

Lactobacillus reuteri ATCC 55730 un probiotico documentato

Eamonn Connolly
Department of Research Biogaia AB
Bo 3242 Se-103 64 Stockholm Sweden
Email ec@biogaia.se

Tradotto ed elaborato da:
Dr Almerino Carrer
Pharma Consultant
Email acarrer@infinito.it

SOMMARIO

Lactobacillus reuteri è considerato una delle poche specie autoctone di Lattobacilli del tratto gastrointestinale umano ed è ampiamente usato, per le sue proprietà probiotiche, come trattamento per il riequilibrio della flora batterica gastrointestinale.

La sicurezza di *L. reuteri* ATCC 55730 è stata ripetutamente dimostrata in soggetti adulti sani, nei pazienti immunocompromessi, nei bambini, nei neonati a termine e prematuri, documentando che *L. reuteri* è un probiotico efficace e sicuro in tutti i gruppi di età.

Recenti dati clinici mostrano che *L. reuteri* ATCC 55730 colonizza l'epitelio gastrico ed intestinale nell'uomo e modula la risposta immune particolarmente attraverso le cellule CD4+ T-helper nell'ileo.

Questi dati confermano evidenze pre-cliniche in modelli animali e tali effetti immunomodulatori possono essere un meccanismo d'azione per spiegare le proprietà cliniche di *L. reuteri*, quali la prevenzione della diarrea, l'inibizione delle infezioni da patogeni e la conseguente risposta immune dell'ospite a questi patogeni, così come la potenziale modulazione della risposta immune dell'equilibrio Th1/Th2 nell'epitelio intestinale umano, una risposta che è stata collegata alla prevenzione ed al trattamento dell'allergia.


Questa review presenta i dati clinici accumulati sul *L. reuteri* e collega le osservazioni fatte sugli animali con le ultime evidenze cliniche nell'uomo.

INTRODUZIONE

Lactobacillus reuteri, una specie ben distinta¹, fu originariamente descritto da Gerhard Reuter nel 1980. *L. reuteri* è una specie eterofermentante (Tab. 1) che risiede nel tratto gastrointestinale (GI) dell'uomo e di tutti gli animali testati³⁻⁶ (Tab. 2) ed è considerato come una delle poche specie di *Lactobacillus* autoctone nell'uomo⁶.

Tabella 1

<i>Lactobacillus reuteri</i>	
Produzione di acido lattico in latte dalla fermentazione di:	lattosio, glucosio e galattosio
% (G+C) del DNA	40-42
Tipo di acido lattico prodotto	DL
Quantità di acido lattico prodotto	< 1 %
Idrolisi dell'arginina	positivo
Temperatura ottimale di sviluppo	37°-38 °C
Temperatura massima di sviluppo	45°-47°C
Sviluppo a 15°C	negativo
Metabolismo	eterofermentante



Morfologia di *L. reuteri* sviluppato in anaerobiosi.

Tabella 2
Distribuzione delle specie Lattobacilli nell'intestino dell'uomo e degli animali

Specie	Uomo	Maiale	Pollo	Bue	Cane	Topo	Ratto	Criceto
L. acidophilus gruppo ^b								
L. acidophilus (A-1)	?					?	?	
L. amylovorus (A-3)		M	?	+				
L. crispatus (A-2)	M		M					
L. gallinarum (A-4)			M					
L. gasseri (B-1)	M			+				
L. johnsonii (B-2)	+	+	M					
L. murinus/animalis		?	?	M	M	M	+	
L. intestinalis						M	M	
L. salivarius	M	M	M					
L. agilis		+	+					
L. ruminis	+			M				
L. vitulinis	+							
L. hamsteri								M
L. aviarius			+					
L. casei	+							
L. plantarum	+							
L. brevis	+							
L. reuteri	M	M	M	M	M	M	M	M

^aSimboli: **M** =maggior componente della specie *Lactobacillus*; **+** = occasionalmente riscontrato; **?** = in dubbio. ^b gruppo di omologia DNA da Johnson et al (ref. (57b)).

L'azione probiotica di *L. reuteri* è attribuita alla sua capacità di esercitare un effetto inibitorio sui microrganismi patogeni con una combinazione di diversi meccanismi inclusa la produzione di acido lattico, perossido di idrogeno, sostanze antimicrobiche e batteriocine⁴.

L. reuteri, come gli altri batteri lattici è capace convertire lo zucchero del latte (lattosio) in acido lattico e produrre perossido di idrogeno.

Inoltre, *L. reuteri* fermenta i carboidrati in acidi grassi a catena corta, es. acido acetico, ad effetto antibatterico.

Axelsson⁷ ha riportato che *L. reuteri* converte il glicerolo in una potente sostanza antimicrobica a largo spettro chiamata "**Reuterina**" (Fig. 1A e 1B).

Fig. 1A – Biosintesi di Reuterina

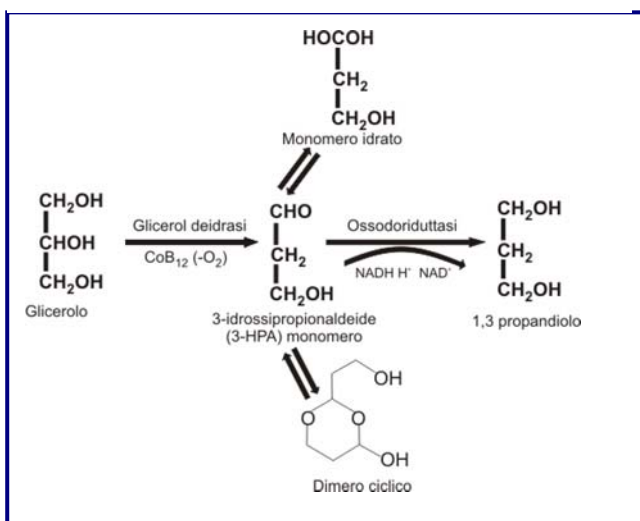
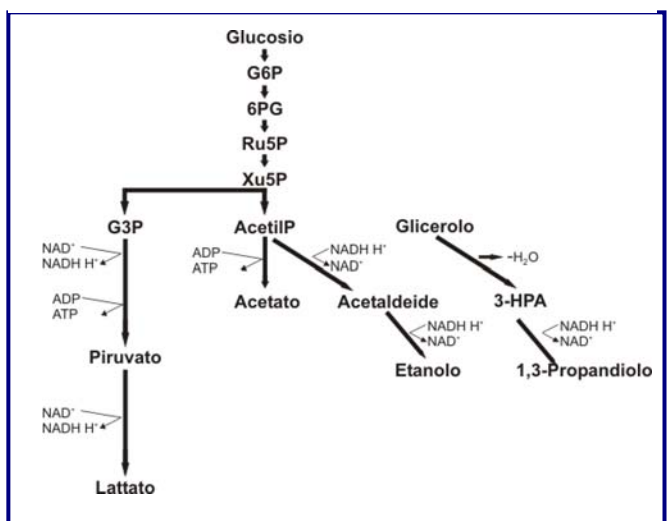


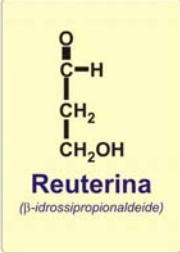
Fig. 1B - Eterofermentazione del glucosio da L. reuteri.



