

I probiotici

LUCIO CAPURSO¹

¹Primario Emerito di Gastroenterologia.

Pervenuto su invito il 15 marzo 2016.

Riassunto. Sulla base della letteratura disponibile, che include trial ben disegnati, revisioni sistematiche e meta-analisi, sono stati definiti alcuni effetti benefici dei probiotici come classe generale. È però indispensabile che ogni prodotto, e perciò ogni ceppo, probiotico abbia evidenze sufficienti per supportare i benefici che gli sono attribuiti. Vi è inoltre necessità di una maggiore chiarezza nella comunicazione sui dati raccolti al consumatore e, ancora di più, alle autorità regolatorie.

Parole chiave. *Bifidobacteria*, disbiosi, *Lactobacilli*, meccanismi d'azione.

Probiotics.

Summary. On the basis of the currently available literature, which includes well-designed clinical trials, systematic reviews and meta-analyses, certain effects can be ascribed to probiotics as a general class. It is accepted that sufficient evidence has accumulated to support the concept of benefits of certain probiotics; it is reasonable to expect that evidence gained from a defined class of live microbes might be appropriate for certain, but not all, health outcomes. Moreover there is a need for clear communication to consumers and health-care providers of the activity of differentiated probiotic products.

Key words. *Bifidobacteria*, dysbiosis, *Lactobacilli*, mechanisms of action.

Introduzione

La denominazione “fermento lattico” (“lactic acid bacteria” del mondo anglosassone) è stata tradizionalmente usata per identificare i batteri produttori di acido lattico come risultato finale del catabolismo fermentativo degli zuccheri. Il termine “lattico” è quindi da riferirsi all'acido prodotto e non al substrato utilizzato. La convinzione che i fermenti lattici possano produrre un effetto benefico e curare alcune malattie ha portato allo sviluppo dei probiotici. Storicamente i batteri lattici sono stati utilizzati per preservare il latte in cui si trovano spontaneamente e per facilitarne la digeribilità. Il latte fermentato fu anche utilizzato per curare la diarrea: secondo una leggenda, il re di Francia Enrico I fu guarito da questo disturbo con lo yogurt turco¹. In Europa lo yogurt fu lanciato sul mercato a Parigi nel 1906 da Elia Metchnikoff, mentre negli anni '30 prodotti contenenti *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* Shirota (dal nome del suo scopritore) furono lanciati rispettivamente negli USA e in Giappone.

All'inizio del XX secolo Elia Metchnikoff² ipotizzava che la presenza di batteri nell'intestino potesse influenzare positivamente la salute e la longevità dell'uomo: era infatti convinto che la flora batterica fosse responsabile sia della produzione di tossine sia del controllo dell'autointossicazione. La prova empirica della correttezza delle sue ipotesi gli proveniva dall'osservazione epidemiologica della longevità delle popolazioni balcaniche che consumavano yogurt in grandi quantità. Metchnikoff scriveva: «Poiché la

fermentazione lattica è così utile nell'arrestare i fenomeni putrefattivi in generale, perché non utilizzarla allo stesso scopo nel tubo digerente?». E ancora: «Coloro che non conoscono questi problemi potrebbero essere sorpresi dalla raccomandazione di ingerire grandi quantità di microbi, visto che è convinzione comune che i microbi siano pericolosi. Questa ipotesi è errata. Vi sono molti microbi utili, e fra di essi i lattobacilli hanno una onorevole posizione». Nello stesso Istituto Pasteur si aveva la conferma di questa teoria da parte di Henry Tissier³, che identificò nell'intestino di neonati sani batteri a forma di bastoncino o a Y, i *Bifidobacteria*, che erano invece pressoché assenti in neonati con diarrea. Ne derivò l'ipotesi che la loro presenza potesse essere in qualche modo causa dello stato di salute degli infanti. In realtà, l'ipotesi di Metchnikoff e di Tissier appare oggi corretta, se si considera che, durante la vita di un uomo, circa 60 tonnellate di cibo attraversano il tubo digerente, interferendo con il microbiota intestinale.

La parola “probiotico” è stata usata per la prima volta da Lilley e Stillwell nel 1965⁴ per descrivere sostanze secrete da un batterio che stimolano l'accrescimento di un altro batterio, con un'attività perciò opposta a quella di antibiotico. Nel 1971 Sperti⁵ la usò per descrivere estratti tissutali in grado di stimolare l'accrescimento microbico. Solo da Parker⁶, nel 1974, il termine “probiotico” fu usato per identificare un supplemento dietetico di origine microbica con la dizione «organismi e sostanze che contribuiscono al bilancio microbico intestinale». Fuller nel 1989⁷ la modificò in «integratore alimentare contenente microbi vivi che ha affetto benefico sull'ospite migliorando

il suo bilancio microbico intestinale». Quest'ultima modifica rimuove la parola "sostanze" che avrebbe potuto includere anche gli antibiotici e stressa la vitalità dei microbi.

La definizione oggi internazionalmente accettata di "probiotico" è quella enunciata nel 2001 dalla FAO e dalla WHO: «Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host»^{8,9}; in altre parole, il termine "probiotico" si riferisce a una funzione e non a un'unità tassonomica. In Italia, il Ministero della Salute¹⁰ ha definito i probiotici «microorganismi che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l'organismo».

