La distribuzione del microbiota nel tubo digerente è caratterizzata da un progressivo aumento dei batteri anaerobi in direzione oro-fecale: i batteri anaerobi sono assenti nello stomaco e sono invece prevalenti nel colon distale, dove costituiscono il 99% della flora intestinale. La maggior parte del microbiota è costituita da anaerobi dei generi *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus* (presenti soprattutto nell'intestino crasso), mentre i batteri aerobi e anaerobi facoltativi come *Enterobacteriaceae* e *Lactobacillus* sono meno rappresentati. Le principali modifiche del microbiota si verificano nel primo anno di vita, successivamente la sua composizione è paragonabile a quella dell'adulto. I meccanismi di difesa da patogeni messi in atto dal microbiota, in particolare da lactobacilli e bifidobatteri, comprendono: l'adesione all'epitelio intestinale; l'inibizione dell'adesione dei batteri patogeni attraverso l'aumento della produzione di muco intestinale, l'ingombro sterico dei recettori dei patogeni e la competizione per il legame agli stessi recettori intestinali; la produzione di perossido di idrogeno, di acidi, di biosurfattante e di molecole antimicrobiche; l'immunomodulazione. I diversi meccanismi antimicrobici sono ceppo-specifici e non possono essere generalizzati a tutti i ceppi. L'adesione



all'epitelio intestinale avviene tramite legami elettrostatici, legami idrofobici e specifiche strutture come l'acido lipoteicoico, strutture proteiche *lectin-like* e l'acido ribitol-teicoico. L'aumento della produzione di muco dipende dall'aumento dell'espressione di mucine intestinali quali MUC2 e MUC3. Studi *in vitro* hanno dimostrato come numerosi lattobacilli siano in grado di inibire la crescita dei batteri patogeni attraverso la produzione di acido acetico, acido lattico e perossido di idrogeno. Un'altra categoria di molecole antimicrobiche prodotte dal microbiota è costituita da batteriocine, che sono peptidi di sintesi ribosomiale prodotti da alcuni ceppi di lattobacilli e bifidobatteri, che lisano la membrana dei batteri Gram+: tra le batteriocine vi sono le microcine (proteine a basso peso molecolare, < 10 kDa, prodotte dalle *Enterobacteriaceae*, che si legano ai recettori presenti sulla membrana esterna penetrando all'interno del batterio; interferiscono con le attività enzimatiche o destabilizzano la struttura della membrana interna, determinando morte cellulare) e le colicine (proteine di dimensioni maggiori, da 25 a 80 kDa, sempre prodotte dalle *Enterobacteriaceae*; si legano anch'esse a recettori presenti sulla membrana esterna dei batteri target, determinando la morte attraverso la formazione di canali voltaggio-dipendenti nella membrana interna o esplicando la loro attività endonucleasica sul genoma del batterio). Inoltre, studi *in vitro* dimostrano che ceppi di lattobacilli e bifidobatteri producono una serie di molecole antimicrobiche non classificabili come batteriocine. Il microbiota ha un ruolo importante nello sviluppo e nella regolazione sia dell'immunità innata che di quella acquisita, regolando lo sviluppo delle cellule T e B (Tab. I). Sempre maggiori evidenze dimostrano come il microbiota svolga un ruolo importante nel mantenere un buono stato di salute nell'organismo e come una sua alterazione sia correlata a patologia. Un esempio è costituito dalla malattia celiaca, che come sappiamo è un disordine infiammatorio cronico del piccolo intestino causato dalla perdita di tolleranza verso alcune proteine del grano (gliadine) e verso prolamine correlate (contenute in orzo e segale) in soggetti geneticamente predisposti. È caratterizzata da un'abnorme

Tab. I. Ruolo dei segnali microbici nello sviluppo e nella regolazione del funzionamento delle cellule dell'immunità adattativa (da Hill e Artis, mod.).