La Reuterina è un composto neutro, (3-idrossi-propionaldeide)^{3,21} a basso peso molecolare, solubile in acqua capace di inibire la crescita di molte specie batteriche incluse *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Stafilococco* così come lieviti, funghi, protozoi⁷ molti dei quali sono patogeni per l'uomo.

Figura 2

Patogeni inibiti da Reuterina



Reuterina
(1-idrossipropionaldeide)

Batteri

- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhimurium*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Shigella sp*
- *Campylobacter jejuni*
- *Bacillus subtilis*
- *Listeria monocytogenes*
- *Clostridium perfringens*
- *Helicobacter pylori*

Lieviti e funghi

- *Candida albicans*
- *Fusarium samiciensis*
- *Aspergillus flavus*

Protozoi

- *Eimeria tenella*
- *Eimeria acervulina*
- *Eimeria maxima*
- *Tripanosoma cruzi*

La Reuterina è secreta da *L. reuteri* durante la crescita anaerobica in presenza di glicerolo⁸ ed entrambe queste condizioni sono soddisfatte dall'ambiente intestinale umano. Chung⁹ ha infatti dimostrato che la Reuterina è sintetizzata in condizioni ambientali simili a quelle che esistono nel tratto di GI.

La sintesi di Reuterina è indotta dal contatto con gli altri batteri che si trovano nell'intestino umano, come *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stafilococco epidermidis*, *Bacillo megaterium*, *Clostridium sporogenes*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Streptococcus cremoris*.

Il gruppo α -idrossilico della Reuterina rende reattiva la sua funzione aldeidica, capace di reagire spontaneamente con i gruppi funzionali amminici e sulfidrilici disponibili nel lume intestinale. La Reuterina non è pertanto assorbita sistemicamente.

Recentemente è stato delucidata e documentata^{10,11} la struttura di un altro composto con effetto di antimicrobico prodotto da *L. reuteri*, la **Reutericiclina** (un acido tetramico),.

La Reutericiclina ha mostrato di esercitare un effetto inibitorio su molti batteri che sono patogeni per l'uomo o considerati contaminanti dei cibi, come *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, ed *Enterococcus fecium*.

Ulteriori studi hanno dimostrato che *L. reuteri* esercita una forte azione antibiotica sui patogeni del tratto GI, incluso l'*H. pylori*, ma che non influenza negativamente la normale microflora^{4, 12-14}.

La sopravvivenza e la colonizzazione nel tratto GI è collegata alla necessaria capacità dei batteri probiotici resistere al basso pH gastrico ed ai sali biliari.

L. reuteri ATCC 55730 non solo tollera il basso pH dello stomaco umano^{15, 16} ma sopravvive meglio di altri lattobacilli. L'aderenza alla mucosa intestinale e la crescita *in situ* sono proprietà indispensabili per esercitare l'azione probiotica e ciò è stato dimostrato per *L. reuteri* ATCC 55730^{4,12,17}.

Perciò, la somministrazione orale di *L. reuteri* ATCC 55730 permette di avere batteri vivi nell'intero tratto GI umano che vengono espulsi come tali attraverso le feci.

Figura 3

Antibiotico-resistenza di <i>L. reuteri</i>			
<i>Amoxicillina</i>	R	<i>Aztreonam</i>	R
<i>Ampicillina</i>	R	<i>Gentamicina</i>	R
<i>Dicloxacillina</i>	R	<i>Ciprofloxacina</i>	R
<i>Fenoximetilpenicillina</i>	R	<i>Vancomicina</i>	R
<i>Penicillina</i>	R	<i>Polimixine</i>	R
<i>Cefoxitina</i>	R	<i>Metronidazolo</i>	R
<i>Cefuroxima</i>	R	<i>Trimetroprim</i> <i>Sulfametoxazolo</i>	R

BioGaia Study No. JH004/R&D, 2001.

Lactobacillus reuteri è ampiamente usato come probiotico nei prodotti caseari. Attualmente, prodotti caseari che contengono *L. reuteri* ATCC 55730 sono venduti negli Stati Uniti, in Finlandia, Giappone, Corea, Spagna, Portogallo e nel Regno Unito.

Nel 2000, le compresse masticabili contenenti *L. reuteri* ATCC 55730 sono state introdotte negli Stati Uniti e poi in Europa, S. Africa e Asia.

Di recente sono state introdotte in Italia e Svezia le gocce di *L. reuteri* ATCC 55730, formulazione particolarmente adatta per la supplementazione nel lattante.

Non sono stati riportati fino ad ora infezioni cliniche o effetti collaterali dopo assunzione di *L. reuteri*.

Gli altri ceppi di *Lactobacilli* sono stati collegati a rapporti di casi d'infezione nei quali i pazienti erano immunocompromessi o affetti da altre gravi condizioni cliniche¹⁸⁻²¹. Non ci sono segnalazioni di un collegamento di *L. reuteri* con malattie o processi patologici nell'uomo o negli animali.

Un eccellente studio ha recentemente riportato batteremia da probiotici nella popolazione finlandese²², tuttavia *L. reuteri* non ha prodotto tale evento a differenza di altre specie di *Lactobacilli*.

I molti studi qui di seguito citati sono stati effettuati con *L. reuteri* ATCC 55730. Questo ceppo è quello usato dalla BioGaia in tutte le applicazioni nell'uomo, qualche volta questo stesso ceppo viene citato con la sigla SD2112 (relativa ad una prima designazione ATCC), *L. reuteri* MM53 e *L. reuteri* ING1.

STUDI SUGLI ANIMALI

• Effetti di *L. reuteri* sulla prevenzione delle infezioni da patogeni

Gli studi qui di seguito riportati hanno valutato gli effetti della somministrazione di *L. reuteri* sul tasso di mortalità, l'inibizione della crescita ed altre negative conseguenze in animali sottoposti a situazioni di stress ambientale e/o microbiologico .

Dunham et al.^{51, 52, 53} hanno mostrato che il trattamento con specifici ceppi di *L. reuteri* ha ridotto il tasso di mortalità dei pulcini (polli e tacchini) allevati in ambiente freddo e sottoposti ad infezione di *Salmonella typhimurium* (Tab.2 e Fig. 4).

