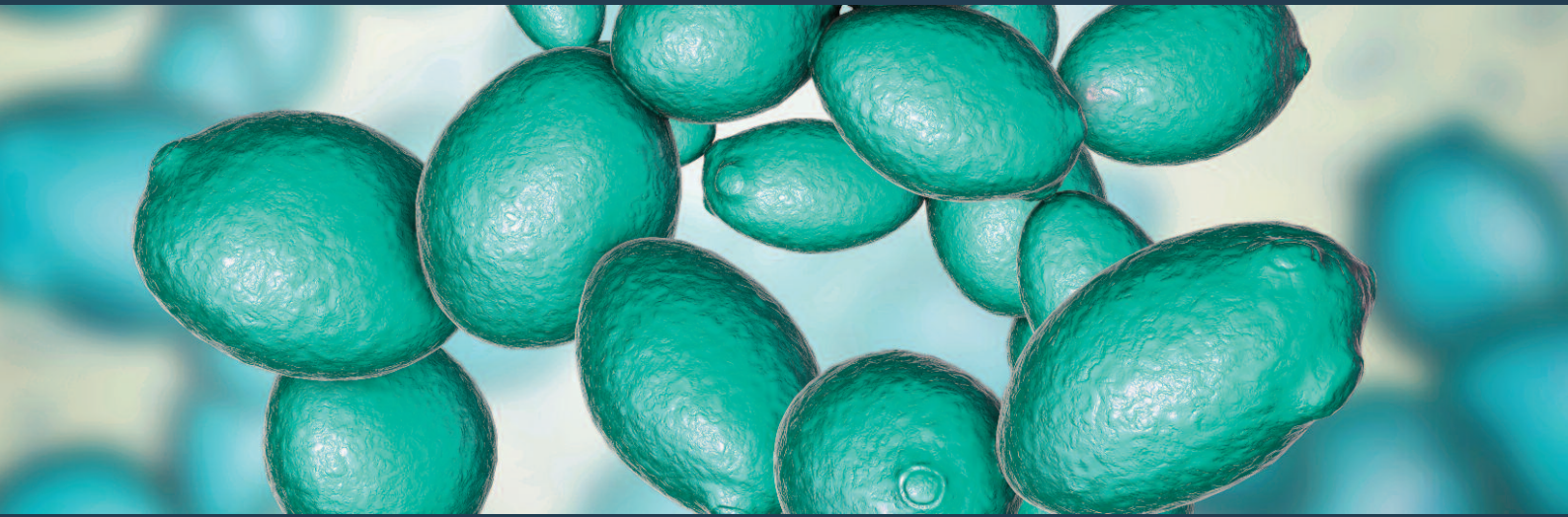


*S. boulardii e  
L. rhamnosus GG*



Mix probiotico  
con indicazioni gastroenteriche e non solo

Un'analisi ragionata della letteratura

*Editore*

**Clorofilla Srl**  
**editoria scientifica**

*Direttore editoriale*

Massimo Barberi

*Art director*

Stefania Maffoni

*Autore*

Luca Pastorelli

Dipartimento di Scienze della Salute - Università di Milano

UOC Gastroenterologia e Epatologia - ASST Santi Paolo e Carlo

Simone Guglielmetti

Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS)

Università degli Studi di Milano

*Direzione e redazione*

Clorofilla Srl - editoria scientifica

Via Podgora 12/A, 20122, Milano

Tel 02 39523784 | [www.clorofillaweb.it](http://www.clorofillaweb.it)

Iscrizione al ROC n. 25358

Copyright © 2021

Questa pubblicazione è protetta da copyright. Tutti i diritti sono riservati.

Sono vietate la riproduzione e l'archiviazione in qualsiasi forma e qualsiasi mezzo elettronico, compresa la fotocopiatura, senza autorizzazione scritta dell'Editore.

Immagine di copertina di Adobe Stock: Kateryna\_Kon.

Immagini di Adobe Stock: bit24, sonyakamoz, Pixelbliss, Kateryna\_Kon, Christoph Burgstedt.

*Nota dell'Editore*

La realizzazione di questa pubblicazione

è stata effettuata con la massima accuratezza. Ciò nonostante, l'Editore

non è responsabile per errori, omissioni e/o inesattezze e per qualunque conseguenza derivata dalle informazioni ivi contenute.

Realizzato con il contributo incondizionato di IPSEN Consumer HealthCare Srl

# *S. boulardii* e *L. rhamnosus* GG

Mix probiotico  
con indicazioni gastroenteriche e non solo

Un'analisi ragionata della letteratura

*Microbioma. Questa parola sta entrando sempre più nel vocabolario di tutti noi. Spesso, però, viene utilizzata – erroneamente – come sinonimo di microbiota. Quest'ultimo si riferisce all'insieme di tutte le cellule microbiche in un organo, un tessuto, un apparato o in un qualsiasi altro ambiente quale, ad esempio, il suolo o un alimento. Invece, in accordo con la dichiarazione di consenso formulata recentemente [1], la parola microbioma non si riferisce solo ai microrganismi in un habitat ben definito, ma racchiude anche tutti i metaboliti microbici e gli elementi genetici (ad esempio, trasposoni, fagi e virus) unitamente alle condizioni ambientali dell'habitat stesso. Il microbioma, dunque, include il microbiota ed il suo "teatro di attività" [1].*

*Già da questa definizione se ne comprende la complessità e, allo stesso tempo, la ricchezza di risorse in termini di geni, e dunque di attività enzimatiche e di molecole.*

*In costante aumento sono gli studi che indagano (e in molti casi provano) lo stretto legame del microbioma intestinale con la salute dell'ospite. La sua alterazione, a livello sia di composizione sia di funzionalità, viene definita "disbiosi" quando è dimostrata essere un fattore causale in un disturbo o in una patologia, che può anche riguardare distretti del corpo umano apparentemente non correlati con la sede del microbioma intestinale (si pensi per esempio all'asse intestino-cervello).*

*Considerando l'importanza della composizione del microbiota intestinale per il mantenimento della salute umana, la somministrazione di probiotici e prebiotici è emersa come una delle strategie più efficaci per mantenere o ristabilire l'eubiosi, ovvero il corretto rapporto simbiotico tra l'organismo umano e i microrganismi che vivono costantemente associati ad esso [2].*

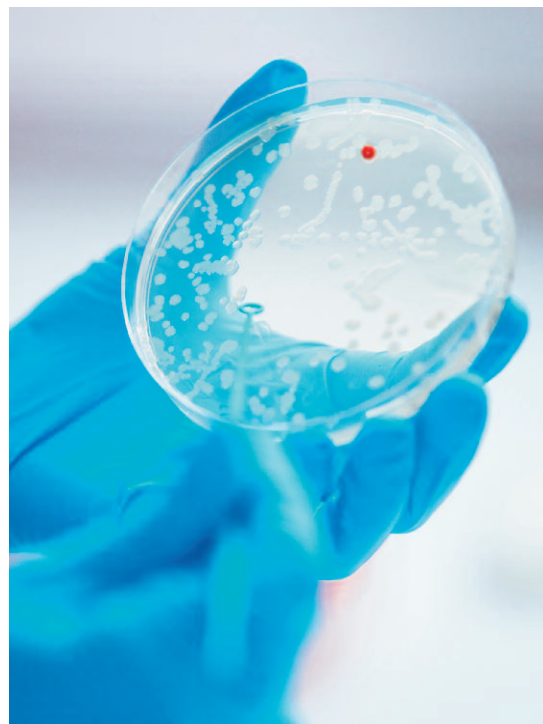
## Che cos'è la ceppo-specificità

Secondo la FAO (*Food and Agriculture Organization*) e l'OMS (*Organizzazione Mondiale della Sanità*) i probiotici sono «**microrganismi vivi** che, una volta ingeriti in adeguate quantità, conferiscono un **beneficio per la salute dell'ospite**» [3].

Tra i requisiti che un prodotto probiotico deve avere per esser definito di qualità troviamo anzitutto la **caratterizzazione del ceppo** (o dei ceppi) che contiene. Aspetto fondamentale se si tiene conto che un determinato ceppo può avere effetti notevolmente diversi (talvolta anche opposti) rispetto ad altri sebbene appartenenti alla stessa specie [4]. Si parla infatti di “**ceppo-specificità**”, una definizione che racchiude il primo e importante messaggio da tenere in considerazione quando si devono prescrivere questi prodotti: **i probiotici non sono tutti uguali**.

La scelta del tipo appropriato di probiotico sulla base delle evidenze scientifiche è spesso però ancora una sfida, soprattutto per la loro eterogeneità. Mano a mano che i dati di letteratura si accumulano è tuttavia sempre più chiaro che **esistono precisi ceppi probiotici per determinate condizioni patologiche o disturbi**. Uno specifico probiotico o una sua formulazione può risultare infatti efficace per un disturbo e non esserlo per un altro, anche se simile.

**Alcuni possono avere valenza preventiva, altri di trattamento.** Queste differenze si devono principalmente ai meccanismi d'azione dei singoli ceppi, al loro target di colonizzazione e/o alla loro effettiva capacità di ristabilire un microbioma locale eubiotico [5].