Parametro	Evidenza da animali <i>germ-free</i> rispetto a quelli allevati in maniera convenzionale	Evidenza da animali trattati con antibiotici	Evidenza da animali <i>ex germ-free</i>
Sviluppo e funzione delle cellule B	<ul style="list-style-type: none"> • Ridotta produzione di IgA nell'intestino tenue • Riduzione dei centri germinativi e delle plasmacellule • Bassi livelli di immunoglobuline sistemiche • Ridotta risposta IgM e IgG a DNP-BSA • Normale risposta IgM a eritrociti o fosforilcolina di pecora • Normale risposta IgM e IgG a DNP-lys-Ficoll • Ritardato o ridotto titolo anticorpale primario diretto contro <i>E. coli</i> ucciso con il calore • Aumentata risposta anticorpale contro ferritina e DNP-Ficoll • Aumento delle cellule B IgE positive nelle placche di Peyer 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento della risposta IgE causata dagli antibiotici 	<ul style="list-style-type: none"> • Ripristino delle IgA intestinali dopo convenzionalizzazione di animali <i>germ-free</i> • Ripristino dei centri germinativi sistemici e delle plasmacellule dopo convenzionalizzazione di animali <i>germ-free</i> • Ripristino del livello sistemico di immunoglobuline dopo convenzionalizzazione di animali <i>germ-free</i>
Regolazione e funzione delle cellule Th17/Treg	<ul style="list-style-type: none"> • Riduzione delle cellule Th17 nell'intestino tenue • Aumento delle cellule Th17 nell'intestino crasso • Riduzione dell'mRNA di Foxp3 nelle cellule T CD4+ da mLNs • Riduzione selettiva della percentuale di cellule T Foxp3+CD4+CD25+ nei mLNs • Proliferazione delle cellule T CD4+ non ben soppressa da Tregs derivanti da mLNs • Minore IL-10 prodotta da Tregs derivanti da mLNs; malattia non protetta da Tregs • Aumentata frequenza di CD4+Foxp3+ nell'intestino tenue • Frequenza simile di cellule T CD4+Foxp3+ della lamina propria del colon 	<ul style="list-style-type: none"> • Riduzione delle cellule Th17 nella lamina propria dell'intestino tenue dei topi trattati con vancomicina • Ridotta frequenza di cellule Th17 nei mLNs dei topi trattati 	<ul style="list-style-type: none"> • La monoassociazione di topi <i>germ-free</i> con <i>citofagi-flavobacter-bacteroides</i> ripara il difetto di cellule Th17

risposta infiammatoria verso tali peptidi da parte sia del sistema immunitario innato che adattativo e nella sua patogenesi sono implicati sia fattori genetici (aplotipi HLA di classe II, come DQ2 e DQ8) che ambientali (non solo il contatto con il glutine, ma anche l'epoca di introduzione del glutine durante il divezzamento, il tipo di allattamento e la durata dell'allattamento al seno, le infezioni gastrointestinali e la disbiosi). Un'analisi del microbiota duodenale in bambini con malattia celiaca ha dimostrato che i batteri Gram-, in particolare *Bacteroides* ed *E. coli* (potenzialmente proinfiammatori), sono significativamente più rappresentati nei bambini con celiachia in fase attiva rispetto

ai bambini in dieta priva di glutine e in controlli sani; inoltre il rapporto tra *Lactobacillus-Bifidobacterium* e *Bacteroides/Prevotella-E. coli* è risultato significativamente ridotto nei bambini con celiachia sia in fase attiva sia in dieta priva di glutine (in questo secondo gruppo in maniera meno marcata) rispetto ai controlli. In un altro studio sul rapporto tra disbiosi intestinale e malattia celiaca è stato dimostrato che il rapporto tra batteri Gram+ e Gram- è significativamente ridotto nei bambini affetti da celiachia (indipendentemente dalla dieta) rispetto ai controlli; inoltre i bifidobatteri sono significativamente meno rappresentati nei bambini con celiachia non trattata rispetto ai controlli. Un

altro studio ha dimostrato come la maggiore presenza di batteri Gram- nel microbiota dei celiaci determina un aumento delle citochine pro-infiammatorie, causando un maggior reclutamento di linfociti nella lamina propria e stimolando una risposta di tipo Th1; i bifidobatteri potrebbero quindi avere un ruolo nel limitare la risposta infiammatoria di tipo Th1 indotta dalla disbiosi dei soggetti celiaci. Studi *in vitro* e in topi *germ-free* hanno evidenziato come specifici ceppi di *Bifidobacterium* potrebbero avere un ruolo protettivo verso lo sviluppo della celiachia, attraverso diversi meccanismi: aumentano l'espressione delle *tight junctions* dell'epitelio intestinale, limitando il passaggio della gliadina nella lamina propria e riducendo quindi la successiva risposta infiammatoria; regolano gli effetti infiammatori della disbiosi intestinale attraverso l'induzione di citochine anti-infiammatorie come IL-10 o limitando la produzione di INF- γ ; aumentano il numero delle cellule mucipare, limitando il danno mucosale; contribuiscono all'idrolisi dei peptidi della gliadina, riducendone la loro tossicità.