Tabella 3

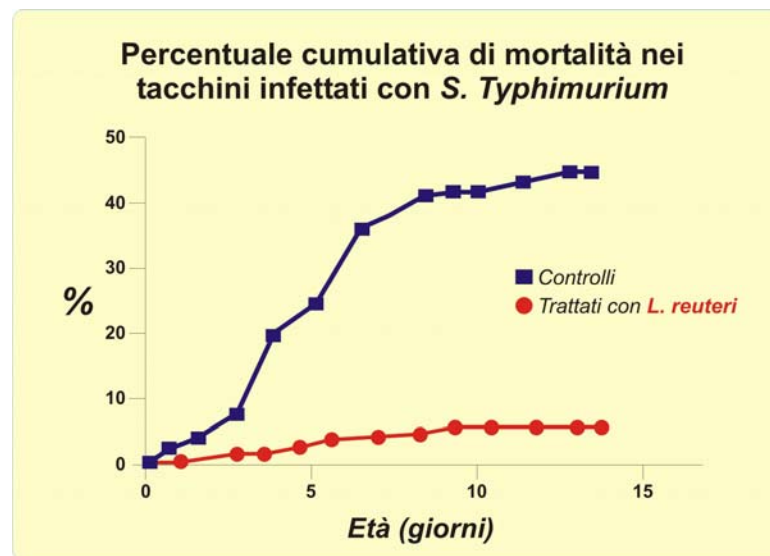
Effetto di *L. reuteri* sul tasso di mortalità fra i pulcini infettati con *Salmonella typhimurium*

Trattamento	6 giorni dopo la covata		40 giorni dopo la covata	
	% Mortalità	Peso corporeo (g)	% Mortalità	Peso corporeo (g)
Challenge (controlli)	36 ^a	72 ^b	41 ^a	1,728 ^b
Challenge + <i>L. reuteri</i>	6 ^b	107 ^a	9 ^b	1,934 ^a

^{a,b} differenza significativa ($p < 0.05$) dai controlli. I pulcini sono stati infettati con 10^3 cfu *S. typhimurium* per pulcino alla covata. Metà sono stati utilizzati come controlli e l'altra metà hanno ricevuto *L. reuteri* in ovo (nell'embrione al giorno 18) e supplementati poi con *L. reuteri* (ad libitum).

Figura 4

Diminuzione del tasso di mortalità da *Salmonella typhimurium* nei giovani tacchini pretrattati con *Lactobacillus reuteri*



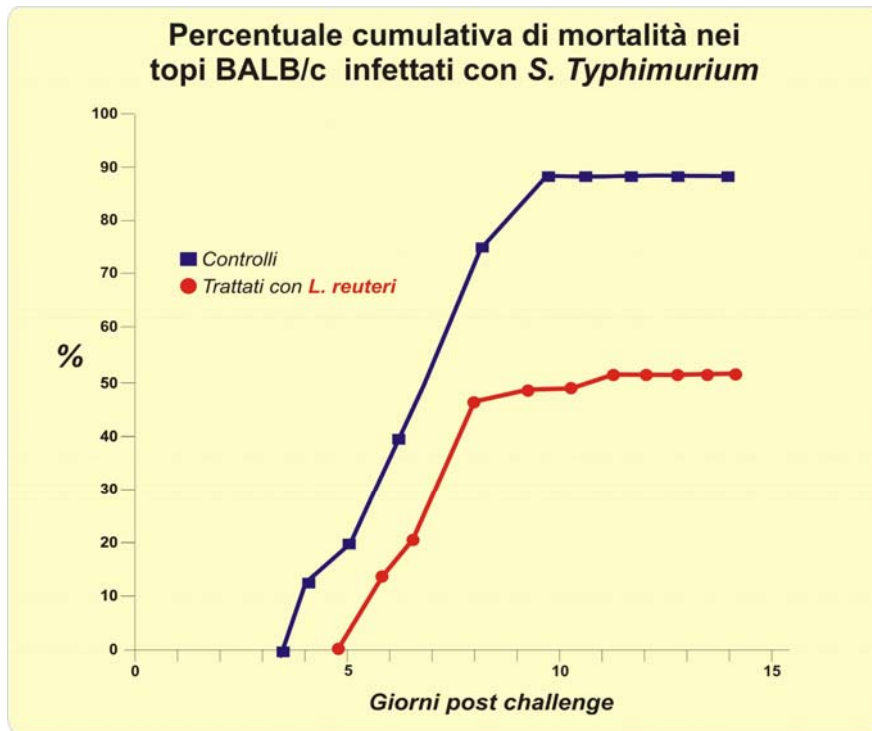
Effetto protettivo della somministrazione di *Lactobacillus reuteri* sulla mortalità di giovani tacchini esposti alla nascita all'infezione di *Salmonella typhimurium*. La probiosi di *L. reuteri* ha limitato il contagio creato dall'aerosol di *Salmonella*, considerando che solo pochi tacchini infetti producono un aerosol infetto sufficiente a decimare la popolazione.

L'effetto protettivo di *L. reuteri* sull'infezione da *Salmonella typhimurium* è stato studiato anche nei topi BALB/C germfree^{55, 56}.

Come riportato in Figura 5, *L. reuteri* aggiunto all'acqua da bere alla concentrazione di 3×10^7 cfu per ml per 2 settimane prima e dopo il challenge ha ridotto in maniera significativa la mortalità degli animali causata dalla somministrazione orale di 6.5×10^4 o 6.5×10^5 cfu di *S. typhimurium* ceppo 14028.

Figura 5

Effetto di Lactobacillus reuteri sulla prevenzione della mortalità nei topi BALB/c infettati con Salmonella typhimurium.



Topi infettati con 6.5×10^5 cfu di *S. typhimurium*.

L'efficacia di *L. reuteri* nel controllo dell'infezione da *Cryptosporidium parvum* è stata valutata da Alak⁵⁴ usando femmine di topo C57BL/6 immunodepresse da inoculazione intraperitoneale di virus della leucemia P-BM5. Questi topi, dopo 4 mesi dall'inoculazione, sviluppano linfadenopatia, splenomegalia e predisposizione all'infezione da *C. parvum*.

Dopo l'assunzione giornaliera di *L. reuteri* (10^8 cfu/die) per 10 giorni prima del challenge con 6.5×10^6 di ovociti di *C. parvum* (e con la prolungata somministrazione di *L. reuteri*), i topi non presentavano parassiti nell'epitelio intestinale. Al contrario, i topi di controllo infettati con *C. parvum* mostravano alti livelli di ovociti nelle feci (Tabella 4).

Tabella 4

Effetto di Lactobacillus reuteri sulla presenza fecale di ovociti di C. parvum e sulla colonizzazione dell'ileo dei topi immunodepressi con inoculazione di retrovirus LP-BM5 ed infettati con C. parvum

Gruppo*	Contaminazione fecale+			Colonizzazione ileale
	Numero di ovociti x 10^3 per g \pm SEM			Numero di ovociti x 10^3 per cm d'intestino \pm SEM
	Giorno 0	Giorno 7	Giorno 14	
A	0.00	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^a
B	0.00	1.58 \pm 0.24 ^b	9.19 \pm 4.29 ^b	4.00 \pm 1.13 ^b
C	0.00	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^a
D	0.00	1.34 \pm 0.33 ^b	0.00 \pm 0.13 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a

*10 topi per gruppo. Gruppi C e D supplementati con *L. reuteri*; gruppi B e D infettati con *C. parvum*.
+ giorni dopo il *C. parvum* challenge. ^{a,b,c} valori con differenza significativa ($p < 0.05$).