Tra i probiotici più studiati e attualmente utilizzati nella pratica clinica troviamo diversi ceppi di ***Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*** (abbreviato in *S. boulardii*) tra cui il ceppo CNCM I-1079, e ***Lactobacillus rhamnosus*** (attualmente rinominato in *Lactocaseibacillus rhamnosus*) **ceppo GG** (sinonimo di ATCC 53103).

# *Saccharomyces boulardii*

Sebbene la quasi totalità dei probiotici sia costituita da batteri (membri del regno dei viventi definito Monera, l'unico che comprende gli organismi procarioti), **il probiotico *S. boulardii* è un lievito** (membro del regno Fungi, che include cellule eucariote). In particolare, *S. boulardii* è **uno dei pochissimi microrganismi non batterici aventi dimostrate caratteristiche di sicurezza ed efficacia adatte a un impiego come probiotico** ed è l'unico al momento studiato attraverso numerosi trial clinici [6]. Di particolare interesse è il fatto che *S. boulardii*, essendo un lievito, **è resistente per natura agli antibiotici, i cui target**, quali ad esempio la transpeptidasi necessaria per la sintesi del peptidoglicano di parete nei batteri (target dei betalattamici) o la subunità 30S del ribosoma batterico (target delle tetracicline), **sono assenti nelle cellule eucariote**. *S. boulardii*, pertanto, possiede le caratteristiche per essere **utilizzato nella prevenzione e/o trattamento della diarrea associata agli antimicrobici**, come già dimostrato a livello clinico [2].

Diverse altre proprietà supportano l'impiego come probiotico di *S. boulardii*, il quale, anzitutto, **ha dimostrato di poter sopravvivere al pH acido dello stomaco arrivando vivo in sede intestinale**, caratteristica fondamentale per tutti i probiotici assunti per via orale. Una volta nell'intestino, *S. boulardii* si è dimostrato utile per la prevenzione

e per il trattamento di diverse situazioni cliniche [7].

Tra i principali effetti attribuiti attraverso studi clinici a *S. boulardii* troviamo:

- la **regolazione dell'omeostasi intestinale** supportando il microbiota in seguito a terapia antibiotica o diarrea acuta [2];
- la **regolazione della risposta immunitaria sia innata sia adattativa**. Riguardo quella innata, sembrerebbe in grado di attivare il fattore del complemento, e la migrazione di monociti e granulociti. In relazione all'immunità adattativa invece, in seguito a un suo supplemento si è registrato un aumento della risposta secretoria mediata ad esempio da IgA secretorie, IgG (contro *Clostridioides difficile* in particolare), linfociti T, IFN- $\gamma$  o IL-12. Diminuita invece la risposta infiammatoria con decremento, ad esempio, di citochine quali IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  [7,8];
- il **miglioramento della funzionalità della barriera intestinale** stimolando ad esempio l'attività metabolica delle cellule epiteliali oltre che la loro proliferazione, con un ripristino inoltre del trasporto di fluidi intermembrana, una riduzione della permeabilità intestinale (osservata ad esempio in pazienti con morbo di Crohn) agendo sulle proteine delle giunzioni serrate (*tight junctions*) [7,9,10];
- **attività antimicrobica**: inibisce la crescita

di patogeni o neutralizza la virulenza. *S. boulardii* sembrerebbe inoltre **contrastare l'adesione dei microrganismi patogeni alle cellule dell'ospite e la traslocazione in sede extra-intestinale**. In caso di infezione da *C. difficile*, ad esempio, è in grado di stimolare la produzione di enzimi (serin proteasi) in grado di neutralizzare la tossina A del patogeno [7];

Quali sono le applicazioni cliniche di *S. boulardii*? Sulla base degli studi disponibili, la World Gastroenterology Organisation [11] nel 2017 e diverse metanalisi/revisioni sistematiche hanno individuato, con un elevato livello di evidenza, le seguenti indicazioni e posologie per l'utilizzo di *S. boulardii* negli adulti:

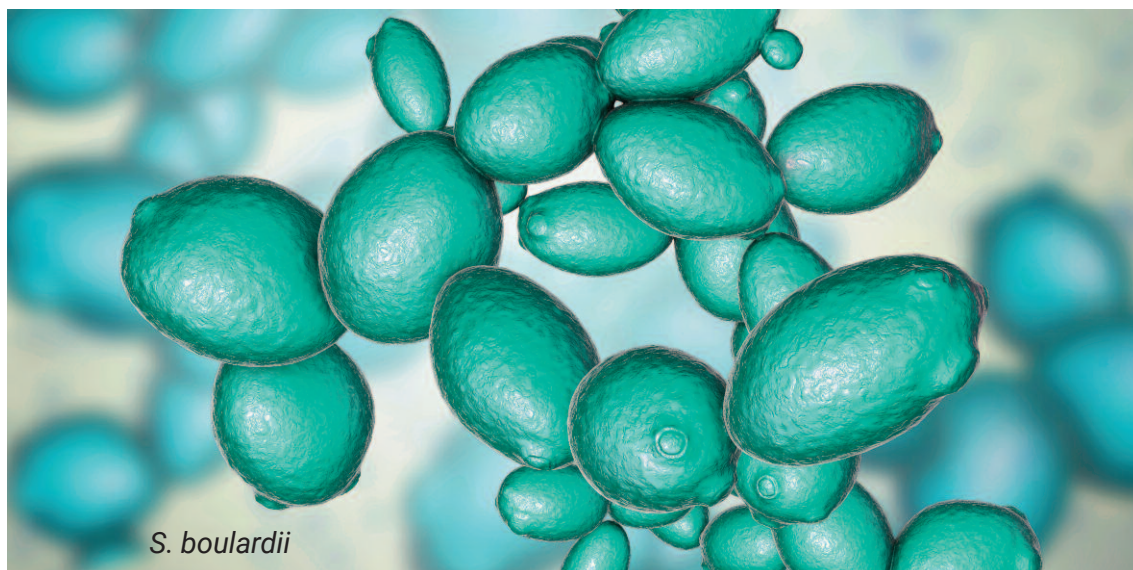
- **diarrea acuta e/o associata ad antibiotici**;  $5 \times 10^9$  CFU/capsula o 250 mg due volte al giorno. Surawicz et al. [12] ad esempio, hanno dimostrato come l'incidenza di diarrea in 180 pazienti ospedalizzati e sotto terapia antibiotica sia passata dal 22% al 10% con la somministrazione del probiotico rispetto al placebo. Somministrando poi *S. boulardii* sin dall'inizio della terapia con beta-lattamici sembrerebbe inoltre esserci un effetto preventivo riducendone l'incidenza [13]. Il miglioramento della diarrea acuta è stato poi visto anche nella popolazione pediatrica, con una riduzione dei giorni di disturbo nonché della sua incidenza, suggerendone una capacità preventiva anche in età pediatrica se somministrato quotidianamente [14,15]
- **coadiuvante per la terapia di eradicazione di *Helicobacter pylori***, utile soprat-

tutto nel ridurre gli effetti collaterali;  $5 \times 10^9$  CFU/capsula o 250 mg due volte al giorno [16]; tale indicazione è stata inoltre confermata in ambito pediatrico seppur con una dose raccomandata di 500 mg in due volte per 2-4 settimane.

- **gastroenterite acuta**; 250-750 mg/die solitamente per 5-7 giorni. Ozkan et al. [17] hanno infatti dimostrato un significativo miglioramento dei parametri immunitari (IgA e linfociti CD8) oltre che infiammatori (diminuzione di proteina C reattiva) in 27 bambini con diarrea acuta trattati per sette giorni (250 mg/due volte al giorno) con *S. boulardii* vs placebo.

Al di fuori delle raccomandazioni ufficiali, basate su un livello più che adeguato di evidenza scientifica, stanno emergendo nuove potenziali applicazioni.

- **sindrome dell'intestino irritabile (IBS)**; soprattutto nel migliorarne la qualità di vita;  $5 \times 10^9$  CFU/capsula o 250 mg due volte al giorno. Abbas et al. [18] ad esempio hanno dimostrato come la sua somministrazione riduca notevolmente i livelli di citochine pro-infiammatorie quali IL-8 e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ) aumentando di contro l'espressione di quelle antiinfiammatorie (IL-10 ad esempio). Pazienti con IBS con diarrea frequente, dopo la somministrazione di *S. boulardii*, hanno inoltre mostrato una diminuzione significativa della frequenza delle evacuazioni unitamente a un incremento della consistenza delle feci [19].
- **enterocolite necrotizzante (NEC)**; una recente metanalisi ha dimostrato che l'utilizzo



*S. boulardii*

preventivo di *S. boulardii* nei neonati pre-termine possa ridurre significativamente l'incidenza di questa gravissima condizione [20]; inoltre, l'utilizzo a scopo terapeutico, sebbene non riduca la mortalità della NEC, riduce il tempo di ospedalizzazione e di recupero ponderale, nonché la frequenza dell'intolleranza alla nutrizione [20].