Negli USA, i probiotici sono disponibili come integratori alimentari e non possono essere utilizzati per "curare" una patologia. In Europa è accettato che i probiotici abbiano "claim" per la salute, che devono però essere supportati da trial ben condotti in popolazioni selezionate o in volontari sani. La European Food Safety Authority (EFSA) ha peraltro respinto più dell'80% dei claim sottoposti^{11,12}, per insufficiente dimostrazione scientifica. È necessario ricordare che i probiotici possono essere utilizzati come alimento (qualsiasi sostanza o prodotto processato, parzialmente processato o non processato che sia in grado di essere utilizzato dall'uomo), farmaco (qualsiasi sostanza, diversa da un alimento, in grado di influenzare la struttura o la funzione del corpo) bioterapeutico (preparato contenente microrganismi vivi con effetto terapeutico nell'uomo). Comunque, alla base dell'attività dei probiotici è la loro capacità di interagire con le cellule epiteliali intestinali dell'ospite e con altre cellule umane attraverso meccanismi fisico-chimici o segnali immuni simili a quelli del microbiota commensale.

L'utilizzo sempre più diffuso delle tecniche di metagenomica dovrebbe aiutare nel futuro a stabilire con più chiarezza il ruolo dei probiotici, in particolare nella definizione di microbiota "normale", e quindi della possibilità di una sua ristorazione. Infatti, la disbiosi è il principale bersaglio per l'uso dei probiotici, grazie a una grande varietà di meccanismi ben documentati che vanno dal blocco dei siti di adesione dei patogeni, alla loro distruzione da parte delle batteriocine o delle proteasi, alla regolazione del sistema immune. Anche se la clinica supporta l'efficacia di alcuni ceppi di probiotici, non è sempre evidente il legame fra questi meccanismi d'azione con specifici claim. È anche necessario definire le caratteristiche e i criteri necessari per la produzione industriale di un ceppo probiotico sia che esso debba essere utilizzato come alimento, farmaco o bioterapeutico.

La tabella 1 riporta i criteri necessari per l'utilizzo a livello industriale di un ceppo come probiotico.

In generale, i microrganismi utilizzati hanno una lunga storia di uso sicuro e sono riferiti come Generally Recognized As Safe (GRAS); devono essere di origine umana, vivi, resistenti al pH acido dello stomaco e a quello alcalino della bile e dell'intestino tenue, capaci di aderire alla mucosa collocandosi fra altri batteri vivi (il microbiota) e di esercitare attività metabolica.

È inoltre necessaria l'identificazione a livello di ceppo sia per motivi di sicurezza sia per il tipo di azione. La specie deve essere identificata mediante la determinazione della sequenza nucleotidica del DNA che codifica per il 16S RNA, mentre il ceppo deve essere caratterizzato mediante il profilo di macrorestrizione del cromosoma determinato mediante elettroforesi in campo pulsato (pulsed field gel electrophoresis - PFGE).

Tabella 1. Criteri necessari per l'utilizzo industriale dei probiotici.

Criteri	Proprietà
Criteri di sicurezza	<ul style="list-style-type: none"> ■ Origine, lunga storia di uso sicuro ■ Non caratteri di patogenicità ■ Non caratteri di virulenza ■ Non capacità di produrre tossine ■ Non veicolo e trasferimento di geni di antibioticoresistenza: determinazione del pattern di antibiotico resistenza ■ Valutazione della mancata infezione di soggetti immunocompromessi ■ Valutazione di attività metaboliche (per es., produzione di D-lattato, deconiugazione dei sali biliari). ■ Sorveglianza post-marketing
Criteri tecnologici	<ul style="list-style-type: none"> ■ Stabilità genetica ■ Vitalità durante processazione e immagazzinamento ■ Resistenza ai fagi ■ Possibilità di produzione in larga scala
Criteri funzionali	<ul style="list-style-type: none"> ■ Tolleranza a HCl, succhi intestinali, bile ■ Adesione alla superficie mucosa intestinale ■ Effetti validati e documentati sulla salute
Criteri fisiologici desiderabili	<ul style="list-style-type: none"> ■ Immunomodulazione. Attività antagonista verso patogeni GI come <i>Helicobacter Pylori</i>, <i>Candida albicans</i> ■ Proprietà antimutageniche e anticarcinogeniche

Tabella 2. Principali specie utilizzate come probiotici.

Lactobacilli	Bifidobacteria	Altri batteri	Lieviti
Lactobacillus <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei/paracasei</i> <i>Lb. crispatus</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. salivarius</i> <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Bifidobacterium <i>Bf. Adolescentis</i> <i>Bf. animalis subsp. lactis</i> <i>Bf. Bifidum</i> <i>Bf. Breve</i> <i>Bf. longum subsp. infantis</i> <i>Bf. longum subsp. longum</i>	Bacillus <i>Bc. cereus</i> <i>Bc. coagulans</i> <i>Bc. clausii</i> <i>Bc. cubtilis</i> <i>Esch. coli Nissle 1917</i>	Saccharomyces <i>Cerevisiae var. boulardii</i> <i>Saccharomyces spp.</i>
Leuconostoc <i>Le. citreum</i> <i>Le. mesenteroides</i> <i>Oenococcus oeni</i>		Propionibacterium <i>Pr. Acidipropionici</i> <i>Pr. freudenreichii</i> <i>Pr. Jensenii</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	
Pediococcus <i>Pd. acidilactici</i> <i>Pd. pentosaceus</i> <i>Sporolactobacillus inulinus</i>			

Viene inoltre raccomandato il deposito in una collezione internazionale di ceppi. Le principali specie utilizzate come probiotici sono riportate nella tabella 2.

Tuttavia, le differenze filogenetiche sono estremamente ampie fra *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, che appartengono a fila diversi, ma lo sono anche fra i *Lactobacilli* come *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. plantarum*. Anche fra ceppi diversi della stessa specie ci può essere considerevole differenza genomica: due ceppi si possono considerare della stessa specie se hanno un rapporto relativo di legame DNA: DNA del 70% di omologia dei genomi. Queste differenze devono fare presumere che la risposta nell'uomo sia diversa, fatto che non è sempre tenuto in considerazione ed è spesso trascurato nella presentazione dei dati di probiotici di ceppo diverso.