Questi studi mostrano che l'efficacia di *L. reuteri* non è limitata alle infezioni batteriche, ma si estende anche alla protezione dalle malattie protozoarie. Inoltre, *L. reuteri* può proteggere i soggetti immunodepressi dalle infezioni protozoarie. Il *C. parvum* può causare malattia diarroica in molti mammiferi, incluso l'uomo.

- **Effetti di *L. reuteri* sulla mucosa intestinale**

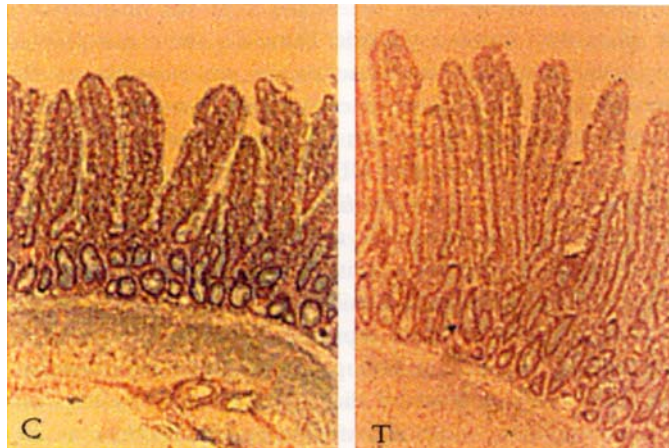
Gli effetti probiotici di *L. reuteri* non sono limitati al ripristino ed al mantenimento dell'equilibrio del microbiota intestinale, ma si manifestano anche sull'attività degli enterociti ed immunociti dell'ospite.

In altri termini, *L. reuteri* è capace di prevenire la traslocazione dei microrganismi patogeni dall'intestino ad altri organi e di mantenere l'integrità della mucosa intestinale.

Analisi morfologiche comparate condotte su tessuti duodenali, digiunali ed ileali di pulcini di pollo e tacchino di 3 giorni di età, allevati in condizioni di crescita normale, mostrano che *L. reuteri* ha stimolato lo sviluppo della lunghezza dei villi ed ha aumentato significativamente la profondità delle cripte particolarmente nella regione ileale (Fig. 6).

Figura 6

Effetto di *Lactobacillus reuteri* sullo sviluppo dei villi ileali nei pulcini sani.



Sezioni di tessuti ileali (preparate ed analizzate come descritto in reference 45); a sinistra i controlli, a destra i pulcini trattati con *L. reuteri*.

L'effetto di specifici ceppi di *L. reuteri* sullo sviluppo dei villi intestinali è stato osservato su topi BALB/c. Recenti studi hanno comparato gli effetti della monocolonizzazione in topi BALB/c germfree con ceppi murini o ceppi umani. Dopo 45 giorni di colonizzazione con *L. reuteri*, i villi risultarono più sviluppati e più lunghi di circa il 20% ($p < 0.05$) nei topi colonizzati con ceppo murino di *L. reuteri* in confronto ai topi colonizzati con ceppo umano di *L. reuteri* o dei topi germfree (Fig. 7).

Figura 7

Effetto di ceppi ospite-specifici di *L. reuteri* sullo sviluppo dei tessuti ileali in topi gnotobiotici BALB/c



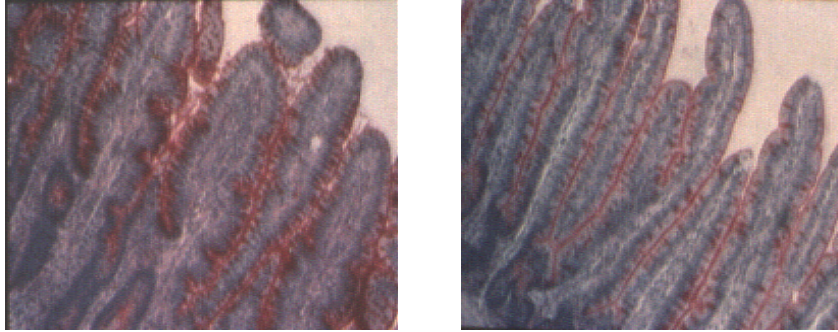
A sinistra: topi germfree di controllo; al centro: topi monocolonizzati con ceppo murino di *L. reuteri*; a destra: topi monocolonizzati con ceppo umano di *L. reuteri*. Casas & Dobrogosz (2000) *Microb Ecol Health Dis* 12: 247-285

L'effetto protettivo di *L. reuteri* sulla mucosa intestinale in animali infettati da *S. typhimurium* o *C. parvum* è stato documentato in diversi lavori^{39,56}.

Le figure 8, 9 e 10 evidenziano il miglioramento della mucosa infiammata da patogeni rispettivamente nei pulcini e nei topi.

Figura 8

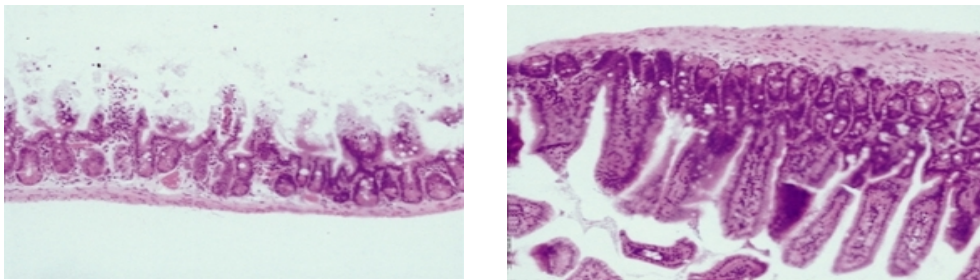
***L. reuteri* riduce l'infiammazione indotta da *Salmonella typhimurium* nell'ileo dei pulcini**



A sinistra: controlli infettati con *Salmonella*. A destra: pulcini pre-trattati con *L. reuteri* ed infettati con *Salmonella*.
Casas & Dobrogosz (2000) *Microb Ecol Health Dis* 12: 247-285

Figura 9

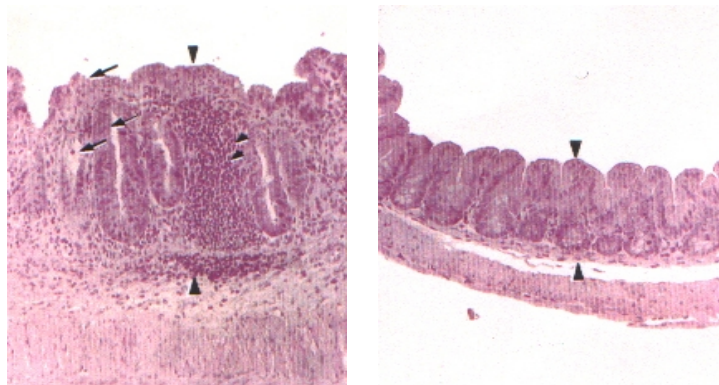
***L. reuteri* riduce l'infiammazione indotta da *Salmonella typhimurium* nell'ileo dei topi**



A sinistra: controlli infettati con *Salmonella*. A destra: topi pre-trattati con *L. reuteri* ed infettati con *Salmonella*.
Carbajal et al. data on file

Figura 10

***L. reuteri* riduce l'infiammazione indotta da *C. parvum* nell'intestino dei topi**



A sinistra: controlli infettati con *C. parvum*. A destra: topi pre-trattati con *L. reuteri* ed infettati con *C. parvum*
Waters et al. 1999 *J Eukaryotic Microbiol* 46: 60-61S

• **Effetti di *L. reuteri* sull'immunità**

Studi sui topi hanno mostrato che i linfociti T mucosali influenzano il rinnovamento delle cellule epiteliali, la loro differenziazione negli stati patologici, la regolazione della crescita degli enterociti in condizioni normali, indicando così una stretta relazione fra lo sviluppo dell'epitelio intestinale ed i suoi elementi linfoidi ad esso associati⁵⁷.