- **diarrea da nutrizione enterale**; tipicamente, l'utilizzo della nutrizione enterale può causare la comparsa di diarrea; uno studio multicentrico in doppio cieco, pubblicato nel 1997, che ha coinvolto 128 pazienti ricoverati in terapie intensive e sottoposti a nutrizione enterale, ha dimostrato che *S. boulardii* (500 mg per 4 volte al giorno) è in grado di ridurre questo effetto collaterale [21].

- **infezione da *C. difficile***: come coadiuvante nella terapia, soprattutto nel ridurre le recidive. Tra i meccanismi d'azione proposti, la produzione di fattori in grado di bloccare le tossine batteriche e/o la modulazione della segnalazione cellulare coinvolta nella

risposta all'infezione [22]. Studi in vivo hanno inoltre dimostrato un notevole miglioramento della sintomatologia associata all'infezione (infiammazione ciecale, danno alla mucosa, aumento di marcatori infiammatori quali TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B) [23-25]

- **diarrea del viaggiatore**; Kollaritsch et al. [26] infatti hanno dimostrato come l'incidenza di diarrea in 1016 viaggiatori si sia significativamente ridotta in seguito alla somministrazione di *S. boulardii* (250 mg o 1 g/die) rispetto al placebo in maniera dose dipendente. L'efficacia preventiva del probiotico è stata inoltre confermata dalla meta-analisi condotta da McFarland et al. [27]

- **malattia di Crohn**; per ridurre permeabilità intestinale e traslocazione batterica migliorando quindi il decorso della malattia. La co-somministrazione del probiotico alla terapia con mesalazina o sulfasalazina ha inoltre mostrato di ridurre notevolmente i movimenti intestinali, ridurre la recidiva e incrementare il successo terapeutico rispetto al solo trattamento farmacologico [28,29];

indubbiamente, questi dati, seppur molto interessanti, andrebbero confermati in nuovi studi randomizzati e controllati.

- **colite ulcerosa:** nel favorirne la remissione. 25 pazienti con colite ulcerosa di media-moderata intensità trattati con *S. boulardii* (250 mg tre volte die per 4 settimane) hanno registrato infatti una migliore risoluzione del disturbo rispetto al solo trattamento con mesalazina [30]. Tali effetti sembrerebbero da attribuire alla capacità del probiotico di indurre una riduzione dei livelli di mediatori infiammatori quali TNF- $\alpha$  e IL-6 oltre che mediare una rimodulazione generale della componente batterica intestinale commensale incrementando per esempio l'abbondanza di *Bacillus* e *Lactococcus* [31]. Anche nel caso della colite ulcerosa, l'utilizzo di *S. boulardii* andrebbe ulteriormente esplorato, per confermare i dati soprariportati ed eventualmente valutare il ruolo di questo probiotico anche in combinazione con altri farmaci.

In sostanza, le applicazioni nella pratica clinica di *S. boulardii* sono di fatto molto ampie; infatti, sembrerebbe essere un probiotico di prima scelta **in molte condizioni caratterizzate da diarrea secondaria a un dismicrobismo intestinale, sia nell'adulto sia, forse anche con maggiore forza, in ambito pediatrico**, come la diarrea acuta, la diarrea del viaggiatore, la diarrea da antibiotici, in particolare quella legata all'infezione da *C. difficile*; questi dati sottolineano il suo ruolo eubiotico, che trova applicazione anche nel migliorare l'efficacia e la tollerabilità della terapia eradicante *H. pylori*.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire il ruolo di *S. boulardii* in condizioni con un'eziologia più complessa, multifattoriale, come la sindrome dell'intestino irritabile, la malattia diverticolare e le malattie infiammatorie croniche intestinali; i dati in letteratura sottolineano l'importanza della composizione del microbiota in queste malattie, ma, d'altra parte, numerosi altri fattori entrano in gioco nello sviluppo dei sintomi e delle lesioni intestinali.

Pertanto, il peso della modulazione del microbiota potrebbe essere molto differente in ogni singolo paziente. Una migliore capacità di stratificare i pazienti affetti da queste condizioni complesse e di identificare i soggetti in cui le alterazioni del microbiota giocano un ruolo principale nello sviluppo della malattia, potrebbe permettere di costruire trial clinici mirati con *S. boulardii* in popolazioni selezionate.

Al di là di quanto già conosciuto o in fase di conferma in campo gastroenterologico, studi in corso abbracciano però anche altri settori. Effetti positivi di *S. boulardii* sono infatti stati dimostrati in ambito ginecologico, cardiovascolare e immunitario. Vediamone qualche esempio.

## **S. BOULARDII IN GINECOLOGIA**

Tra i vari disturbi e/o patologie ginecologiche, *S. boulardii* **sembra avere una certa efficacia nei confronti di *Candida albicans***, fungo opportunisto che può diventare membro del microbiota vaginale, anche se di norma presente in basse concentrazioni. *C. albicans* è responsabile dell'85-90% dei

casi di candidiasi vulvovaginale, nota anche come “**candida**” o “**candidosi**”, l’infezione urogenitale femminile più comune dopo la vaginosi batterica.

*S. boulardii* **sembra agire sulla formazione dei filamenti di ancoraggio** (pseudoife) **ostacolando l’adesione del patogeno alle cellule epiteliali del tratto urogenitale** con conseguente diminuzione del biofilm necessario per la proliferazione e lo sviluppo di infezione. Tale effetto è stato ricondotto sia al ceppo vivo di *S. boulardii*, sia al suo estratto, anche se somministrato in basse dosi, suggerendone una spiccata attività e, perciò, una reale potenzialità terapeutica [32]. Diminuita (in vitro) è inoltre risultata la risposta infiammatoria al patogeno con un decremento dei livelli di IL-8 [33]. Evidenze cliniche seppur limitate dallo scarso numero di studi disponibili non condotti per altro in ambito ginecologico sostengono l’attività di *S. boulardii* contro *C. albicans* anche sull’uomo. In seguito alla somministrazione di questo probiotico si è infatti di-



mostrata una ridotta colonizzazione del fungo patogeno in età pediatrica [34].

## **S. BOULARDII IN AMBITO CARDIOVASCOLARE**

L’incremento negli ultimi anni delle ricerche sul microbiota e sui potenziali usi terapeutici dei probiotici riguarda in parte anche il sistema cardiovascolare. È stato riportato, per esempio, che **pazienti con scompenso cardiaco cronico manifestano alterazioni nella motilità e nell’assorbimento intestinale** con promozione della crescita di enteropatogeni, aumento della traslocazione di endotossine batteriche e conseguente innescò di risposta infiammatoria generalizzata. In uno studio pilota, la somministrazione a pazienti scompensati di *S. boulardii* per tre mesi (1.000 mg die) sembra migliorare il quadro clinico rispetto al placebo, effetto supportato da un miglioramento della frazione di eiezione del ventricolo sinistro e una riduzione del diametro atriale sinistro, insieme con una riduzione dei marcatori biochimici e infiammatori [34].

Oltre allo scompenso cardiaco, in seguito alla somministrazione di questo probiotico sembrerebbero emergere effetti positivi (seppur deboli e in attesa di ulteriori approfondimenti) anche nella regolazione della pressione sistolica e diastolica [35].

## **S. BOULARDII E RISPOSTA IMMUNITARIA**

Tra i meccanismi d’azione dei probiotici legati alla promozione della salute dell’ospite

troviamo la **stimolazione della risposta immunitaria**. Non è da meno *S. boulardii*: numerosi studi ne hanno infatti dimostrato una potenziale capacità di indurre effetti protettivi contro le infezioni modulando la risposta immunitaria sia innata sia adattativa.

In relazione alla risposta immunitaria innata, ***S. boulardii* sembra influenzare l'attività del sistema del complemento, oltre che di granulociti, monociti e macrofagi epatici** (cellule Kupffer).

Studi in vivo hanno poi dimostrato come una sua somministrazione aumenti significativamente la secrezione di IgA (immunità adattativa) a livello enterico, di quelle anti-*C. difficile* in particolare [37].

Dodici settimane di trattamento con *S. boulardii* hanno anche fatto registrare una riduzione della traslocazione batterica plasmatica e dell'infiammazione sistemica (IL-6) in 44 pazienti HIV immunodepressi, metà dei quali non rispondenti alla terapia

antivirale. Il merito sembrerebbe da ricondurre alla capacità di modulare la composizione batterica intestinale riducendo ad esempio la famiglia *Clostridiaceae* tradizionalmente correlata sia a traslocazione sia a infiammazione. Interessante poi notare come nei non responder si sia visto un aumento dell'abbondanza di *Lachnospiraceae* e *Proteobacteria* [38].

## **SICUREZZA DELL'IMPIEGO CLINICO DI *S. BOULARDII***

Nonostante la somministrazione di *S. boulardii* sia considerata generalmente sicura, attenzione va posta nei pazienti fortemente immunocompromessi, con patologie intestinali e/o portatori di cateteri (veicoli di infezione). In questi casi si è infatti vista una relazione tra il probiotico e l'insorgenza di fungemia, ossia un'infezione generalizzata per la presenza di lieviti (o funghi) nel sangue [39].

## **Punti chiave**

*S. boulardii* è uno dei pochissimi microrganismi non batterici con dimostrate caratteristiche di sicurezza ed efficacia adatte a un impiego come probiotico.