Le specie microbiche utilizzate devono quindi rispettare le seguenti caratteristiche:

- essere sicure per l'impiego umano (riferimento ai criteri emanati dall'EFSA);
- non essere portatrici di antibiotico-resistenze acquisite e/o trasmissibili;
- essere attive e vitali a livello intestinale in quantità tale da giustificare gli eventuali effetti benefici;
- essere in grado di aderire alla mucosa intestinale, persistere e moltiplicarsi;
- essere in grado di conferire un beneficio fisiologico;
- essere correttamente identificate in etichetta in accordo con le denominazioni validate da organismi internazionali.

Meccanismi d'azione

Il razionale d'uso dei probiotici si basa sul microbial interference treatment (MIT)¹³, atto a favorire il man-

tenimento di un microbiota equilibrato, ostacolando in tal modo i microrganismi patogeni ed essendo capaci di inviare segnali alle cellule epiteliali intestinali (CEI) e ai macrofagi. Una recente revisione sintetica¹⁴ ha analizzato questo aspetto e in particolare sono da considerare le seguenti attività.

INDUZIONE DI HEAT SHOCK PROTEIN CITOPROTETTIVE

Le CEI quando vengono a contatto con stress termici, osmotici, ossidativi azionano un sistema di "tolleranza" basato su l'induzione delle heat shock protein (*hsp*) cellulari che includono la *hsp25*, che stabilizza l'actina, e la *hsp72*, che previene la denaturazione cellulare, mantenendo efficienti le tight junction fra le CEI, promuovendo la funzione della barriera mucosa.

MODULAZIONE DEI SISTEMI DI SEGNALAZIONE INFIAMMATORI NELLE CEI

Le CEI sono munite di sistemi di segnalazione chiave per l'attivazione della risposta immune a una varietà di stimoli:

- NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): complesso proteico funzionante come fattore di trascrizione, presente nella sua forma inattiva nel citoplasma, legato alla molecola inibitoria IκB. Quando pervengono gli stimoli pro-infiammatori, IκB è fosforilato da IKK, complesso di enzimi coinvolto nella propagazione della risposta cellulare all'infiammazione, che permette a NFκB di migrare dal citoplasma al nucleo e attivare la trascrizione dei geni effettori.

Alcuni probiotici, come LGG ATCC 53103, modulano la degradazione di I κ B α attraverso la generazione di specie reattive all'ossigeno (reactive oxygen species - ROS). Altri probiotici stimolano NF κ B a incrementare la secrezione di citochine: *Bifidobacterium lactis* BB12 può indurre l'attivazione di RelA, una subunità trascrizionalmente attiva di NF κ B, per incrementare la produzione di IL-6; *Lactobacillus plantarum* inibisce l'attività di NF κ B e la degradazione di I κ B *in vitro*; *Bifidobacterium lactis* BB12 può indurre l'attivazione di RelA, una subunità trascrizionalmente attiva di NF κ B, per incrementare la produzione di IL-6; *Lactobacillus plantarum* inibisce l'attività di NF κ B e la degradazione di I κ B *in vitro*; *Bacteroides thetaiotaomicron* e *E. coli* 0157:H7 diminuiscono l'attività infiammatoria di NF κ B attraverso un'aumentata produzione di RelA e di IL-8 grazie a un segnale PPAR γ -dipendente.

- PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma): è un recettore nucleare di tipo II presente prevalentemente nel tessuto adiposo, nel colon e nei macrofagi, che può regolare l'infiammazione intestinale e l'omeostasi. PPAR γ essendo ridotto nelle CEI di pazienti con malattie infiammatorie intestinali (IBD) può avere un ruolo nell'attenuare la colite inibendo l'attività di NF κ B: il trattamento con ceppi specifici di probiotici può aumentare l'espressione di PPAR γ e migliorare quindi l'infiammazione. *Lactobacillus crispatus* M247 usa il perossido di idrogeno come segnale-trasduttore molecolare per incrementare l'attivazione di PPAR γ .
- ERK (extracellular-signal-regulated kinases): sono molecole di segnalazione secrete da una cellula nella matrice extracellulare al fine di trasmettere un segnale a una cellula bersaglio che si trova a una distanza variabile di molecole di segnalazione, in base ai recettori che esprime sulla superficie o nel citoplasma.
- JNK (c-Jun N-terminal kinases): appartengono alla famiglia delle MAPK (mitogen-activated protein kinase) e rispondono a stimoli stressanti come citochine, irradiazione ultravioletta, calore, shock osmotico.
- SOCS (suppressor of cytokine signaling): è una proteina regolatrice con feedback negativo sul segnale delle citochine.
- STAT (signal transducer and activator of transcription): mediano molti aspetti dell'immunità cellulare, proliferazione, apoptosi e differenziazione.

REGOLAZIONE DELL'APOPTOSI

Alcuni probiotici possono regolare l'apoptosi delle CEI rappresentando un'utile strategia per il controllo delle infezioni intestinali:

- *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 può attivare una proteina Akt kinasi B anti-apoptotica e inibire una p38 MAPK pro-apoptotica in CEI sti-

molate con TNF- α , IL-1 α - o IFN γ . Altri esperimenti indicano che LGG produce due proteine, p75 e p40, che promuovono la proliferazione cellulare e attivano in maniera dipendente la Akt anti-apoptotica.

- *Saccharomyces boulardii* previene l'apoptosi indotta per attivazione della caspasi-3 nelle infezioni da EPEC (Enteropathogenic Escherichia Coli).