Un altro campo di ricerca che si è sviluppato negli ultimi anni è la relazione tra il microbiota e la sindrome dell'intestino irritabile (IBS); gli studi in questo caso riguardano principalmente la popolazione adulta. Alcuni studi hanno preso in considerazione complessivamente la IBS, mentre altri hanno analizzato la composizione del microbiota distinguendo i vari sottotipi di IBS secondo i criteri di Roma, che si basano sul pattern predominante delle feci. Si è visto che vi è una diversa composizione del microbiota nei soggetti affetti da IBS rispetto ai controlli sani, anche se non è possibile identificare un pattern caratteristico. Sono pochi gli studi sulla IBS in età pediatrica, ma hanno evidenziato una differenza nella composizione del microbiota tra individui affetti da IBS e controlli sani. Studi sperimentali dimostrano come la disbiosi intestinale possa alterare la motilità intestinale e la percezione del dolore viscerale, attraverso un aumento della sostanza P nel plesso mioenterico e dell'attività mieloperossidasi tissutale. Nell'intestino dei pazienti con IBS vi è un'attivazione del sistema immune che determina un basso grado di infiammazione, con aumento dei linfociti intraepiteliali, delle mastcellule e delle cellule enterocromaffini nella mucosa intestinale e aumento della concentrazione delle β -defensine nelle feci. La disbiosi intestinale potrebbe avere un ruolo nel causare e mantenere questo basso grado di infiammazione responsabile delle disfunzioni intestinali e dei sintomi dei pazienti con IBS. Inoltre vi sono evidenze che la

disbiosi intestinale possa determinare i sintomi tipici della IBS (come dolore o *discomfort* addominale) attraverso una modifica della produzione di acidi grassi a corta catena (aumento della produzione di acido acetico e propionico) e che nei pazienti con IBS sia presente una disfunzione sensoriale e una scarsa tolleranza ad un moderato carico di gas, per cui i sintomi potrebbero dipendere da una ipersensibilità viscerale piuttosto che da una produzione abnorme di gas.

Una modificazione del microbiota e un'abnorme colonizzazione batterica, dovuta alla prematurità e alla conseguente immaturità dei meccanismi intestinali di difesa, è stata chiamata in causa anche nella patogenesi della enterocolite necrotizzante del neonato (NEC). In effetti i neonati prematuri, che nascono più frequentemente in seguito a un parto cesareo, tendono ad avere una prolungata permanenza in ospedale e un'esposizione precoce e prolungata ad antibiotici ad ampio spettro, hanno pattern di colonizzazione dell'intestino diversi da quelli del neonato a termine: le specie presenti sono ridotte in numero, le specie predominanti comprendono enterococchi, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, stafilococchi, streptococchi, *Clostridium* e *Bacteroides*, con un pattern simile a quello dei neonati a termine alimentati artificialmente; inoltre vi è una maggiore presenza delle specie patogene e una più lenta colonizzazione da parte di ceppi benefici come i bifidobatteri. Negli ultimi decenni alcuni studi hanno supportato il ruolo patogenetico di singole specie microbiche, in particolare dei Clostridi, suggerendo che la pneumatosi intestinale che si verifica in corso di NEC sia da associare alla capacità di tali specie di produrre gas. La presenza di questi batteri anche in neonati sani e la mancanza di conferma di queste associazioni da parte di altri studi dimostra che probabilmente non vi è un singolo patogeno responsabile della NEC, ma che ha un ruolo la disbiosi intestinale nella sua totalità.

Nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) l'ipotesi patogenetica principale è che vi sia un'alterata risposta infiammatoria e una perdita dei meccanismi di tolleranza verso il microbiota residente. Numerose evidenze sono a sostegno di questa ipotesi: nella colite ulcerosa l'infiammazione si sviluppa principalmente nei segmenti intestinali con maggiore concentrazione di batteri; il trattamento con antibiotici come metronidazolo e ciprofloxacina determina un miglioramento dei sintomi dei pazienti affetti da IBD; nei topi *germ-free* non si sviluppa un quadro di colite; è stata rilevata la presenza di anticorpi sierici diretti contro antigeni batterici in soggetti con IBD. Gli

studi sulla composizione del microbiota nei pazienti con IBD riguardano principalmente gli adulti: è stata dimostrata una riduzione di *Firmicutes* e *Bacteroides* (quest'ultimo dato non confermato in alcuni studi) e un aumento di *Proteobacteria* e *Actinobacteria* rispetto ai controlli. La minor abbondanza del phylum *Firmicutes* è dovuta alla riduzione della presenza di *Clostridium IXa* e *IV*. I *Clostridium* e *Bacteroides* sono i principali produttori degli acidi grassi a corta catena nel colon umano. In particolare, l'acido butirrico riduce l'espressione delle citochine pro-infiammatorie nella mucosa intestinale, fa aumentare le mucine e i peptidi antimicrobici così come le *tight junctions* nell'epitelio intestinale. In ultima analisi, la riduzione dei livelli di butirrato determina un aumento della risposta infiammatoria. Alcuni Autori hanno dimostrato una riduzione della presenza di *Faecalibacterium prausnitzii* (appartenente al gruppo di *clostridia IV*) nei pazienti adulti affetti da malattia di Crohn: studi *in vitro* e in modelli animali hanno dimostrato delle proprietà anti-infiammatorie e anti-colite del batterio, per cui una sua riduzione potrebbe contribuire direttamente all'insorgenza di infiammazione nell'intestino. Nei pazienti adulti con IBD, in particolare nella colite ulcerosa e paucite, è stato osservato un aumento dei batteri solfato-riducenti (classe delta-proteobacteria): tali batteri metabolizzano il solfato ad acido solfidrico, che ha una azione tossica sui colonociti, interferisce con l'utilizzo del butirrato e inibisce la fagocitosi e il killing dei batteri.

In conclusione, esiste una continua interazione bidirezionale tra ospite e microbiota intestinale che si esplica attraverso meccanismi ceppo-specifici in gran parte ancora sconosciuti.

Studi *in vitro* e *in vivo* evidenziano come il microbiota intestinale, in particolare i bifidobatteri e i lattobacilli, contribuisca alla difesa nei confronti dei patogeni. I principali meccanismi antimicrobici sono:

- l'inibizione dell'adesione dei batteri patogeni all'epitelio intestinale
- la produzione di sostanze antimicrobiche
- la promozione dello sviluppo e la modulazione del sistema immunitario

Studi condotti *in vitro* sia negli animali che nell'uomo hanno evidenziato un'associazione tra alcune malattie intestinali pediatriche (celiachia, IBS, NEC, IBD) e l'alterazione della composizione del microbiota. Dati della letteratura suggeriscono come la disbiosi intestinale sia correlata alla patogenesi di queste malattie, piuttosto che una sua conseguenza.

Ceppi, agonismo, sinergia: dal laboratorio all'ambulatorio

Lorenzo Drago

Laboratorio Analisi Cliniche e Microbiologiche,
IRCCS Istituto Galeazzi, Università di Milano
Laboratorio di S.T. per Medicina di Laboratorio,
LITA Vialba
Dipartimento Scienze Biomediche per la Salute,
Università di Milano

Negli ultimi 30 anni sono stati pubblicati su riviste internazionali oltre 9.200 lavori scientifici riguardanti i probiotici, di cui circa un quarto (2.590) sono review, mentre i lavori clinici sono circa 940, di cui 526 sono studi clinici randomizzati; solo 361 sono gli studi *in vitro*. I bias comuni a molti studi clinici randomizzati sono la presenza soltanto di pochi ceppi ben caratterizzati, il fatto che gli stessi ceppi siano chiamati in causa per patologie molto diverse, il fatto che il disegno degli studi sia carente, la mancanza di un approccio preclinico e la presenza soltanto di una valutazione clinica. Poiché in effetti la produzione e l'utilizzo dei probiotici è ancora in fase embrionale, ci si può chiedere se si possa pensare a nuovi ceppi di probiotici per il futuro: questi non dovrebbero contenere geni della resistenza antibiotica, tossine o fattori di virulenza e dovrebbero poter essere prodotti in maniera economicamente vantaggiosa, oltre ovviamente ad essere efficaci. La ricerca di nuovi ceppi di probiotici dovrebbe comprendere una completa caratterizzazione del genoma, la conferma della sicurezza clinica e l'identificabilità del ceppo (secondo il codice di nomenclatura internazionale). L'aspetto più deprimente è che la qualità e la vitalità dei microrganismi è presa in considerazione solo da pochi articoli (circa 440); vi sono inoltre problemi di etichettatura e denominazione dei ceppi, tanto che già una decina di anni fa in un articolo su *Journal of Chemotherapy* ho messo in risalto la necessità di una legislazione chiara e di un adeguato controllo sulla produzione dei prodotti probiotici. Purtroppo al giorno d'oggi la situazione, pur essendo lievemente migliorata, è ancora lontana dall'essere ottimale. La combinazione inappropriata di più ceppi di bifidobatteri in alcuni prodotti può determinare l'inibizione della crescita dei batteri e quindi un'efficacia ridotta del probiotico.