Inoltre, il tessuto linfoide associato all'intestino (GALT) è oggi considerato un organo linfoide primario, poiché i precursori cellulari del midollo osseo si localizzano nell'epitelio intestinale (homing) dove avviene un arrangiamento genetico dei recettori ed una differenziazione delle cellule T⁵⁸.

Visto il potenziale antigenico del microbiota intestinale e la sua vicinanza con questo tessuto linfoide primario, una serie di intercomunicazioni (cross talk interactions) si verificano fra l'ospite ed alcuni elementi del suo microbiota. L'efficacia di un probiotico è basata su queste interazioni.

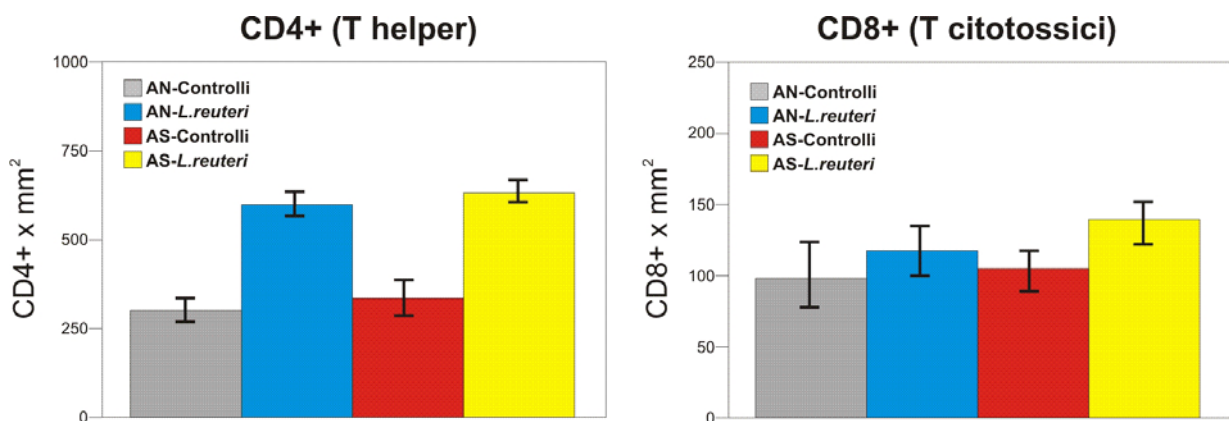
Gli effetti di *L. reuteri* sul sistema immune intestinale sono stati investigati in diversi studi.

L'effetto di *L. reuteri* sui linfociti intestinali è stato documentato nei pulcini allevati in condizione di stress⁵⁹. È stato osservato che i pulcini trattati con *L. reuteri*, rispetto ai non trattati, mostrano un aumento dei linfociti CD4 + (T helper), ma non dei CD8 + (T cytotoxic) nella lamina propria della regione ileale del tratto GI (Fig. 11).

Il trattamento con *L. reuteri* ha aumentato il rapporto CD4+/CD8+ nell'ileo da 2 a 3.5, senza provocare variazioni della popolazione dei linfociti T nel digiuno e nel duodeno.

Figura 11

Effetto di *L. reuteri* sui linfociti CD4+ e CD8+ nella lamina propria dei pulcini



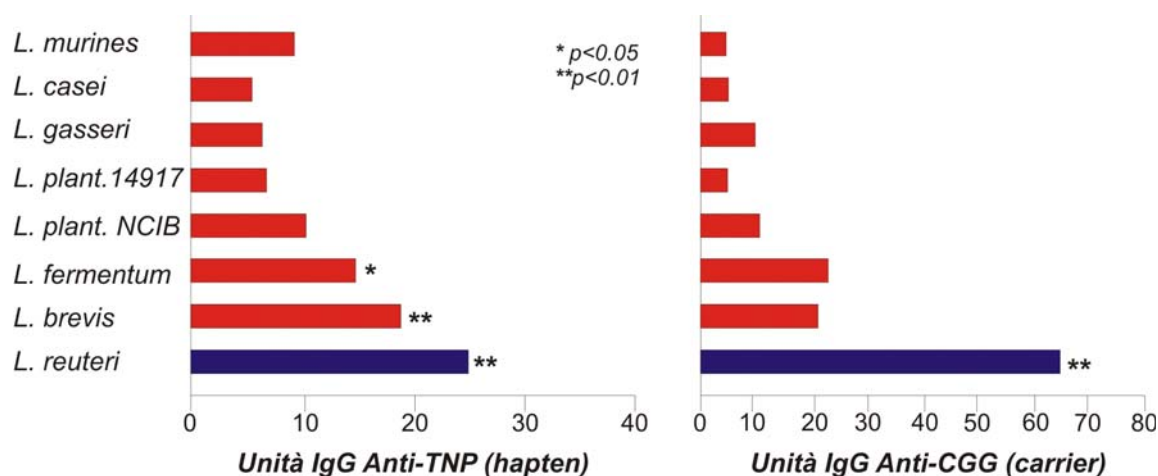
Effetto della somministrazione di *Lactobacillus reuteri* sui CD4 + e CD8 + nella lamina propria dell'ileo nei pulcini di 5 giorni. Grafico a sinistra: numero di CD4 + per mm² di tessuto; Grafico a destra: numero di CD8 + per mm² di tessuto. AN-C: Controlli, pulcini allevati in condizioni normali; AN-LR: pulcini allevati in condizioni normali trattati con *L. reuteri*; AS-C: Controlli, pulcini allevati in condizioni di stress (freddo e infettati con *Salmonella*); AS-LR: pulcini allevati in condizioni di stress trattati con *L. reuteri*.

Casas⁴⁵ ha mostrato che polli pre-trattati con *L. reuteri* ed infettati con *Salmonella typhimurium* hanno sviluppato titoli di anticorpi anti-Salmonella più elevati dopo due settimane dall'infezione comparati con i controlli non trattati.