PRODUZIONE DI BATTERIOCINE

I probiotici producono peptidi ad attività antibiotica denominate "batteriocine" in grado di contrastare alcuni patogeni.

Le batteriocine possono essere classificate in 4 gruppi sulla base della loro massa molecolare, termostabilità, sensibilità enzimatica, presenza di aminoacidi modificati e modalità di azione.

1. *Batteriocine classe I*: piccoli peptidi inibitori, includono nisina e altri lantibiotici.
2. *Batteriocine classe II*: peptidi stabili al calore con massa molecolare <10 kDa.
3. *Batteriocine classe III*: antibiotici peptidici labili al calore e massa molecolare >30 kDa.
4. *Batteriocine classe IV*: glicoproteine o lipoproteine.

Esempi specifici del modo in cui i probiotici utilizzano i loro meccanismi d'azione sono riportati nella tabella 3.

La reale efficacia di questi meccanismi di interferenza con l'ospite devono essere verificati in trial clinici. È però necessario ricordare che il numero degli articoli scientifici sull'uso dei probiotici in campo medico è in crescita costante, ma la loro qualità è molto eterogenea. Studi condotti in maniera non corretta possono dare origine ad allarmismi ingiustificati. Secondo un panel di esperti^{38,39}, i ricercatori dei trial per dimostrare vantaggi per la salute di un probiotico devono:

1. Prima di iniziare lo studio, formulare sempre un'ipotesi precisa e concreta con parametri ed endpoint appropriati discriminando fra un trial disegnato per testare un'ipotesi e uno per sostanziare un definito vantaggio per la salute. Gli end point devono essere facilmente quantificabili, come per esempio la normalizzazione dell'alvo e il tempo necessario per ottenerla nei soggetti con diarrea, o la diminuzione ecografica del grasso nel fegato in soggetti con steatosi o il dosaggio di parametri laboratoristici di facile esecuzione come la proteina C-reattiva.
2. Utilizzare una dose disponibile in prodotti commerciali.
3. Garantire un sample size sufficiente, tale da assicurare una potenza adeguata al raggiungimento della significatività statistica, supportando o respingendo l'ipotesi enunciata a priori, tenendo in considerazione gli aggiustamenti necessari per i test multipli.

Tabella 3. Utilizzo dei meccanismi d'azione nei probiotici.		
	Meccanismo d'azione	Esempi specifici
Modifica del pH luminale	Produzione di acido lattico e acido acetico con riduzione del pH luminale che determina un ambiente sfavorevole per i patogeni	<i>Lactobacillus spp.</i> : riduzione pH-dell'accrescimento dei patogeni ¹⁵ VSL#3: <i>in vivo</i> riduzione pH luminale in pazienti con colite ulcerosa ¹⁶
Produzione di batteriocine	Batteriocine inibiscono l'accrescimento e la virulenza dei patogeni con attività a spettro limitato ad alcuni ceppi batterici o ad ampio spettro esteso a numero maggiore di batteri e lieviti	<i>Lactobacillus salivarius</i> : mutante deficiente nel gene per batteriocine, non è capace di proteggere i topi vs infezione da <i>Listeria monocytogenes</i> ¹⁷ <i>L. salivarius subs.</i> : produce batteriocine ad ampio spettro
Rottura della comunicazione interbatterica	Gli autoinducer sono molecole di segnalazione prodotte e secrete dai batteri che formano la base del <i>quorum sensing</i> (comunicazione batterica)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5: rompe il <i>quorum sensing</i> e l'espressione dei geni di <i>Escherichia</i> O157:H7 correlati alla virulenza ¹⁸
Innalzamento della funzione della barriera mucosa	Incremento della produzione e secrezione di muco da parte delle cellule epiteliali. Ridotta adesione e invasione delle cellule epiteliali da parte di batteri enteroinvasivi e loro ridotta traslocazione. Incremento della produzione di β -defensine 2 da parte delle cellule epiteliali. Stabilizzazione delle tight junction e ridotta secrezione di cloruro e acqua Rigenerazione delle cellule epiteliali e riduzione dell'apoptosi	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v: incrementa l'espressione del gene per la produzione di mucina <i>in vitro</i> ¹⁹ e l'adesione alle cellule del colon attraverso un meccanismo mannosio-specifico ²⁰ <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> aderisce alle cellule del colon <i>in vitro</i> ²¹ <i>E. coli</i> Nissle 1917 incrementa l'espressione del gene per la produzione di mucina e di β -defensine da parte delle cellule del colon ²² <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> riducono la secrezione di cloruro e acqua in risposta ai patogeni ²³ Pretrattamento con <i>Lactobacillus</i> dell'epitelio intestinale riduce la rottura delle tight junctions da parte di <i>E. coli</i> patogeno ²⁴ VSL#3 previene la redistribuzione delle proteine delle tight junction all'esposizione ai patogeni <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG previene l'apoptosi citochine-mediata delle cellule epiteliali ²⁵ <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Clostridium butyricum</i> stimolano la proliferazione delle cellule epiteliali nei ratti ²⁶
Resistenza alla colonizzazione	I probiotici competono con i patogeni per i nutrienti e per l'adesione in una nicchia microbica	<i>L. casei rhamnosus</i> aderisce alle cellule del colon, riduce l'accrescimento dei patogeni e persiste nel tratto GI ²⁷ <i>E. coli</i> Nissle 1917 inibisce l'accrescimento di <i>E. coli</i> produttore tossine-Shiga ²⁸
Effetti immunologici	Il cross-talk batteri-epitelio abilita i probiotici a influenzare il GALT e le risposte immuni innate e adattative. I TLR giocano un ruolo centrale nel mediare questo processo Incremento promozione di cellule-B a plasmacellule e produzione di immunoglobuline Attivazione e modulazione di macrofagi, cellule-T e cellule NK	In pazienti con pouchite VSL#3 è stato associato a incremento delle citochine anti-infiammatorie e a riduzione delle pro-infiammatorie, a riduzione della nitrossido-sintasi inducibile e dell'attività della matrice metalloproteinasi ²⁹ In pazienti con colite ulcerosa <i>L. plantarum</i> 299v incrementa la secrezione di IL-10 da macrofagi e cellule-T ³⁰