Recentemente, invece, un nuovo prodotto contenente 3 diversi ceppi di bifidobatteri (*longum* BB 536, *breve* M16-V, *infantis* M-63) ha dimostrato di essere in grado di inibire la proliferazione di batteri patogeni come *E. coli* e *K. pneumoniae* (Tab. II).

Un problema molto importante è quello dell'antibioticoresistenza, a proposito del quale si dovrebbe rispondere a domande come: è appropriato somministrare antibiotici e probiotici insieme? Un probiotico può sviluppare resistenza? La resistenza può diventare stabile? Un probiotico può trasferire la resistenza? In effetti l'EFSA nel 2008 ha stabilito che i probiotici non dovrebbero contenere nessun gene che conferisca resistenza agli antibiotici acquisita o trasferibile. In realtà molti microrganismi contenuti nei nostri probiotici contengono geni che conferiscono resistenza agli antibiotici: su 21 ceppi batterici isolati nei pro-

Tab. II. Nuova formula. 3 diversi ceppi di Bifidobatteri.

	Log CFU/mL
<i>B. longum</i>	7,97
<i>B. longum combi</i>	7,87
<i>B. infantis</i>	8,53
<i>B. infantis combi</i>	8,38
<i>B. breve</i>	8,48
<i>B. breve combi</i>	8,30

La tabella dimostra la sovrapposizione, in termini di colonie formanti unità, fra il risultato del test con il ceppo, singolo e combinato con gli altri, a dimostrazione della bio-compatibilità del preparato. Si evidenzia per il *B. breve* M16-V la produzione di batteriocine vs. *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Inibizioni

E. coli
K. pneumoniae

biotici in vendita in Italia, 5 hanno ceppi resistenti all'eritromicina, 2 alle tetracicline e ben 14 alla gentamicina.

Un nostro lavoro sperimentale, in fase di pubblicazione, con la combinazione dei 3 bifidobatteri (*longum* BB 536, *breve* M16-V, *infantis* M-63) ha dimostrato l'ottima biocompatibilità fra i 3 ceppi (Tab. II), la sopravvivenza degli stessi a pH 1,5/2 e all'azione dei sali biliari e la non induzione di resistenza testata su eritrocina, tetracicline e penicilline.

Il riscontro di resistenza alla gentamicina non ha però evidenziato, nelle 5 principali sottospecie di geni, la sua trasferibilità.

Un altro argomento dibattuto è se siano più efficaci i prodotti monoceppo o multiceppo: anche se molti dei prodotti più venduti contengono più di un ceppo

batterico, non vi sono evidenze chiare sulla maggiore validità dei probiotici multiceppo rispetto ai monoceppo.

In realtà, se i ceppi batterici lavorano in sinergia o per competizione con i microrganismi patogeni, la presenza di più ceppi batterici in un prodotto può risultare più efficace.

L'ultimo aspetto è quello che riguarda la capacità di adattamento al nostro intestino dei microrganismi contenuti nei probiotici, che può essere valutato come escrezione con le feci e come colonizzazione e sopravvivenza nell'intestino stesso. Purtroppo solo pochi lavori hanno preso in considerazione questo aspetto. In conclusione, il futuro dei probiotici dovrà tenere in considerazione il problema dell'antibioticoresistenza, la caratterizzazione e la stabilità (oltre alla sicurezza) dei ceppi batterici e lo studio di nuovi ceppi che abbiano caratteristiche di qualità e siano sostenuti da sufficienti evidenze cliniche.