Le applicazioni nella pratica clinica di *S. boulardii* sono molto ampie e riguardano molteplici specialità

Numerosi studi hanno dimostrato una potenziale capacità di *S. boulardii* di modulare la risposta immunitaria innata e adattativa.

# *Lactobacillus rhamnosus GG*

**L. rhamnosus GG è un batterio Gram positivo che produce acido lattico come unico prodotto del catabolismo del glucosio**, il quale è stato recentemente riclassificato come *Lacticaseibacillus*, il genere che comprende le specie più diffusamente impiegate come probiotici (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*). In particolare, *L. rhamnosus* GG è in assoluto il ceppo probiotico più studiato. Numerose caratteristiche lo rendono particolarmente adatto all'uso come probiotico. Anzitutto, *L. rhamnosus* GG appartiene ad una specie che ha ricevuto dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) lo stato di QPS (*qualified presumption of safety*), che ne consente l'**impiego in alimenti, integratori e mangimi** [40]. La **sicurezza** di questo batterio è stata dimostrata **anche per categorie di soggetti potenzialmente più sensibili**, quali anziani sani di età compresa tra 66 e 80 anni [41] e donne in gravidanza [42]. Un'altra importante garanzia di sicurezza di questo ceppo batterico risiede nel fatto che esso **non possiede alcuna resistenza antibiotica potenzialmente trasferibile ad altri batteri**, in accordo con le linee guida emanate dall'EFSA [40]. In particolare, *L. rhamnosus* GG risulta sensibile alla clindamicina, alla tetraciclina, ad antibiotici beta-lattamici quali l'ampicillina, a macrolidi come l'eritromicina e ad antibiotici aminoglicosidici quali la gentamicina e la streptomina (Tabella 1).

| Antibiotico  | MIC cut-off* | <i>L. rhamnosus</i> GG |
|--------------|--------------|------------------------|
| Ampicillina  | 4            | 2                      |
| Vancomicina  | n.r.         | >256                   |
| Gentamicina  | 16           | 8                      |
| Streptomina  | 32           | 16                     |
| Eritromicina | 1            | 0.5                    |
| clindamicina | 1            | 1                      |
| Tetraciclina | 8            | 8                      |

**Tabella 1.** Profilo di resistenza antibiotica del ceppo *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, determinato con il metodo delle microdiluizioni in accordo con il protocollo ISO10932 IDF 223 raccomandato dalla *European Food Safety Authority* (EFSA). Le minime concentrazioni inibenti (MIC) sono riportate in mg/l. \*, valori limite di MIC (*breakpoint*) proposti dall'EFSA per la specie *L. rhamnosus*. n.r., non richiesto.

*L. rhamnosus* GG, come diversi altri batteri lattici, **possiede una resistenza intrinseca** (quindi non trasferibile ad altri batteri) **verso la vancomicina**, dovuta al fatto che il peptidoglicano di parete di questo batterio contiene il dimero D-alanina-D-lattato, anziché D-alanina-D-alanina, impedendo così il legame della vancomicina [43]. Questa resistenza intrinseca, dunque, potrebbe rappresentare un vantaggio qualora il probiotico GG fosse impiegato in concomitanza con l'uso della vancomicina, che è un antibiotico ampiamente utilizzato in ambito clinico.

*L. rhamnosus* GG possiede inoltre le princi-

pali capacità necessarie a un probiotico, ovvero:

- la **sopravvivenza al transito gastrointestinale**, dimostrata sia in vitro che in vivo [44, 45], imputabile all'abilità del ceppo GG di sopportare il basso pH e la presenza di bile [46];
- l'**adesione alla mucina e alle cellule epiteliali** [47];
- il **miglioramento della permeabilità epiteliale e della composizione del microbiota intestinale** [48, 49]
- la **modulazione delle risposte immunitarie** a livello locale e sistemico [46, 50, 51];
- l'**antagonismo verso patogeni** [52];

In generale, un aspetto molto importante relativo al ceppo *L. rhamnosus* GG consiste nel fatto che esso è stato studiato in centinaia di diverse ricerche, molte delle quali dedicate all'analisi del suo genoma al fine di identificare gli elementi genetici e molecolari capaci di supportare l'interazione con l'ospite.

Questi studi hanno così permesso di individuare:

- **strutture proteiche ancorate alla parete chiamate pili**, che sono grado di mediare l'adesione agli epiteli [53] e modulare il signaling nelle cellule dell'ospite [54,55];
- **un esopolisaccaride capace di proteggere il batterio** dai fattori di immunità innata nell'intestino [56];
- **diversi peptidi con attività immunomodulatoria** quali le proteine solubili p40 e HM0539 [57, 58] e le proteine lectine capaci di inibire la formazione di biofilm da parte di patogeni quali *Salmonella* spp. ed *E. coli* uropatogenici [59].

Riguardo a questo ceppo, le linee guida della World Gastroenterology Organisation [11] lo indicano per l'utilizzo clinico in:

- **diarrea associata ad antibiotici**;  $10^{10}$  CFU/capsula due volte al giorno come conclude l'ampia revisione di Hempel et al. [60] comprensiva di 82 studi clinici randomiz-



zati. Tale effetto protettivo è confermato da una grande mole di dati anche in ambito pediatrico [60]. Anche i prodotti caseari contenenti il ceppo GG hanno mostrato di ridurre questo effetto collaterale [62].

- **coadiuvante per la terapia di eradicazione di *Helicobacter pylori***;  $6 \times 10^9$  CFU due volte al giorno. In associazione con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (DSM 15954) ha dimostrato di migliorare significativamente la condizione clinica aumentando la percentuale di casi curati rispetto al placebo (87.33% vs 72.55%) in uno studio randomizzato con 650 individui dimostrando inoltre effetti positivi sulla sintomatologia con riduzione dell'intensità (dolore epigastrico, diarrea ecc.) [63]. A confermarlo anche la meta-analisi condotta da Dang et al. [16]

- **diarrea acuta pediatrica**: *L. rhamnosus* GG sembra poter migliorare la diarrea acuta di verosimile origine infettiva nella popolazione pediatrica [64, 65] tanto è vero che il suo utilizzo in questo contesto è suggerito dalle linee guida pediatriche cinesi [48].

- **prevenzione della Enterocolite necrotizzante (NEC)**: recenti metanalisi hanno dimostrato una significativa riduzione dell'incidenza della NEC con l'utilizzo di probiotici; sebbene non esistano al momento raccomandazioni verso un ceppo specifico [65], solidi dati suggeriscono che *L. rhamnosus* GG ( $10^8$ - $10^{10}$  UFC due volte al giorno) in associazione con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 15954 o con la lattoferina abbia un ruolo nella prevenzione di NEC o nel miglioramento del suo decorso [66].

Anche per questo probiotico vi sono studi che ampliano le sue potenziali applicazioni, sebbene queste siano ancora da definire con certezza. Riportiamo di seguito alcuni interessanti riscontri sia in ambito gastroenterologico, sia in contesti differenti.

Per esempio, *L. rhamnosus* GG **ha dimostrato di influenzare la motilità intestinale interagendo con il sistema nervoso enterico, in collegamento diretto con il sistema nervoso centrale**. A renderlo possibile sembra essere la produzione di metaboliti (peptidi formilati) che comunicano con le cellule neuronali modulandone struttura e funzionalità. Sulla base di questa correlazione, i probiotici tra i quali *L. rhamnosus* GG, hanno quindi mostrato potenzialità nel trattamento di disordini della motilità associati a patologie quali costipazione, sindrome dell'intestino irritabile, ma anche malattia di Parkinsons e autismo [67].

Risultati positivi anche nel contesto pediatrico. L'uso di *L. rhamnosus* GG ha infatti dimostrato di aumentare seppur moderatamente il successo terapeutico in bambini con dolore addominale da disordini funzionali del tratto gastrointestinale soprattutto in quelli con sindrome dell'intestino irritabile (IBS) [67].

Al momento, invece, sono poco ricche le evidenze a supporto di un ruolo di *L. rhamnosus* GG nella **gestione delle malattie infiammatorie croniche intestinali e nella malattia diverticolare**. Questi campi di applicazione, anche se sicuramente complessi da un punto di vista patogenetico, rappresentano interessanti ambiti di ricerca per poter testare l'effetto di *L. rhamnosus* GG sui

sintomi e il decorso di suddette malattie. In ogni caso, in pratica clinica quotidiana, l'utilizzo di *L. rhamnosus* GG ha un forte razionale nella gestione empirica della diarrea acuta, sia legata a infezioni sia a dismicrobismi significativi, con un ruolo forse ancora maggiore in ambito pediatrico. Inoltre, la sua capacità di modulare l'attività del sistema nervoso enterico, e pertanto la motilità e sensibilità intestinale, suggerisce il suo impiego nella gestione dei disturbi funzionali intestinali, verosimilmente coadiuvando altri principi terapeutici.