segue **Tabella 3.**

	Meccanismo d' azione	Esempi specifici
Effetti immunologici		<p>In pazienti con m. di Crohn <i>L. casei</i> e <i>Lactobacillus bulgaricus</i> riducono significativamente la liberazione di TNF-α dalla mucosa infiammata³¹</p> <p><i>E. coli</i> Nissle 1917 mostra effetti anti-infiammatori locali e sistemici in un modello murino di sepsi indotta da lipopolisaccaridi³²</p> <p>In bambini con gastroenterite <i>L. rhamnosus</i> GG incrementa le concentrazioni circolanti di IgA, IgG e IgM^{33,34}</p> <p>Il pretrattamento con probiotici prima della vaccinazione per il tifo determina un incremento del titolo di anticorpi³⁵</p> <p><i>L. casei</i> Shirota induce la produzione di IL-12 e controlla la risposta citochinica infiammatoria di macrofagi, cellule-T e NK^{36,37}</p> <p><i>L. casei</i> Shirota e <i>Bifidobacterium breve</i> somministrati preventivamente a pazienti con cancro biliare riducono la concentrazione postoperatoria di IL-6, PCR e leucociti</p> <p><i>L. acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium longum</i> incrementano l'attività fagocitica dei macrofagi in un modello murino</p>

- Assicurare un'adeguata durata del trial per raggiungere gli end point previsti.
- Arruolare volontari, se necessari, che riflettano la popolazione generale (per es., età, sesso, BMI).
- Caratterizzare il prodotto probiotico, includendo dimostrazioni della sua vitalità e delle sue caratteristiche biologiche e genetiche all'inizio e al termine dello studio.

L'utilizzo di end point chiaramente definiti e possibilmente riproducibili è inoltre di fondamentale importanza per sottoporre alle autorità regolatorie il riconoscimento di claim definiti.

In realtà, c'è un continuo incremento di pubblicazioni sull'argomento, come evidenziato da PubMed che ne riporta 12.950 dal 1970 al 2015 per il tema "Probiotics" e 2603 per "Clinical Trials and Probiotic".

La tabella 4 riporta le Revisioni Cochrane su malattie digestive e probiotici.

La validità di questi studi è in genere limitata dalle differenze fra i ceppi utilizzati, dai dosaggi non confrontabili e dalla diversa stabilità, elementi che non permettono di confrontarli con la stessa metodologia che si usa per confrontare i farmaci. Di conseguenza, i risultati sono eterogenei riguardo la durata, i ceppi o la loro combinazione e gli esiti clinici.

Verso il 2020: postbiotici, metabiotici, paraprobiotici e probiotici ingegnerizzati

Spesso i probiotici possono essere inefficaci. I motivi per una mancata risposta terapeutica a un trattamento con probiotici della disbiosi possono essere⁵⁸:

- bersaglio sbagliato;
- probiotico sbagliato o non efficace come sperato;
- somministrazione in un momento sbagliato;
- età e situazione nutrizionale del paziente.

In realtà, uno dei maggiori problemi nello sviluppo di probiotici efficaci è la limitata quantità di informazioni sul microbiota intestinale e sui prodotti del metabolismo batterico sia nella situazione di salute sia nelle malattie. Sono attualmente oggetto di ricerca diverse possibilità per superare queste difficoltà:

- Ricostruzioni metaboliche basate prevalentemente sulla generazione dell'inferenza dei geni sulle proteine che legano i geni a singole categorie funzionali, al di là della mappa genotipo-fenotipo. Si ottengono in tal modo modelli di rappresentazioni matematiche del metabolismo a livello del genoma (genome-scale metabolic models - GEM) che vengono utilizzati come potenti strumenti per lo studio del metabolismo microbico in rapporto alla salute dell'ospite^{59,60}. Con questa metodica sono state definite le caratteristiche dei postbiotici,