Bifidobatteri in medicina pediatrica: prevenzione e trattamento

Annamaria Staiano

Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi Federico II, Napoli
Presidente SIGENP

I batteri costituiscono una famiglia antichissima con oltre 50 *phyla*. Quasi tutti i microrganismi che abitano nell'intestino umano appartengono ai *phyla Bacteroides* e *Firmicutes*. Il microbiota intestinale è costituito da batteri con funzioni utili all'organismo (lactobacilli, eubatteri, bifidobatteri) e altri con effetti dannosi (tra cui *Pseudomonas*, *Proteus*, stafilococchi e clostridi). I probiotici sono costituiti da microrganismi vivi, che quando vengono somministrati in adeguate quantità conferiscono effetti benefici per la salute dell'individuo. I principali microrganismi utilizzati come probiotici sono i lattobacilli, i bifidobatteri e i lieviti (*Saccha-*

romyces boulardii). I bifidobatteri sono il secondo più comune tipo di batterio (dopo il lattobacillo) utilizzato come probiotico e si trovano naturalmente nell'intestino di neonati allattati al seno in elevate quantità: in media costituiscono circa tre quarti di tutte le cellule batteriche nell'intestino di questi bambini, in confronto ad una percentuale molto più bassa (circa il 12-30%) nella microflora intestinale degli adulti. Il latte materno stimola la crescita dei bifidobatteri, chiara indicazione del loro effetto protettivo in individui vulnerabili.

La forma delle cellule dei Bifidobatteri varia tra le specie, ma in generale si tratta di bastoncelli sottili e con estremità leggermente bulbose. Una o entrambe le estremità tendono a biforcarsi; queste doppie punte danno al batterio il suo nome, dalla parola latina *bifidus* (diviso in due). Attualmente sono state identificate 32 specie di bifidobatteri, principalmente dall'intestino dei mammiferi. Le specie scoperte dall'intestino umano sono: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. gallicum*, *B. infantis*, *B. longum* e *B. pseudocatenulatum*.

I principali sottoprodotti del metabolismo dei bifidobatteri sono l'acido acetico e l'acido lattico, in uguale proporzione. Questi due acidi abbassano il pH intestinale, specialmente a livello del cieco e dell'ascendente (molti microbi dannosi sono inibiti da un basso pH). I bifidobatteri producono prodotti anti-batterici, sostanze che inibiscono i batteri nocivi, come *Yersinia* e *Shigella spp.* Le sostanze anti-batteriche non sono ancora state identificate, ma sembrano essere simili alle batteriocine prodotte dai lattobacilli. Inoltre i bifidobatteri producono vitamine del gruppo B. Essi hanno la tendenza ad aderire bene alla parete intestinale, così da escludere i batteri patogeni; non producono alcun gas.

I principali campi di applicazione dei bifidobatteri in pediatria sono costituiti dalle allergie, dalla dermatite

Principali indicazioni dei Bifidobatteri in pediatria:

- allergia
- dermatite atopica
- infezioni
- nel neonato pretermine
- malattia celiaca
- disordini funzionali gastrointestinali

Bifidobatteri

- Secondo più comune tipo di batterio utilizzato come probiotico
- Si trovano naturalmente nell'intestino di neonati allattati al seno in elevate quantità
- In media costituiscono circa $\frac{3}{4}$ di tutte le cellule batteriche nell'intestino di questi bambini
- Il latte materno stimola la crescita di bifidobatteri, chiara indicazione del loro effetto protettivo in individui vulnerabili

Da Macfarlane et al.; Ballongue et al., mod.

atopica, dalle infezioni, nel neonato pretermine, nella malattia celiaca e nei disordini funzionali gastrointestinali.

Nell'allergia, studi sulla composizione della microflora intestinale in bambini di 2 anni allergici e non allergici hanno evidenziato che la prevalenza di bifidobatteri è più bassa nei bambini allergici, rispetto al numero di *Staphylococcus aureus* e enterobatteri; inoltre, nell'uomo l'assunzione di probiotici, come lattobacilli e bifidobatteri, può prevenire malattie allergiche. In un recentissimo lavoro la somministrazione orale di *B. lactis* ha ridotto i parametri immunitari e i sintomi allergici nella rinite allergica durante l'esposizione stagionale ai pollini. Nella dermatite allergica la supplementazione materna con probiotici durante la gravidanza e l'allattamento riduce il rischio di eczema nei neonati di madri con prick test cutaneo positivo. In uno studio multicentrico la somministrazione di una miscela probiotica ha ridotto la durata della diarrea e della degenza in bambini con diarrea acuta di origine infettiva. Nel neonato pretermine la supplementazione con probiotici riduce la probabilità di sviluppare una enterocolite necrotizzante.