## **L. RHAMNOSUS GG E RISPOSTA IMMUNITARIA**

Numerosi sono gli studi che dimostrano l'efficacia di questo probiotico nel contesto immunitario, soprattutto nei bambini. **Effetti profilattici e terapeutici** di *L. rhamnosus* GG sono stati infatti dimostrati **in bambini con disturbi atopici soprattutto correlati all'allergia al latte vaccino**. In bambini con dermatite atopica, per esempio, il ceppo GG ha mostrato di sostenere la funzionalità della barriera epiteliale promuovendo inoltre lo sviluppo della risposta immunitaria. Aumentata infatti rispetto ai controlli la produzione di cellule B (CD19+CD27+) con parallela diminuzione di IgA e IgG, marcatori di attività immunitaria. Tale risposta si è in particolare osservata in bambini IgE-sensibili [68,69]. Con il supplemento di *L. rhamnosus* GG sembrerebbe essere ridotto anche il rischio cumulativo di eczema nei primi sette anni di vita rispetto al placebo (42,6% vs 66,1%) [70].

Nei nuovi nati, *L. rhamnosus* GG sembrerebbe inoltre **aiutare nell'eradicazione di enterococchi vancomicina-resistenti**, responsabili di svariate infezioni urinarie e ospedaliere, soprattutto in soggetti immunocompromessi [71]. Sempre nella popolazione pediatrica, questo probiotico ha dimostrato di diminuire anche il rischio di infezioni gastrointestinali e respiratorie rispetto al placebo [72].

Passando agli adulti, la somministrazione di *L. rhamnosus* GG **sembrerebbe aiutare nella gestione e prevenzione della diarrea associata a chemioterapici** aiutando quindi i pazienti nell'adesione alla terapia. Effetti positivi anche nel decorso clinico della patologia nonostante ulteriori approfondimenti siano necessari considerando la complessità del campo oncologico [72,73].

## **L. RHAMNOSUS GG IN GINECOLOGIA**

Nonostante non ci siano limiti fissi nel descrivere un microbiota vaginale sano a causa di variazioni intra e interindividuali (età, stile di vita, etnia, livelli ormonali, ecc.), le specie dominanti (>70%) appartengono al genere *Lactobacillus*.

Come visto prima, tra le infezioni che più turbano l'equilibrio microbico genitale troviamo la **candidiasi vulvovaginale** (candida). Nonostante la terapia con antimicotici (clotrimazolo per esempio), l'8-9% delle donne è soggetto a recidive, con anche più di 3 o 4 episodi in un anno, configurandosi uno stato di candida ricorrente. Considerando come

alla base dell'infezione ci sia un disequilibrio del microbiota locale, un suo ripristino sembrerebbe essere una valida strategia per combattere le recidive. Tra i probiotici più efficaci in tal senso troviamo ***L. rhamnosus* GG**, che **ha infatti mostrato un significativo impatto nei principali fattori di virulenza inclusa l'adesione, l'invasione, l'estensione delle ife** con conseguente riduzione e prevenzione del danno epiteliale caratteristico dell'invasione del patogeno.

#### **L. RHAMNOSUS GG E CANDIDIASI ORALE**

L'attività di *L. rhamnosus* GG è stata dimostrata anche a livello del cavo orale in modelli in vitro di candidiasi orale nei quali questo probiotico ha mostrato di proteggere gli epiteli orali contro l'infezione da *C. albicans* prevenendo l'adesione, l'invasione e il danno fungino, azioni guidate, almeno in parte, dalla riprogrammazione metabolica da parte del lievito patogeno dovuta alla limitazione dei nutrienti causata da *L. rhamnosus* GG [74].

### **L. RHAMNOSUS GG, INTOLLERANZA AL LATTOSIO E ALLERGIA AL LATTE VACCINO**

L'**intolleranza al lattosio** accomuna ormai più del 75% della popolazione mondiale. La somministrazione di prebiotici quali i galatto-oligosaccaridi ha però dimostrato di alleviarne la sintomatologia. L'azione sarebbe mediata, tra gli altri, anche dal ceppo *L. rhamnosus* GG [75].

Più rara, ma più grave, è poi l'**allergia al latte vaccino**. Colpisce il 2-3% dei neonati

richiedendo quindi particolari formulazioni e/o un prolungato allattamento al seno.

Sulla base dell'ampiamente dimostrato ruolo dei probiotici nell'influenzare la risposta immunitaria, una sua diretta introduzione nell'alimentazione in formula per neonati ha mostrato di accelerare l'acquisizione di tolleranza nei neonati con allergia al latte vaccino, influenzando in parte la restante comunità batterica intestinale. Un miglioramento rispetto al placebo è stato registrato anche nella **sintomatologia correlata a colite e dolore addominale in concomitanza di dieta lactose-free** [76,77].

Peraltro, *L. rhamnosus* GG è da tempo e **ampiamente utilizzato nell'industria casearia per aumentare il contenuto probiotico di prodotti quali yogurt e formaggi** incrementandogli al contempo la conservazione.

### **L. RHAMNOSUS GG E COSTIPAZIONE**

**Difficoltà a defecare, dolore addominale, senso di non completo svuotamento** sono tra i sintomi più comuni e, talvolta, invalidanti della costipazione, un problema noto a buona parte della popolazione. Tra le cause più comuni troviamo una dieta scorretta (povera di fibre, frutta e verdura), scarsa idratazione, alcuni farmaci, stress, gravidanza, vita sedentaria e patologie del tratto gastrointestinale. La maggior parte di queste condizioni, se non tutte, hanno però dimostrato **correlazione con un alterato microbioma intestinale**. In presenza di costipazione la disbiosi è infatti un comune

denominatore. Da ciò ne deriva l'ipotesi di intervenire con probiotici nel ristabilire l'equilibrio fisiologico. Ricordando che non tutti i probiotici sono uguali, numerosi sono gli studi atti a valutare l'efficacia di diversi ceppi in questo contesto. Tra quelli **con i risultati migliori** troviamo **L. rhamnosus GG**. Importante, tuttavia, considerare come sia stato somministrato **spesso in combinazione con fibre prebiotiche** (frutto-oligosaccaridi) non permettendo di distinguere i singoli effetti [45]. Oltre a fibre prebiotiche, in caso di costipazione *L. rhamnosus GG* ha portato a **effetti positivi sui rumori intestinali** di 103 pazienti con IBS se somministrato insieme ad altri ceppi (*Lactobacillus rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* Bb99, e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS) [78]. La singola somministrazione non sembrerebbe tuttavia efficace sull'uomo [79].

## AZIONE SINERGICA

I microrganismi spesso fanno squadra. Sia i patogeni nell'invadere l'ospite, sia i batteri "buoni" nel difenderlo. Ma **non tutti i microrganismi buoni, messi uno a fianco all'altro, hanno un'azione sinergica**. Alle basi del sinergismo ci può essere, anzitutto, la proto-cooperazione a livello trofico (i prodotti di un microrganismo fungono da nutrimento per un altro e viceversa). Inoltre, un microrganismo può modificare l'ambiente in cui vive favorendo la proliferazione dell'altro (ad esempio i microrganismi aerobi consumano l'ossigeno favorendo la proliferazione di batteri anaerobi obbligati). **I microrgani-**

**smi possono inoltre cooperare attraverso una protezione reciproca da patogeni o agenti antibatterici**, ad esempio partecipando alla creazione di biofilm o producendo sostanze antimicrobiche verso altri microrganismi.

**Un rapporto sinergico è stato osservato anche tra S. boulardii e L. rhamnosus GG** nei confronti, in particolare, di *Escherichia coli*. Alcuni ceppi di *E. coli*, definiti enterotossigeni (ETEC), rappresentano **una delle cause più comuni di diarrea del viaggiatore o dei bambini nei paesi in via di sviluppo**.

Dopo l'adesione all'epitelio dell'intestino tenue, infatti, questi ceppi di *E. coli* sviluppano un'infezione che è veicolata da fattori di colonizzazione e virulenza con tossine termo-stabili. Come rimedio efficace agli ETEC, numerosi studi sostengono l'utilizzo di probiotici sia nella prevenzione sia nel trattamento. Tra questi, *L. rhamnosus GG* ha mostrato di **antagonizzare parzialmente l'adesione del patogeno in vitro**, probabilmente attraverso la competizione con il sito di ancoraggio e/o la secrezione di metaboliti antimicrobici. **A ciò si associa un'attività antinfiammatoria in risposta all'infezione**, andando a regolare l'espressione di chemochine e citochine. Analogamente, il ceppo CNCM I-1079 di *S. boulardii* ha mostrato di contrastare l'adesione di *E. coli* (sempre in vitro) e il conseguente processo infiammatorio. Perché, dunque, non somministrarli insieme?