Tabella 4. Revisioni Cochrane su malattie digestive e probiotici.			
Revisione	Valutazione efficacia	Casistica	Risultato
Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease ⁴⁰	Mantenimento della remissione nella m. di Crohn	7 piccoli studi	Non effetto significativo vs placebo per <i>E. coli</i> Nissle (RR 0,43, LC95%=0,15-1,20) <i>Lactobacillus GG</i> dopo remissione chirurgica (RR 1,58, LC95%=0,30-8,40) o medica (RR 0,83, LC95%=0,25-2,80). Non effetto significativo vs aminosalicilati o azatioprina (RR 0,67, LC95%=0,13-3,30). Non effetto significativo nei bambini per <i>Lactobacillus GG</i> vs placebo (RR 1,85, LC95%=0,77-4,40)
Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity ⁴¹	Prevenzione allergia o ipersensibilità al cibo negli infanti	6 studi (n= 2080 infanti, ma dati sull'esito solo in 1549)	5 studi riportano una significativa riduzione (RR 0,82, LC95%=0,70-0,95) Eterogeneità significativa fra gli studi
Probiotics for treatment of Clostridium difficile-associated colitis in adults ⁴²	Trattamento della colite da antibiotici associata a <i>C. difficile</i>	4 studi includibili hanno considerato l'uso di probiotici + antibiotici (vancomicina o metronidazolo)	Evidenza insufficiente per raccomandare i probiotici in aggiunta alla terapia antibiotica
Probiotics for induction of remission in Crohn's disease ⁴³	Induzione della remissione nella m. di Crohn	Trials in Cochrane Central Register of Controlled Trials	Un solo studio (n=11) includibile. 4/5 pazienti nel gruppo probiotici vs 5/6 del gruppo placebo andavano in remissione (OR 0,80; LC95%=0,04-17,20). Evidenza insufficiente
Probiotics for treating eczema ⁴⁴	Trattamento dell'eczema	12 RCT (n=781 partecipanti)	Non differenza significativa in favore del trattamento con probiotici
Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and/or steatohepatitis ⁴⁵	NAFLD e steatoepatite	Non RCT	La mancanza di RCT non rende possibile una valutazione sull'efficacia dei probiotici
Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis ⁴⁶	Trattamento della vaginite batterica		MNZ/pro (OR 0,09 LC95%=0,03-0,26) pro/estriolo (OR 0,02 LC95%=0,00-0,47) Evidenza non sufficiente
Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis ⁴⁷	Probiotici vs placebo o terapia medica per remissione CU attiva	RCT in MEDLINE, EMBASE, Cochrane IBD/FBD Review Group Specialised	Nessuno degli studi inclusi riporta tassi significativi di miglioramento clinico con probiotici vs placebo o vs terapia medica standard
Probiotics for treating acute infectious diarrhoea ⁴⁸	Probiotici nella diarrea acuta infettiva	63 trial (n=8014 partecipanti) Prevalentemente infanti e bambini	Probiotici riducono la durata della diarrea: differenza media 24,76 ore; LC95%=15,9-33,6 ore; diarrea ≥4 gg (RR=0,41LC95%=0,32-0,53); frequenza evacuazioni al secondo gg (differenza media 0,8LC95%=0; 0,4-1,14). Probiotici sono sicuri e hanno un chiaro effetto benefico

segue Tabella 4.			
Revisione	Valutazione efficacia	Casistica	Risultato
Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis ⁴⁹	Mantenimento della remissione nella CU	4 studi (n=587): 3 trial probiotici vs mesalazina 1 vs placebo	Non differenze significative probiotici vs mesalazina probiotici vs placebo
Probiotics for patients with hepatic encephalopathy ⁵⁰	Probiotici vs placebo o non intervento nella encefalopatia epatica	7 studi (n=550 partecipanti)	Non differenza significativa fra probiotici e non trattamento per: mortalità (2% vs 2%; RR=0,7); non recupero (50% vs 69%): RR=0,72; eventi avversi (3% vs 9%): RR=0,34; Ammoniemia significativamente più bassa nel gruppo probiotici dopo 1 mese (-2,99 μ mol/L; LC95% -5,70-0,29). Non differenza per tutti questi parametri fa probiotici e lattulosio
Probiotics for treating persistent diarrhoea in children ⁵¹	Trattamento della diarrea persistente nei bambini	4 trial (n=464 partecipanti)	Probiotici riducono la durata della diarrea persistente (differenza media =4,02gg, LC95%=4,61-3,43gg)
Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia ⁵²	Probiotici nella prevenzione VAP	8 RCT, 1083 partecipanti, pro vs placebo	Uso probiotici diminuisce l'incidenza di VAP (OR=0,70, LC 95%=0,52=0,95) Evidenza di bassa qualità
Probiotics for preventing gestational diabetes ⁵³	Probiotici vs altri metodi per la prevenzione del diabete gestionale	11 trial (256 donne)	Riduzione del tasso di diabete (RR= 0,38, LC95%=0,20-0,70)
Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis (NEC) in preterm infants ⁵⁴	Probiotici profilattici somministrati per via enterica versus placebo o non trattamento nella prevenzione della NEC severa o della sepsi in infanti pre-termine	20 studi, 5529 infanti	Probiotici enterali riducono significativamente l'incidenza di NEC severa, NEC (stadio II o più, RR=0,43, LC 95%=0,33- 0,5) e la mortalità (RR= 0,65, LC95% =0,52 -0,81). Non infezioni sistemiche nel gruppo probiotici. Efficaci <i>Lactobacilli</i> da soli o in combinazione con <i>Bifidobacteria</i>
Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections ⁵⁵	Probiotici vs placebo in prevenzione URTI in pazienti di ogni età	13 RCT, 3720 partecipanti inclusi bambini, adulti (età intorno 40) e soggetti più anziani	Probiotici meglio di placebo in partecipanti con: 1 episodio (OR 0,53; LC95%=0,37-0,76, P<0,001) Evidenza bassa qualità, evidenza 3 episodi (OR 0,53; LC95%= 0,36-0,80 p=0,002) -0,80, P=0,002, evidenza Evidenza bassa qualità
Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea ⁵⁶	Probiotici per la prevenzione della diarrea da antibiotici (DDA) nei bambini	23 studi (n=3938) trattamento con <i>Bacillus spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Lactobacilli spp.</i> , <i>Lactococcus spp.</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Saccharomyces spp.</i> , o <i>Streptococcus spp.</i> , soli o in combinazione	Incidenza DAA 19% nel gruppo controllo vs 8% nel gruppo probiotici (RR 0,46, LC 95%=0,35-0,61). Non eventi avversi nel gruppo probiotici. Evidenza moderata

segue **Tabella 4.**

Revisione	Valutazione efficacia	Casistica	Risultato
Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis ⁵⁷	Prevenzione o trattamento della pouchite acuta o cronica	13 studi (517 partecipanti)	Pouchite acuta: non differenza fra <i>Lactobacillus</i> GG e placebo. Pouchite cronica: VSL#3 più efficace del placebo per mantenimento remissione (RR= 20,24, LC95% =4,28-95,81) Prevenzione della Pouchite: VSL#3 più efficace del placebo. (RR=1,50, LC95% =1,02-2,21). Evidenza bassa qualità

ovvero di qualsiasi molecola o attività metabolica prodotta dal metabolismo dei probiotici capace di conferire effetti benefici all'ospite. Con la GEM è possibile infatti esplorare la biosintesi di postbiotici attivi che permettono di migliorare e disegnare meglio le caratteristiche di futuri probiotici utilizzando l'ingegneria genetica. Postbiotici purificati sono stati proposti come alternative sicure per applicazioni cliniche come le malattie infiammatorie croniche intestinali⁶¹.