Successivamente, Maassen⁴⁰ ha utilizzato topi BALB/c per analizzare l'effetto di otto diversi ceppi di *Lattobacilli* sull'induzione di citochine pro- e antinfiammatorie nella mucosa intestinale e la risposta anticorpale sistemica alla somministrazione parenterale di antigeni: TNP (trinitrophenyl hapten) e TNP-CGG (haptened gamma globulina di pollo).

Fra i vari effetti, gli investigatori hanno mostrato che *L. reuteri* ha significativamente aumentato i livelli di IgA nei linfociti B (plasmacellule) della lamina propria e migliorato la specifica risposta anticorpale IgG (effetto adiuvante) sugli antigeni TNP e TNP-CGG (Fig. 12).

Figura 12

Effetto di diversi lattobacilli sulla produzione di anticorpi IgG contro l'antigene TNP-CGG

Attività adjuvante dei ceppi di Lattobacilli somministrati oralmente. La risposta anticorpale contro l'antigene TNP-CGG somministrato intraperitonealmente è stata analizzata con l'ELISA. A sinistra, il grafico illustra la media della risposta anticorpale IgG (\pm SEM) verso TNP in unità arbitrarie 7 giorni dopo la seconda immunizzazione. A sinistra, il grafico illustra la media della risposta anticorpale IgG (\pm SEM) verso la proteina carrier CGG.

STUDI CLINICI SULL'UOMO

In questa sessione sono riportati i principali studi clinici condotti con *L. reuteri* ATCC 55730 sull'uomo.

- **Studi di sicurezza**

A. Adulti

Wolf²³ ha studiato la sicurezza e la tollerabilità dell'assunzione di *L. reuteri* in maschi sani in un lavoro placebo controllato, randomizzato in doppio-cieco. Trenta maschi sani (n=15/gruppo) furono selezionati per ricevere a random *L. reuteri* ATCC 55730 (1×10^{11}) o placebo per 21 giorni. L'incidenza di fattori di tollerabilità soggettivi come flatulenza, diarrea e crampi fu bassa e simile tra i gruppi. I livelli di *L. reuteri* nelle feci ed il rapporto fra *L. reuteri* e *Lactobacillus spp.* furono significativamente più elevati nel gruppo *L. reuteri* nei giorni 7, 21, 14 e 28 comparati al gruppo di controllo.

I risultati indicano che *L. reuteri* può essere assunto fino ad una concentrazione di 1×10^{11} CFU/die senza problemi di sicurezza clinica.

Inoltre, Wolf²⁴ ha esaminato anche la sicurezza e la tollerabilità di *L. reuteri* ATCC 55730 in individui con infezione da HIV in lavoro placebo controllato, randomizzato in doppio-cieco.

Ai soggetti fu somministrato *L. reuteri* capsule (10^{10} CFU/die, n=15) o placebo (n=20) per 21 giorni. La somministrazione di *L. reuteri* provocò un aumento dei livelli di *L. reuteri* nelle feci nei giorni 7, 14 e 21 comparati alla baseline. Questi risultati indicano che individui HIV positivi (immunocompromessi) possono assumere *L. reuteri* alla dose di 1×10^{10} CFU/die con sicurezza clinica.

La capacità di *Lactobacillus spp.* di sopravvivere in vivo è stata valutata in 12 uomini sani in un lavoro¹² in doppio-cieco cross-over. Tre gruppi furono arruolati in un lavoro cross-over in tre periodi di trattamento. Un periodo di trattamento consisteva in una supplementazione di *L. reuteri* (DSM 12246; 2×10^{10} CFU/die) associato con *L. rhamnosus* 19070-2. Un secondo periodo di trattamento consisteva in una supplementazione con *L. rhamnosus* LGG, *L. delbrueckii* subsp *lactis* CHCC 2329 e *L. casei* subsp *alactus* CHCC3137. Il terzo periodo di trattamento era con placebo.

Ogni trattamento durò 18 giorni con un periodo di washout di 17 giorni dopo ogni periodo di trattamento. Gli investigatori non riscontrarono effetti avversi.

L. reuteri colonizzò il tratto gastrointestinale in 8 su 12 soggetti durante il periodo di somministrazione e scomparve a somministrazione terminata. Questo studio mostra inoltre che *L. reuteri* è l'unico *Lactobacillus*

che non influenza negativamente la crescita dei normali batteri residenti del tratto gastrointestinale, mentre mostra un'ampia e forte inibizione sui batteri patogeni.

Tabella 5

Effetto dei vari lattobacilli sulla normale flora intestinale

Normali batteri gastrointestinali	ATTIVITÀ ANTIBATTERICA			
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. lactis (CCC2329)	<i>L. rhamnosus</i> (LGG)	<i>L. plantarum</i> (299V)	<i>L. reuteri</i> (DMS12246)
<i>Lactobacillus sp</i>	+	–	–	–
<i>Lactobacillus sp</i>	+	–	+	–
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	–
<i>Proteus mirabilis</i>	+	–	+	–
<i>E. coli</i>	+	–	–	–
<i>Citrobacter freudi</i>	++	–	+	–
<i>Enterobacter cloacae</i>	–	+	+	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	–	+	–
<i>Enterococcus faecium</i>	–	–	–	–

Questa caratteristica trasferibile in vivo, è utile al mantenimento della microflora intestinale (da Jacobsen, 1999).

B. Bambini

Ruiz-Palacios²⁵ ha stabilito la tollerabilità e la dose-risposta di una miscela di probiotici contenente *L. reuteri*, *L. acidophilus* e *B. infantis* nei bambini (n=72) di 12-36 mesi.

I bambini furono selezionati a random per assumere quotidianamente una fra tre diverse concentrazioni di *L. reuteri* associate a concentrazioni fisse di *L. acidophilus* e *B. infantis* o placebo. Non furono osservate differenze significative d'incidenza del vomito, del disagio addominale, dei gas e delle caratteristiche delle feci fra i gruppi.

La somministrazione di *L. reuteri* provocò un aumento dei livelli di *L. reuteri* nelle feci in modo dose-dipendente.

I risultati mostrano che la somministrazione di *L. reuteri* fu ben tollerata dai bambini fino ad una concentrazione di 1×10^{10} CFU/die. In ulteriori studi^{26,27} su 248 bambini (12-36 mesi) che ricevettero una miscela di probiotici incluso *L. reuteri* ATCC 55730 per 14-16 settimane, non fu riportato alcun effetto avverso.

C. Infanti e neonati

Shornikova^{28,29} ha studiato i bambini (età 6-36 mesi) con diarrea infettiva, trattati con *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730.

In uno degli studi, i bambini ricevettero una volta al giorno da 10^{10} a 10^{11} CFU di *L. reuteri*, e nell'altro studio da 10^7 a 10^{10} CFU/die per 5 giorni. Non è stato osservato alcun effetto avverso sull'aumento del peso, sul consumo della soluzione reidratante orale o elettrolitica, o sull'equilibrio acido-base.

Karvonen³⁰ ha studiato la sicurezza di *L. reuteri* in dosi tra 10^5 e 10^9 CFU/die (aggiunte alla polvere del latte) in 90 neonati sani per 28 giorni. Non fu evidenziata alcuna differenza comparata al placebo degli effetti avversi quali disagio addominale, dolore addominale o crampi.