A dimostrarne il valore aggiunto di una loro combinazione è infatti lo studio di F. Moens et al. [80]. Simulando in vitro le condizioni dell'ambiente intestinale, questo studio suggerisce che:

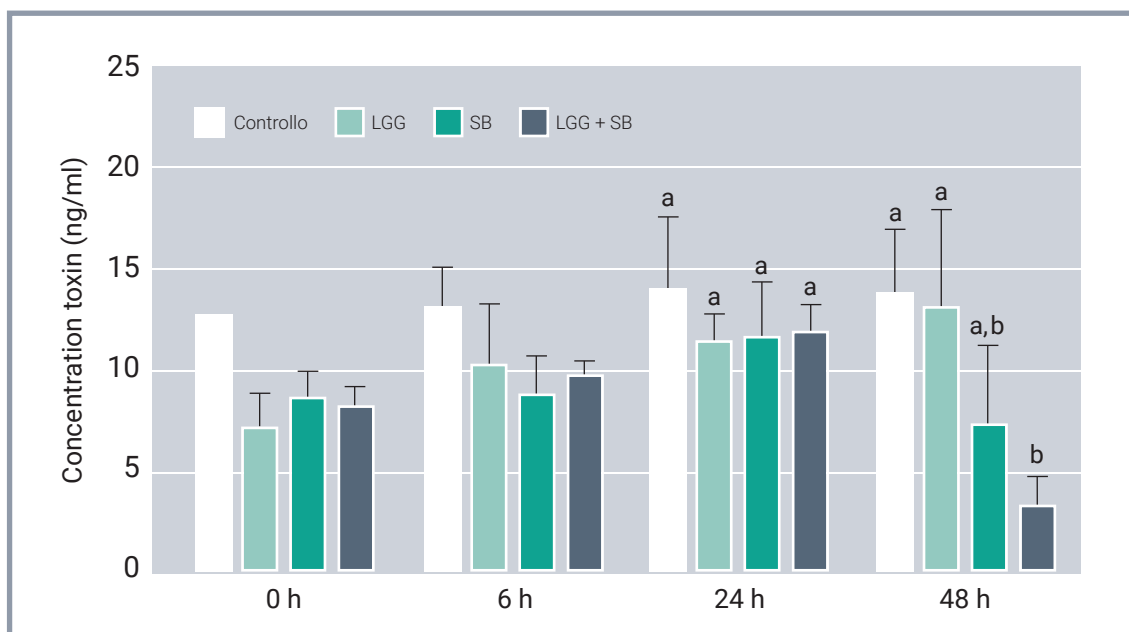


**Figura 1.** Tossina da *Escherichia coli* (ETEC) in un microbiota del colon di un donatore adulto. Concentrazione media (ng / ml) ( $\pm$  deviazione standard) della tossina ETEC presente nel surnatante in diversi momenti durante le incubazioni del colon a breve termine utilizzando come background il microbiota intestinale di donatore adulto integrato con ETEC (n = 3). *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Saccharomyces boulardii* (SB) sono stati testati separatamente e insieme (LGG + SB) rispetto a un'incubazione di controllo (CTRL). Le differenze statisticamente significative tra le condizioni sperimentali (cioè CTRL, LGG, SB e LGG + SB) dopo 24 e 48 h di incubazione sono evidenziate assegnando lettere diverse (P < 0,05).

- **i due ceppi possono proliferare insieme** senza mostrare effetti antagonisti;
- rispetto alla singola coltura, la co-incubazione ha mostrato un **incremento maggiore nella produzione di acidi grassi a corta catena** (*short chain fatty acids*, SCFAs) **da parte del microbiota del colon** (aumento di butirrato indotto da *L. rhamnosus* GG e di propionato indotto da *S. boulardii* CNCM I-1079);
- **in presenza di ETEC**, in condizioni che mimavano una disbiosi del microbioma colonico, la somministrazione dei due ceppi in combinazione ha fatto registrare una **riduzione della concentrazione del patogeno superiore al 40%**, unitamente ad una **riduzione dei livelli dell'enterotossina** [80].

Lo stesso modello in vitro è stato anche utile per dimostrare i vantaggi dell'impiego combinato di *L. rhamnosus* GG e *S. boulardii* CNCM I-1079 **durante la somministrazione di amoxicillina:acido clavulanico**. Un successivo studio, infatti, ha mostrato che, rispetto all'uso dei due ceppi singolarmente, **l'impiego combinato può meglio preservare l'ecosistema microbico intestinale** in termini di mantenimento dei livelli di SCFAs e di maggiore abbondanza dei batteri simbiotici appartenenti alla famiglia delle *Bifidobacteriaceae*. Inoltre, la presenza del lievito *S. boulardii* CNCM I-1079 si è dimostrata in grado di preservare la sopravvivenza del ceppo batterico *L. rhamnosus* GG [81].

| Indicazione                        | S. boulardii | L. rhamnosus GG | References                                                                |
|------------------------------------|--------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Diarrea acuta adulto               | ++           |                 | (McFarland 2018)                                                          |
| Diarrea acuta pediatrico           | +++          | ++              | (McFarland 2018)<br>(Ozkan 2007)<br>(Oberhelman 1999)<br>(Szajewska 2020) |
| Diarrea associata ad antibiotici   | ++           | +++             | (McFarland 2018)<br>(Hempel 2012)<br>(Mantegazza 2017)                    |
| Colite da <i>C. difficile</i>      | +            |                 | (Szajewska 2015)                                                          |
| Diarrea del viaggiatore            | ++           |                 | (Kollaritsch 1993)<br>(McFarland 2007)                                    |
| Enterocolite necrotizzante         | ++           | ++              | (Gao 1997)<br>(Morgan 2020)                                               |
| Diarrea da nutrizione enterale     | +            |                 | (Bleichner 1997)                                                          |
| Sindrome dell'intestino irritabile | +            |                 | (Maupas 1983)                                                             |
| Malattia di Crohn                  | +            |                 | (Plein K 1993)<br>(Guslandi 2000)                                         |
| Colite ulcerosa                    | +            |                 | (Guslandi 2003)                                                           |
| Eradicazione <i>H. pylori</i>      | ++           | ++              | (Dang 2014)                                                               |

**Tabella 2:** Possibili indicazioni terapeutiche di S. boulardii e L. rhamnosus GG in campo gastroenterologico.

A prescindere quindi dall'infezione da *E. coli*, gli effetti antipatogenici e di sostegno di metaboliti utili per il nostro organismo, come gli SCFAs, potrebbero essere sfruttati in altre condizioni di alterazione microbica (**disbiosi**) indotta, ad esempio, dalla terapia antibiotica, condizioni tuttavia ancora da testare [80].

## Punti chiave

*L. rhamnosus GG è uno dei ceppi probiotici più studiati al mondo.*

*Esiste un rapporto sinergico tra S. boulardii e L. rhamnosus GG nei confronti di specifici ceppi di Escherichia coli definiti enterotossigeni (ETEC), che rappresentano una delle cause più comuni di diarrea del viaggiatore o dei bambini nei paesi in via di sviluppo.*

# L'intestino al centro

Considerando il costante aumento dell'attenzione rivolta ai microrganismi con i quali conviviamo e delle evidenze che ne sostengono un ruolo sempre più ampio nel mantenimento della salute, quella che stiamo vivendo può esser vista come una **microbiome revolution**. Il microbioma (quello intestinale soprattutto), con le sue potenzialità e criticità, sta infatti rivoluzionando i concetti, le dinamiche e le prospettive future della medicina. **Stanno infatti cambiando radicalmente le conoscenze sul funzionamento degli organi** (apparato digerente, pancreas, fegato, polmone, apparato genito-urinario), **le cui superfici sono colonizzate da comunità microbiche fin dall'infanzia**. Ed è sempre più evidente la specificità delle caratteristiche di queste popolazioni in base alla zona e allo stato del nostro corpo. Non solo. Stanno emergendo sempre più dati sul fatto che numerosi processi fisiopatologici presentano aspetti in qualche modo correlati al microbioma.

Si parla poi sempre più spesso di **medicina di precisione o personalizzata**, per la quale le ricerche sul microbioma intestinale sono certamente un importante capitolo. Fondamentale è infatti la **connessione che si è dimostrata in primis tra il nostro intestino e distretti molto distanti per funzione e posizione anatomica**, primo fra tutte l'asse intestino-cervello.

Intervenendo in modo mirato sui microrganismi intestinali potrebbe infatti essere pos-

sibile intervenire nella prevenzione e/o trattamento di molte patologie, da quelle infiammatorie dell'apparato digerente all'artrite reumatoide, dalla sclerosi multipla al Parkinson e l'Alzheimer, dalla colangite sclerosante alla pancreatite cronica, dall'obesità alla sindrome metabolica.

Compito della ricerca nei prossimi anni sarà quello di caratterizzare ulteriormente la composizione del microbioma intestinale nelle varie condizioni patologiche, capire quale sia il suo ruolo e quello delle sue modificazioni nel decorso delle malattie e identificare gli strumenti e le modalità con cui manipolarlo in modo mirato e persistente nel tempo. **L'utilizzo dei probiotici e, forse ancora di più, di formulazioni contenenti più ceppi**, probabilmente capaci di indurre cambiamenti più profondi nel microbioma, **potrebbe essere una strada percorribile con successo**.

In conclusione, sta emergendo una visione enterocentrica della salute complessiva dell'organismo. Una rivoluzione nella rivoluzione, che mette l'intestino al centro di tanti processi fisiopatologici impensabili fino a pochi anni fa. Quando avremo, grazie agli sforzi della ricerca, un quadro più definito saremo probabilmente in grado di intervenire a livello terapeutico in diverse specialità mediche, dalla dermatologia alla neurologia, dalla pneumologia alla ginecologia, modulando in maniera precisa e sempre più personalizzata il microbioma intestinale.