2. Selezione di sostanze bioattive, i "metabiotici", come componenti strutturali dei probiotici e/o loro metaboliti e/o molecole di segnalazione con struttura chimica determinata ed esatta facilmente dosabile⁶².
3. Cellule o frazioni di cellule microbiche inattivate, i "paraprobiotici", capaci di generare una risposta biologica influenzando in particolare la risposta immune dell'ospite^{63,64}. Si riducono in tal modo drasticamente i problemi dell'emivita del ceppo e dell'infezione del consumatore per traslocazione batterica.
4. Creazione di nuovi "probiotici ingegnerizzati" mediante la tecnologia del DNA ricombinante che permette di manipolare i batteri facendogli esprimere geni che rispondano alle esigenze specifiche. Esempi sono quelli di *E. coli* non patogeno che esprime proteine di superficie che legano e neutralizzano la tossina del colera e del ceppo modificato di *Lactococcus lactis*, ingegnerizzato a overprodurre IL-10⁶⁵.

Conclusioni

I probiotici hanno un'antica tradizione nel miglioramento dello stato nutrizionale e del benessere, ma anche per curare alcune malattie. Un uso più preciso, però, del termine "probiotico" sarebbe sicuramente utile per guidare i clinici e i consumatori a una loro più corretta utilizzazione.

Oggi si delineano nuove indicazioni basate sulle migliori conoscenze del microbiota intestinale e su forti evidenze scientifiche derivate da numerosi trial clinici di buona qualità.

Si valuta che negli USA nel 2014 l'1,6% degli adulti (3,9 milioni) e lo 0,5% dei bambini (294.000) abbiano utilizzato probiotici⁶⁶. Gli alimenti contenenti probiotici rappresentano il 90,1% del totale delle vendite per \$ 28,1 miliardi nel 2015 con un CAGR (Compound Annual Growth Rate) del 7,5%. Gli integratori rappresentano il 6,4% delle vendite totali per \$ 2,07 miliardi e un CAGR del 9,6%.

Il mercato europeo, dopo alcuni anni con un incremento del 5% per il settore degli alimenti, ha visto una diminuzione del 5% nel 2012 e dell'8% nel 2013 e si prevede un'ulteriore perdita del 9% fra il 2013 e il 2018. Questa situazione è conseguente alla mancanza di una definizione europea dei termini "batteri probiotici" e "probiotici" che ha influito negativamente sulla Health Claims Regulation (HCR): in più di 400 applicazioni sottomesse all'EFSA, nessun probiotico ha avuto esito favorevole. Inoltre, dal 14 dicembre 2012 non è più permesso in Europa l'uso del termine. Ci sono in effetti sul mercato, specie su quello degli integratori, moltissimi prodotti che spesso non rispettano i criteri minimi, come la definizione del ceppo, un'appropriata conta dei batteri vivi contenuti e della loro emivita e l'evidenza di una loro efficacia.

La International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics ha recentemente pubblicato un consensus su questi aspetti, richiamando l'attenzione sul fatto che i diversi attori interessati devono avere un ruolo nella definizione dei probiotici⁶⁷:

- i ricercatori devono generare dati di alta qualità che possano avere un impatto positivo sulla salute;
- l'industria deve chiedere e utilizzare prodotti di alta qualità e che garantiscano margini di guadagno con claim validati e comprensibili;
- le autorità regolatorie devono proteggere i consumatori;
- i consumatori devono pretendere informazioni credibili per prendere decisioni informate.

Conflitto di interessi: l'autore dichiara l'assenza di conflitto di interessi.