Per quanto riguarda la patogenesi della malattia celiaca, diversi studi hanno valutato il possibile ruolo

dei bifidobatteri, che sembrano facilitare la degradazione del glutine e ridurre la permeabilità epiteliale e l'effetto proinfiammatorio indotto dal glutine. Inoltre, la somministrazione di probiotici contenenti bifidobatteri riduce i sintomi gastrointestinali e la secrezione di IgA in soggetti con malattia celiaca attiva.

Nei disordini funzionali gastrointestinali, il trattamento con yogurt contenente bifidobatteri ha ridotto i sintomi in soggetti con stipsi cronica funzionale e la supplementazione con *B. bifidum* ha alleviato la sintomatologia da sindrome del colon irritabile rispetto al placebo.

In conclusione, il latte materno ha un effetto bifidogeno, mentre il latte formulato induce una flora differente (contenente batteroidi, clostridi e streptococchi).

Evidenze scientifiche sempre più chiare testimoniano l'efficacia dei bifidobatteri come probiotici.

Bibliografia di riferimento

- Ballongue J. *Bifidobacteria and probiotic action*. In: Salminen S, von Wright A, eds. *Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects*. New York: Marcel Dekker Inc 1998, pp. 519-587.
- Butel MJ, Suau A, Campeotto F, et al. *Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:577-82.
- Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, et al. *Cross-feeding between Bifidobacterium longum BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose*. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:7835-41.
- FAO/WHO. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Food and Agriculture Administration of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Available from: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf (cited 18 April 2008).
- Hattori K, Yamamoto A, Sasai M, et al. *Effects of administration of bifidobacteria on fecal microflora and clinical symptoms in infants with atopic dermatitis*. *Alerugi* 2003;52:20-30.
- Hill DA, Artis D. *Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis*. *Annu Rev Immunol* 2010;28:623-67.
- Iwabuchi N, Xiao JZ, Yaeshima T. *Oral administration of Bifidobacterium longum ameliorates influenza virus infection in mice*. *Biol Pharm Bull* 2011;34:1352-5.
- Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, et al. *Early administration of Bifidobacterium breve to preterm infants: randomised controlled trial*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;76:F101-7.
- Li Y, Shimizu T, Hosaka A, et al. *Effects of bifidobacterium breve supplementation on intestinal flora of low birth weight infants*. *Pediatr Int* 2004;46:509-15.
- Macfarlane GT, Gibson GR, Drasar BS, et al. *Metabolic significance of the gut microflora*. In: Whitehead R, ed. *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone 1995, pp. 249-274.
- Matsumoto T, Ishikawa H, Tateda K, et al. *Oral administration of Bifidobacterium longum prevents gut-derived Pseudomonas aeruginosa sepsis in mice*. *J Appl Microbiol* 2008;104:672-80.
- Mitsuoka T, Hayakawa K. *The fecal flora in man. I. Composition of the fecal flora of various age groups*. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 1973;223:333-42.
- Rougé C, Piloquet H, Butel MJ, et al. *Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1828-35.
- Schwartz A, Gruhl B, Löbnitz M, et al. *Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants*. *Pediatr Res* 2003;54:393-9.
- Wagner RD. *Effects of microbiota on GI health: gnotobiotic research*. *Adv Exp Med Biol* 2008;635:41-56.
- Yoshida Y, Seki T, Matsunaka H, et al. *Clinical effects of probiotic bifidobacterium breve supplementation in adult patients with atopic dermatitis*. *Yonago Acta Medica* 2010;53:37-45.
- Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. *Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants*. *Pediatrics* 1983;72:317-21.

Finito di stampare nel mese di Luglio 2013
presso le Industrie Grafiche della Pacini Editore S.p.A.
Via A. Gherardesca • 56121 Ospedaletto • Pisa
Telefono 050 313011 • Telefax 050 3130300
www.pacinimedica.it