Due recenti studi hanno esaminato la sicurezza e l'efficacia della colonizzazione di una sospensione oleosa di *L. reuteri* (ATCC 55730) in neonati a termine e prematuro (Vesikari & Karvonen, report in file BioGaia).

In questi studi placebo-controllati, ai neonati fu somministrato *L. reuteri* in sospensione oleosa in gocce dalla nascita per 28 giorni a dosi tra 10^7 e 10^9 CFU al giorno.

In entrambi gli studi non furono riportati problemi di sicurezza e la formulazione fu ben tollerata dagli infanti. Fu osservata in tutti gli infanti una significativa colonizzazione delle feci (Tabelle 6 e 7).

Tabella 6

Sintomi nei bambini durante lo studio

Osservazioni	Placebo media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁵ media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁷ media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁹ media (SD)	p
Feci normali/die	0.4 (0.2)	0.0 (0.1)	0.2 (0.3)	0.5 (0.4)	NS
Feci morbide/die	2.3 (1.0)	3.6 (1.2)	3.2 (1.0)	2.0 (1.2)	NS
Feci acquose/die	1.0 (0.6)	0.1 (0.2)*	0.3 (0.3)*	0.4 (0.5)*	0.003
Sintomi addominali	10.0 (8.1)	8.5 (7.5)	7.8 (9.0)	10.6 (7.5)	NS

* I sintomi addominali sono stati calcolati come giorni di disagio addominale, dolore e crampi addominali

* Npar test: Krustal Wallis Test, Chi Square; gli asterischi indicano la differenza significativa comparata al placebo

Tabella 7

Colonizzazione di *L. reuteri* misurata come log₁₀ CFU/g nelle feci dei bambini

	Placebo media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁵ media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁷ media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁹ media (SD)	p
Alla nascita	1.4 (0.0)	1.4 (0.0)	1.5 (0.6)	1.4 (0.0)	NS
A 15 giorni	1.5 (0.6)	2.1 (1.5)	4.4 (2.0)	7.5 (1.2) *	<0.001
A 30 giorni	1.4 (0.0)	1.4 (0.0)	4.2 (2.2)	6.8 (1.4)*	<0.001

* Npar test: Krustal Wallis Test, Chi Square; gli asterischi indicano la differenza significativa comparata al placebo

In un recente studio condotto in India (Jangle et al. dati in file BioGaia)), 340 bambini (3-6 anni) di un'area rurale sono stati trattati con *L. reuteri* compresse 1x10¹⁰ CFU/die (n = 160) o con placebo (n = 158). I dati ematologici di sicurezza non hanno rilevato effetti negativi di *L. reuteri*.

Più recentemente, è stato realizzato uno studio clinico di sicurezza con *L. reuteri*, somministrato in formula ai lattanti³¹. I bambini tra i 3-65 giorni di età furono trattati con formule addizionate con *L. reuteri* ATCC 55730 (10⁸ CFU/die), *B. bifidum* o placebo per 4 settimane. In tutti i gruppi fu dimostrata la sicurezza su parametri di crescita, funzione gastrointestinale e stato di buona salute.

• **Studi di efficacia clinica**

Ruiz-Palacios²⁶ ha investigato l'uso dei batteri probiotici nella prevenzione della diarrea acquisita in comunità nei bambini sani. I bambini (12-35 mesi) furono divisi in due gruppi per ricevere a random o una miscela di probiotici (n=119) o placebo (controllo) (n=120) per 14 settimane. La miscela di probiotici conteneva *L. acidophilus*, *B. infantis* e *L. reuteri* ATCC 55730.

Il numero di bambini senza diarrea risultò superiore nel gruppo *L. reuteri* comparato al gruppo di controllo, 90/119 vs 77/120 e l'incidenza della diarrea per bambino fu inferiore nei bambini trattati con i probiotici, 0.27 vs 0.42 (Tab. 8).

Un secondo studio in cieco lo stesso gruppo di ricercatori²⁷ ha comparato l'effetto profilattico sulla diarrea di due miscele di probiotici in bambini sani (12-32 mesi).

Ad un gruppo fu somministrata una miscela di *L. acidophilus* e *B. infantis*. L'altro gruppo ricevette la stessa miscela più 1,5x10⁸ CFU di *L. reuteri* ATCC 55730 al giorno.

Un terzo gruppo ricevette placebo. Il numero di bambini in ogni gruppo di trattamento fu di 129 e nel gruppo placebo di 130.

Il rischio relativo di contrarre diarrea comparato al placebo fu significativamente ridotto a 0.67 per il gruppo *L. reuteri* ed a 0.75 (non significativo) per il gruppo con la miscela di probiotici senza *L. reuteri*.

Tabella 8

Prevenzione della diarrea acquisita in comunità nei bambini

Gruppi dello studio	Nr di bambini	Bambini liberi da diarrea	Incidenza delle diarrea (episodi/bambino)
Controllo	120	64% (77/120)	0.42
L. reuteri	119	76% (90/119)^a	0,27^b

Studio placebo controllato in cieco in bambini di 12-36 mesi di età supplementati con *L. reuteri* 10⁸ cfu al giorno per 14 giorni. ^ap = 0.03, ^bp = 0.04. Ruiz Palcios 1996

Shornikova^{28,29} ha condotto due studi in doppio-cieco, placebo controllati per esaminare gli effetti di *L. reuteri* ATCC 55730 in bambini ospedalizzati per diarrea infettiva acuta^{28,29}.

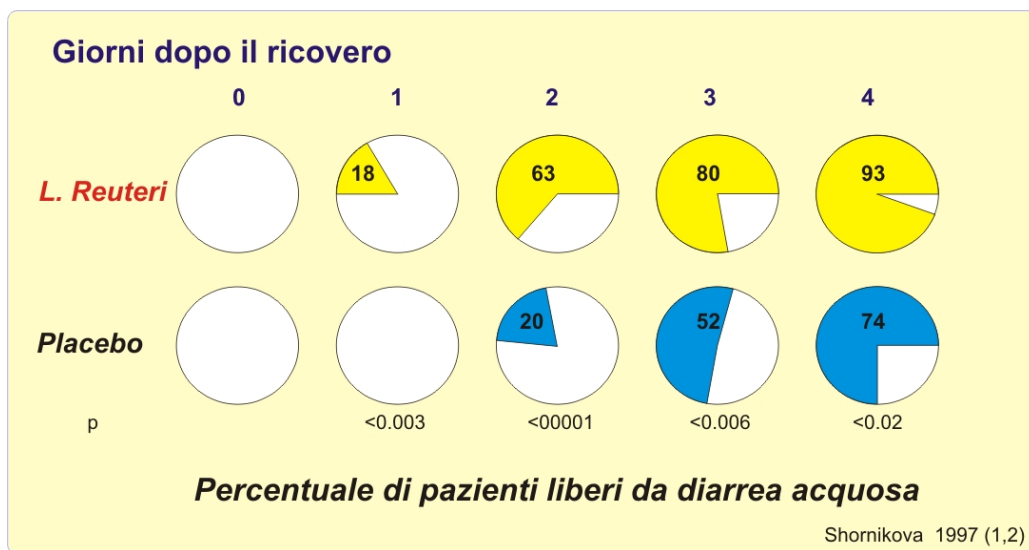
Nel primo studio 40 bambini avevano assunto una volta al giorno dosi di 10¹⁰ o 10¹¹ CFU di *L. reuteri* (n = 19) o placebo (n = 21).