Bibliografia

1. Deeth H, Tamime A. Yogurt: nutritive and therapeutic aspects. *J Food Protect* 1981; 44: 78-86.
2. Metchnikoff E. *Essais optimistes*. Paris, 1907; The prolongation of life. Optimistic studies. Translated and edited by P. Chalmers Mitchell. London: Heinemann, 1907.
3. Tissier H. *Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourisson*. Thesis, Université de Paris, 1900.
4. Lilley DM, Stillwell RJ. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science* 1965; 147: 747-8.
5. Sperti GS. *Probiotics*. West Point, Connecticut: AVI Publishing, 1971.
6. Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health* 1974; 29: 4-8.
7. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-78.
8. FAO/WHO Expert Consultation. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria* (2001). (www.fao.org).
9. FAO/WHO. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* (2002). (www.fao.org).
10. Ministero della Salute. *Linee Guida Nutrizione/Probiotici*, 2005.
11. European Food Safety Authority (EFSA). *Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function*. *EFSA J* 2011; 9: 1984.
12. Katan MB. Why the European Food Safety Authority was right to reject health claims for probiotics. *Benef Microbes* 2012; 3: 85-9.
13. Donovan SM, Schneeman B, Gibson GR, et al. Establishing and evaluating health claims for probiotics. *Amer Soc Nutr Adv Nutri* 2012; 3: 723-5.
14. Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication. *Modulation of signaling pathways in the intestine*. *Gut Microbes* 2010; 1: 148-63.
15. Petrof EO, Claud EC, Sun J, et al. Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NFkB pathways and inhibits proteasome function. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1537-47.
16. Kim HG, Lee SY, Kim NR, et al. Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor- α production. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18: 1191-6.
17. Kim HG, Kim NR, Gim MG, et al. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits lipopolysaccharide-induced TNF- α production in THP-1 cells and endotoxin shock in mice. *J Immunol* 2008; 180: 2553-61.
18. Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor α -induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 2004; 72: 5308-14.
19. Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NFkB and MAPK signalling. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1442-52.
20. Lin YP, Thibodeaux CH, Pena JA, Ferry GD, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via c-Jun. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1068-83.
21. Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, et al. Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: 1018-30.
22. Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, et al. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J* 2007; 26: 4457-66.
23. Lin PW, Myers LE, Ray L, et al. *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1205-11.
24. Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Live and dead *Lactobacillus rhamnosus GG* decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 2005; 135: 1752-6.
25. Di Caro S, Tao H, Grillo A, et al. Effects of *Lactobacillus GG* on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 320-9.
26. Lin PW, Nasr TR, Berardinelli AJ, Kumar A, Neish AS. The probiotic *Lactobacillus GG* may augment intestinal host defense by regulating apoptosis and promoting cytoprotective responses in the developing murine gut. *Pediatr Res* 2008; 64: 511-6.
27. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 50959-65.
28. Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 2007; 132: 562-75.
29. Miettinen M, Lehtonen A, Julkunen I, Matikainen S. *Lactobacilli* and *Streptococci* activate NFkB and STAT signaling pathways in human macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 3733-40.
30. Chiu YH, Hsieh YJ, Liao KW, Peng KC. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. *Clin Nutr* 2010; 29: 131-40.
31. Kim SO, Sheikh HI, Ha SD, Martins A, Reid G. G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for *Lactobacillus rhamnosus*-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1958-71.
32. Arribas B, Rodriguez-Cabezas ME, Camuesco D, et al. A probiotic strain of *Escherichiacoli*, Nissle 1917, given orally exerts local and systemic anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 1024-33.
33. Menard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 2004; 53: 821-8.
34. Nishant T, Sathish KD, Arun KR, Hima BK, Raviteja Y. Bacteriocin producing probiotic lactic acid bacteria. *J Microbiol Biochem Technol* 2011; 3: 5.
35. Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 334:1-15.
36. Fayol-Messaoudi D, Berger CN, Coconnier-Polter M-H, Lievin-Le Moal V, Servin AL. pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71: 6008-13.
37. Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1103-8.
38. Gibson GR, Brummer RJ, Isolauri E, et al. The design of probiotic studies to substantiate health claims. *Gut Microbes* 2011; 2: 299-305.
39. Donovan SM, Schneeman B, Gibson GR, Sanders ME. Establishing and evaluating health claims for probiotics. *Adv Nutr* 2012; 3: 723-5.
40. Rolfe VE, Fortun PJ, Hawkey CJ, Bath-Hextall F. Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (4): CD004826.

41. Osborn DA, Sinn JK. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (4): CD006475.
42. Pillai A, Nelson R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (1): CD004611.
43. Butterworth AD, Thomas AG, Akobeng AK. Probiotics for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (3): CD006634.
44. Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (4): CD006135.
45. Lirussi F, Mastropasqua E, Orando S, Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (1): CD005165.
46. Senok AC, Verstraelen H, Temmerman M, Botta GA. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (4): CD006289.
47. Mallon P, McKay D, Kirk S, Gardiner K. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (4): CD005573.
48. Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (11): CD003048.
49. Naidoo K, Gordon M, Fagbemi AO, Thomas AG, Akobeng AK. Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (12): CD007443.
50. McGee RG, Bakens A, Wiley K, Riordan SM, Webster AC. Probiotics for patients with hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (11): CD008716.
51. Bernaola Aponte G, Bada Mancilla CA, Carreazo NY, Rojas Galarza RA. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; (8): CD007401.
52. Bo L, Li J, Tao T, et al. Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; (10): CD009066.
53. Barrett HL, Dekker Nitert M, Conwell LS, Callaway LK. Probiotics for preventing gestational diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; (2): CD009951.
54. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; (4): CD005496.
55. Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; (2): CD006895.
56. Goldenberg JZ, Lytvyn L, Steurich J, Parkin P, Mahant S, Johnston BC. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; (12): CD004827.
57. Singh S, Stroud AM, Holubar SD, Sandborn WJ, Pardi DS. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; (11): CD001176.
58. Ji B, Nielsen J. From next-generation sequencing to systematic modeling of the gut microbiome. *Front Genet* 2015; 6: 219.
59. Oberhardt MA, Palsson BØ, Papin JA. Applications of genome-scale metabolic reconstructions. *Mol Syst Biol* 2009; 5: 320.
60. Hamilton JJ, Reed JL. Software platforms to facilitate reconstructing genome-scale metabolic networks. *Environ Microbiol* 2014; 16: 49-59.
61. Tsilingiri K, Rescigno M. Postbiotics: what else? *Benef Microbes* 2013; 4: 101-7.
62. Shenderov BA. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. *Microb Ecol Health Dis* 2013; 24. doi: 10.3402/mehd.v24i0.20399. eCollection 2013.
63. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* 2011; 6: 261-74.
64. Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev* 2010; 23: 37-46.
65. Amalaradjou MA, Bhunia AK. Bioengineered probiotics, a strategic approach to control enteric infections. *Bioengineered* 2013; 4: 379-87.
66. National health statistics reports no 78, no 79, National Center for Health Statistics, 2015.
67. 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* 2014; 11: 506-14.