**RIFERIMENTI**

1. Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8, 103 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
2. McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC. Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:124. Published 2018 May 7. doi:10.3389/fmed.2018.00124
3. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, in Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, 2001
4. Hill, C., Guarner, F., Reid, G. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506–514 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
5. Sniffen JC, McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC. Choosing an appropriate probiotic product for your patient: An evidence-based practical guide. *PLoS One*. 2018 Dec 26;13(12):e0209205. doi: 10.1371/journal.pone.0209205. PMID: 30586435; PMCID: PMC6306248.
6. Pais P, Almeida V, Yilmaz M, Teixeira MC. *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *J Fungi (Basel)*. 2020 Jun 4;6(2):78. doi: 10.3390/jof6020078. PMID: 32512834; PMCID: PMC7344949.
7. Kelesidis T, Pothoulakis C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. March 2012:111-125. doi:10.1177/1756283X11428502
8. Stier H, Bischoff SC. Influence of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clin Exp Gastroenterol*. 2016;9:269-279. Published 2016 Sep 13. doi:10.2147/CEG.S111003
9. Terciolo C, Dapoigny M, Andre F. Beneficial effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on clinical disorders associated with intestinal barrier disruption. *Clin Exp Gastroenterol*. 2019;12:67-82. Published 2019 Feb 11. doi:10.2147/CEG.S181590
10. Canonici A, Pellegrino E, Siret C, Terciolo C, Czerucka D, Bastonero S, et al. (2012) *Saccharomyces boulardii* Improves Intestinal Epithelial Cell Restitution by Inhibiting  $\alpha\beta 5$  Integrin Activation State. *PLoS ONE* 7(9): e45047.
11. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines - Probiotics and prebiotics 2017 <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-english-2017.pdf>
12. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 1989; 96: 981–8.
13. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, et al. Prevention of  $\beta$ -lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 439–48
14. Villarruel G, Rubio DM, Lopez F, et al. *Saccharomyces boulardii* in acute childhood diarrhoea: a randomized, placebo-controlled study. *Acta Paediatr* 2007; 96: 538–41.
15. Billoo AG, Memon MA, Khaskheli SA, et al. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhea. *World J Gastro enterol* 2006 28: 4557–60.
16. Dang Y, Reinhardt JD, Zhou X, Zhang G. The effect of probiotics supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during eradication therapy: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Nov 3;9(11):e111030. doi: 10.1371/journal.pone.0111030. PMID: 25365320; PMCID: PMC4217763.
17. Ozkan TB, Sahin E, Erdemir G, Budak F. Effect of *Saccharomyces boulardii* in children with acute gastroenteritis and its relationship to the immune response. *J Int Med Res*. 2007 Mar-Apr;35(2):201-12. doi: 10.1177/147323000703500204. PMID: 17542407.
18. Z. Abbas, J. Yakoob, W. Jafri, Z. Ahmad, Z. Azam, M.W. Usman, S. Shamim, M. Islam. Cytokine and clinical response to *Saccharomyces boulardii* therapy in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized trial *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 26 (2014), pp. 630-639
19. Maupas JL, Champemont P, Delforge M. Treatment of irritable bowel syndrome with *Saccharomyces boulardii*: a double-blind, placebo-controlled study. *Med Chir Dig* 1983; 12: 77–9.
20. Gao X, Wang Y, Shi L, Feng W, Yi K. Effect and Safety of *Saccharomyces boulardii* for Neonatal Necrotizing Enterocolitis in Pre-term Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Trop Pediatr*. 2020 Jun 4;fmaa022. doi: 10.1093/tropej/fmaa022. Online ahead of print.
21. Bleichner G, Bléhaut H, Mentec H, Moyse D. *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Intensive Care Med*. 1997 May;23(5):517-23. doi: 10.1007/s001340050367.
22. Czerucka, D., Piche, T. And Rampal, P. (2007), Review article: yeast as probiotics –*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26: 767-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
23. E.C. Lee, C. Ortiz, J. Wang, J.E. Lee, S. Ho Probiotic *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 prevents outbreak-associated *Clostridium difficile*-associated cecal inflammation in hamsters *American J.* (2016)
24. T.C. Hing, S. Ho, D.Q. Shih, R. Ichikawa, M. Cheng, J. Chen, X. Chen, I. Law, R. Najarian, C.P. Kelly, R.L. Gallo, S.R. Targan, C. Pothoulakis, H.W. Koon The antimicrobial peptide cathelicidin modulates *Clostridium difficile*-associated colitis and toxin A-mediated enteritis in mice *Gut*, 62 (2013), pp. 1295-1305

25. J.M. Kim, J.Y. Lee, Y.M. Yoon, Y.-K. Oh, J. Youn, Y.-J. Kim NF-kappa B activation pathway is essential for the chemokine expression in intestinal epithelial cells stimulated with *Clostridium difficile* toxin A Scand. J. Immunol., 63 (2006), pp. 453–460
26. Kollaritsch H, Holst H, Grobara P, et al. Prophylaxis of traveller's diarrhoea with *Saccharomyces boulardii*: results of a placebo-controlled double-blind study. Fortschr Med 1993; 111: 152–6.
27. McFarland L. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. Travel Med Infect Dis 2007; 5: 97–105.
28. Plein K, Hotz J. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea – a pilot study. Z Gastroenterol 1993; 31: 129–34
29. Guslandi M, Mezzi G, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. Dig Dis Sci 2000; 45: 1462–4.
30. Guslandi M, Giollo P, Testoni PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003; 15: 697–8.
31. Wang C, Li W, Wang H, et al. *Saccharomyces boulardii* alleviates ulcerative colitis carcinogenesis in mice by reducing TNF- $\alpha$  and IL-6 levels and functions and by rebalancing intestinal microbiota. BMC Microbiol. 2019;19(1):246. Published 2019 Nov 6. doi:10.1186/s12866-019-1610-8
32. Murzyn A, Krasowska A, Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Łukaszewicz M, Dziadkowiec D. The effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans*-infected human intestinal cell lines Caco-2 and Intestin 407. FEMS Microbiol Lett. 2010 Sep 1;310(1):17–23. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02037.x. Epub 2010 Jun 16. PMID: 20629753.
33. Anna Krasowska, Anna Murzyn, Agnieszka Dyjankiewicz, Marcin Łukaszewicz, Dorota Dziadkowiec, The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation, FEMS Yeast Research, Volume 9, Issue 8, December 2009, Pages 1312–1321, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00559.x>
34. Kunyeit L, K A AA, Rao RP. Application of Probiotic Yeasts on *Candida* Species Associated Infection. J Fungi (Basel). 2020;6(4):189. Published 2020 Sep 25. doi:10.3390/jof6040189
35. Annelise C. Costanza, Samuel D. Moscovitch, Hugo C.C. Faria Neto, Evandro T. Mesquita Probiotic therapy with *Saccharomyces boulardii* for heart failure patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial International Journal of Cardiology DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.11.034>
36. Themistoklis Katsimichas, Alexios S Antonopoulos, Alexandros Katsimichas, Tomohito Ohtani, Yasushi Sakata, Dimitris Tousoulis, The intestinal microbiota and cardiovascular disease, Cardiovascular Research, Volume 115, Issue 10, 1 August 2019, Pages 1471–1486, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz135>
37. Zanello et al., *Saccharomyces Boulardii* effects on gastrointestinal diseases - Curr Issues Mol Biol 11:47-58 [http://healthygoods.com/media/Research/Articles/Saccharomyces\\_Boulardii/saccharomyces\\_boulardii\\_effects\\_gastrointestinal\\_diseases.pdf](http://healthygoods.com/media/Research/Articles/Saccharomyces_Boulardii/saccharomyces_boulardii_effects_gastrointestinal_diseases.pdf)
38. Villar-García J, Güerri-Fernández R, Moya A, et al. Impact of probiotic *Saccharomyces boulardii* on the gut microbiome composition in HIV-treated patients: A double-blind, randomised, placebo-controlled trial. PLoS One. 2017;12(4): e0173802. Published 2017 Apr 7. doi:10.1371/journal.pone.0173802
39. Raoul Herbrecht, Yasmine Nivoix, *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: An Adverse Effect of *Saccharomyces boulardii* Probiotic Administration, Clinical Infectious Diseases, Volume 40, Issue 11, 1 June 2005, Pages 1635–1637, <https://doi.org/10.1086/429926>
40. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci, A, Allende, A, Bolton, D, et al., Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. EFSA Journal 2017; 15( 3):4664, 177 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4664
41. Hibberd PL, Kleimola L, Fiorino AM, Botelho C, Haverkamp M, et al. (2014) No Evidence of Harms of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 in Healthy Elderly—A Phase I Open Label Study to Assess Safety, Tolerability and Cytokine Responses. PLOS ONE 9(12): e113456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113456>
42. Komine Y, Watanabe M, Soutome T, Uchino T, Dobashi M, et al. (2018) Maternal Consumption of *Lactobacillus* GG During Pregnancy Prevents Infant Eczema at 1 Year of Age. J Allergy Ther 9: 277. doi:10.4172/2155-6121.1000277
43. Shenwei Zhang, Jee-Hwan Oh, Laura M. Alexander, Mustafa Özçam, Jan-Peter van Pijkeren, d-Alanyl-d-Alanine Ligase as a Broad-Host-Range Counterselection Marker in Vancomycin-Resistant Lactic Acid Bacteria. Journal of Bacteriology Jun 2018, 200 (13) e00607-17; DOI: 10.1128/JB.00607-17
44. Ahlroos, T. and Tynkkynen, S. (2009), Quantitative strain-specific detection of *Lactobacillus rhamnosus* GG in human faecal samples by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology, 106: 506–514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04018.x>
45. Granata M, Brandi G, Borsari A, Gasbarri R, Gioia DD. Synbiotic yogurt consumption by healthy adults and the elderly: the fate of bifidobacteria and LGG probiotic strain. Int J Food Sci Nutr. 2013 Mar;64(2):162–8. doi: 10.3109/09637486.2012.718742. Epub 2012 Sep 5. PMID: 22946635.
46. Capurso L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. J Clin Gastroenterol. 2019 Mar;53 Suppl 1:S1–S41. doi: 10.1097/MCG.0000000000001170. PMID: 30741841
47. Keita Nishiyama, Koichi Nakamata, Shintaro Ueno, Akari Terao, Ni Putu Desy Aryantini, I. Nengah Sujaya, Kenji Fukuda, Tadasu Urashima, Yuji Yamamoto & Takao Mukai (2015) Adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* mucus-bind-

- ing factor to mucin and extracellular matrix proteins, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79:2, 271-279, DOI: 10.1080/09168451.2014.972325
48. Chen, J., Wan, CM., Gong, ST. et al. Chinese clinical practice guidelines for acute infectious diarrhea in children. *World J Pediatr* 14, 429–436 (2018).
49. Gao X, Wang Y, Shi L, Feng W, Yi K. Effect and Safety of *Saccharomyces boulardii* for Neonatal Necrotizing Enterocolitis in Pre-term Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Trop Pediatr*. 2020 Jun 4;fmaa022. doi: 10.1093/tropej/fmaa022.
50. Elmadfa, I., Klein, P., & Meyer, A. (2010). Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 416-420. doi:10.1017/S0029665110001710
51. Fong, F., Kirjavainen, P. & El-Nezami, H. Immunomodulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)-derived soluble factors on antigen-presenting cells of healthy blood donors. *Sci Rep* 6, 22845 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep22845>
52. De Keersmaecker, S.C., Verhoeven, T.L., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J. and Nagy, I. (2006), Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiology Letters*, 259: 89-96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x>
53. Rasinkangas P, Reunanen J, Douillard FP, et al. Genomic characterization of non-mucus-adherent derivatives of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals genes affecting pilus biogenesis. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(22):7001-7009. doi:10.1128/AEM.02006-14
54. Ardita CS, Mercante JW, Kwon YM, Luo L, Crawford ME, Powell DN, Jones RM, Neish AS. Epithelial adhesion mediated by pilin SpaC is required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced cellular responses. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Aug;80(16):5068-77. doi: 10.1128/AEM.01039-14. Epub 2014 Jun 13. PMID: 24928883; PMCID: PMC4135752.
55. von Ossowski I, Pietilä TE, Rintahaka J, Nummenmaa E, Mäkinen VM, et al. (2013) Using Recombinant Lactococci as an Approach to Dissect the Immunomodulating Capacity of Surface Piliation in Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLOS ONE* 8(5): e64416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064416>
56. Lebeer, S., Claes, I.J.J., Verhoeven, T.L.A., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C.J. (2011), Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microbial Biotechnology*, 4: 368-374. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00199.x>
57. Fang Yan & D. Brent Polk (2012) Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases, *Gut Microbes*, 3:1, 25-28, DOI: 10.4161/gmic.19245
58. Li Y, Yang S, Lun J, Gao J, Gao X, Gong Z, Wan Y, He X, Cao H. Inhibitory Effects of the *Lactobacillus rhamnosus* GG Effector Protein HM0539 on Inflammatory Response Through the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B Axis. *Front Immunol*. 2020 Oct 5;11:551449. doi: 10.3389/fimmu.2020.551449. PMID: 33123130; PMCID: PMC7573360.
59. Petrova MI, Imholz NCE, Verhoeven TLA, Balzarini J, Van Damme EJM, et al. (2016) Lectin-Like Molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG Inhibit Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Biofilm Formation. *PLOS ONE* 11(8): e0161337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161337>
60. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JN, Shanman R, Johnsen B, Shekelle PG. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2012 May 9;307(18):1959-69. doi: 10.1001/jama.2012.3507. PMID: 22570464.
61. Mantegazza C, Molinari P, D'Auria E, Sonnino M, Morelli L, Zuccotti GV. Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. *Pharmacol Res*. 2018 Feb;128:63-72. doi: 10.1016/j.phrs.2017.08.001. Epub 2017 Aug 19
62. Agamennone, V., Krul, C.A.M., Rijkers, G. et al. A practical guide for probiotics applied to the case of antibiotic-associated diarrhea in The Netherlands. *BMC Gastroenterol* 18, 103 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0831-x>
63. Hauser G, Salkic N, Vukelic K, Jajacknez A, Stimac D. Probiotics for standard triple *Helicobacter pylori* eradication: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Medicine (Baltimore)*. 2015 May;94(17):e685. doi: 10.1097/MD.0000000000000685.
64. Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, Lescano AG, Meza R, Madico G. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr*. 1999 Jan;134(1):15-20. doi: 10.1016/s0022-3476(99)70366-5.
65. Szajewska H, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, Shamir R, et al. Use of probiotics for management of acute gastroenteritis: a position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Apr;58(4):531–9
66. Morgan RL, Preidis GA, Kashyap PC, Weizman AV, Sadeghirad B, McMaster Probiotic, Prebiotic, and Synbiotic Work Group. Probiotics Reduce Mortality and Morbidity in Preterm, Low-Birth-Weight Infants: A Systematic Review and Network Meta-analysis of Randomized Trials. *Gastroenterology*. 2020 Aug;159(2):467-480. doi: 10.1053/j.gastro.2020.05.096.
67. Chandrasekharan B, Saeedi BK, Alam A, et al. Interactions between commensal bacteria and enteric neurons, via FPR1 induction of ROS, increase gastrointestinal motility in mice. *Gastroenterology*. 2019; 157(1):179-92. doi: 10.1053/j.gastro.2019.03.045.

68. Horvath A, Dziechciarz P, Szajewska H. Meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Jun;33(12):1302-10. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04665.x. Epub 2011 Apr 20. PMID: 21507030.
69. M. Nermes J. M. Kantele T. J. Atosuo S. Salminen E. Isolauri Interaction of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG with skin and gut microbiota and humoral immunity in infants with atopic dermatitis - Clinical & experimental allergy <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03657.x>
70. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Isolauri E (2007) Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 119:1019–1021
71. Viljanen M, Savilahti E, Haahela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M (2005) Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 60:494–500
72. FDA 2019 - Generally Recognized as Safe (GRAS) Determination for the Intended Use of *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, <https://www.fda.gov/media/134877/download>
73. Giuseppe L. Banna, Francesco Torino, Francesco Marletta et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Overview to Explore the Rationale of Its Use in Cancer - *Front. Pharmacol.* 2017 doi.org/10.3389/fphar.2017.00603
74. Mailänder-Sánchez D, Braunsdorf C, Grumaz C, Müller C, Lorenz S, Stevens P, et al. (2017) Antifungal defense of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG is mediated by blocking adhesion and nutrient depletion. *PLoS ONE* 12(10): e0184438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184438>
75. Arnold JW, Simpson JB, Roach J, Bruno-Barcena JM, Azcarate-Peril MA. Prebiotics for Lactose Intolerance: Variability in Galacto-Oligosaccharide Utilization by Intestinal *Lactobacillus rhamnosus*. *Nutrients.* 2018; 10(10):1517. Published 2018 Oct 16. doi:10.3390/nu10101517
76. Berni Canani, R., Sangwan, N., Stefka, A. et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J* 10, 742–750 (2016). <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.151>
77. Basturk, A., Isik, İ., Atalay, A. et al. Investigation of the Efficacy of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Infants With Cow's Milk Protein Allergy: a Randomised Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 12, 138–143 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9516-1>
78. Kajander K et al. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 2005. 22: 387-394.
79. Wojtyniak, K., Szajewska, H. Systematic review: probiotics for functional constipation in children. *Eur J Pediatr* 176, 1155–1162 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00431-017-2972-2>
80. Moens F, Duysburgh C, van den Abbeele P, Morera M, Marzorati M. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces cerevisiae* boulardii exert synergistic antipathogenic activity in vitro against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Benef Microbes.* 2019 Dec 9;10(8):923-935. doi: 10.3920/BM2019. 0064. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31965838.
81. Deysburgh et al, *Beneficial Microbes*, in press.