L. reuteri ha significativamente ridotto la durata della diarrea da 2.9 a 1.7 giorni. Il vomito nel secondo giorno era assente nel gruppo trattato con *L. reuteri* mentre 19% del gruppo placebo aveva episodi di eruttazione, che in alcuni durarono per 6 giorni.

Nel secondo studio su 66 bambini trattati, la durata della diarrea indotta da rotavirus fu ridotta a 1.9 giorni nei bambini trattati con la dose di 10⁷CFU/die di *L. reuteri* (n =21) ed a 1.5 giorni con la dose di 10¹⁰ CFU/die di *L. reuteri* (n = 21), confrontata ai 2.5 giorni del gruppo placebo (n = 25). I risultati di questi studi sono illustrati in Figura 13. Da notare che la dose più bassa ha mostrato la stessa efficacia della dose più alta.

Figura 13

Effetto di *L. reuteri* sulla diarrea da rotavirus nei bambini



Somma dei risultati dei due studi randomizzati, placebo controllati in bambini (6-36 mesi) ospedalizzati per diarrea acuta da rotavirus (modificato da Shornikova, 1997^{28,29})

Karvonen³⁰ ha studiato l'effetto di dosi diverse di *L. reuteri* sulla consistenza delle feci in uno studio su 90 neonati sani.

L. reuteri fu somministrato per 28 giorni, nel latte materno o in formula, in dosi quotidiane di 10⁵ CFU, 10⁷ CFU, 10⁹ CFU verso placebo.

Il numero di feci acquose giornaliere fu significativamente ridotto a 0.1, 0.3 e 0.4 nei rispettivi gruppi di trattamento, comparato a 1.0 del placebo, indicando nuovamente l'efficacia delle dosi più basse. La colonizzazione degli infanti risultò dose-dipendente.

Tabella 9

Effetto di *L. reuteri* sulla riduzione delle feci acquose in bambini sani

Osservazioni	Placebo media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁵ media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁷ media (SD)	<i>L. reuteri</i> 10 ⁹ media (SD)	p
Feci normali/die	0.4 (0.2)	0.0 (0.1)	0.2 (0.3)	0.5 (0.4)	NS
Feci morbide/die	2.3 (1.0)	3.6 (1.2)	3.2 (1.0)	2.0 (1.2)	NS
Feci acquose/die	1.0 (0.6)	0.1 (0.2)*	0.3 (0.3)*	0.4 (0.5)*	0.003
Sintomi addominali	10.0 (8.1)	8.5 (7.5)	7.8 (9.0)	10.6 (7.5)	NS

* I sintomi addominali sono stati calcolati come giorni di disagio addominale, dolore e crampi addominali

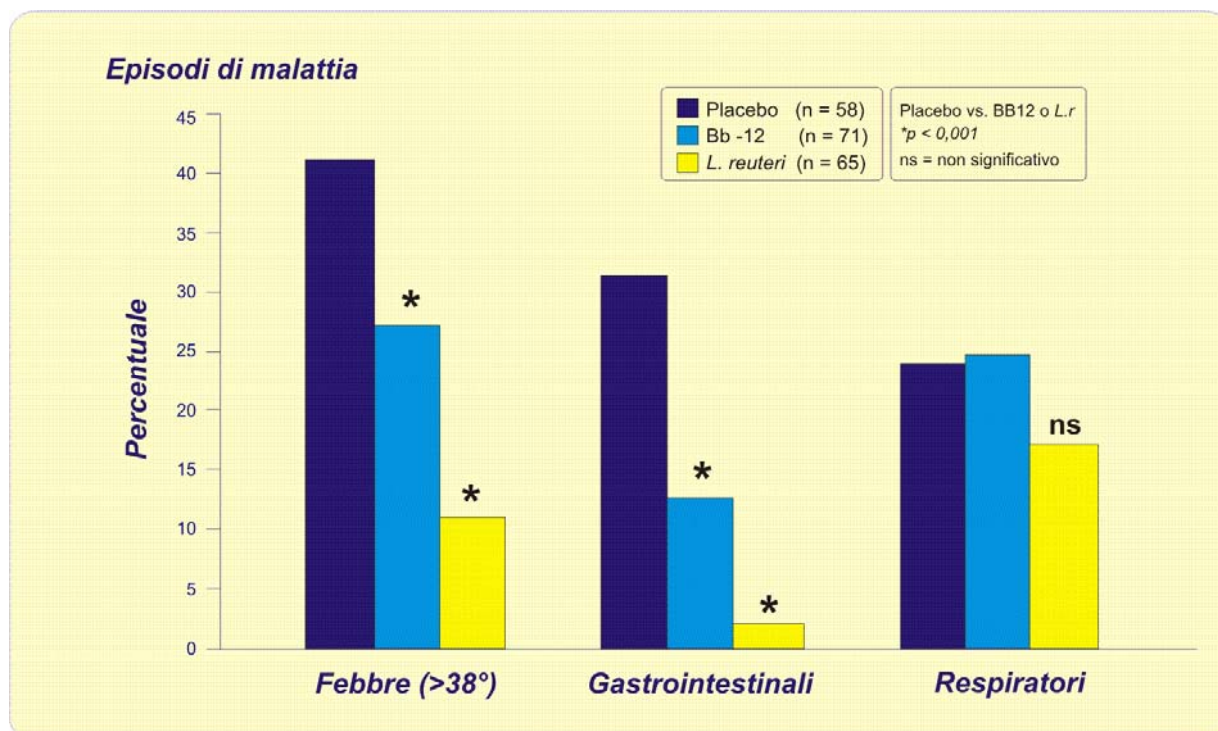
* Npar test: Krustal Wallis Test, Chi Square; gli asterischi indicano la differenza significativa comparata al placebo

RECENTI EVIDENZE CLINICHE

Weizman³⁵ ha effettuato un lavoro in doppio-cieco placebo controllato, con formule infantili addizionate o con *L. reuteri* ATCC 55730 (10⁸ CFU/die) o con *B. bifidum* (Bb12) per 12 settimane.

I due probiotici hanno prodotto meno episodi di malattie GI, meno episodi febbrili e meno infezioni del gruppo placebo e gli autori hanno rilevato che *L. reuteri* si è dimostrato superiore al placebo ed al *Bifidobacterium bifidum* (Bb12) nel mantenere lo stato di salute gastrointestinale dei lattanti riducendo il numero delle visite mediche, delle prescrizioni di antibiotici e delle assenze dal nido (Fig. 14, 15)

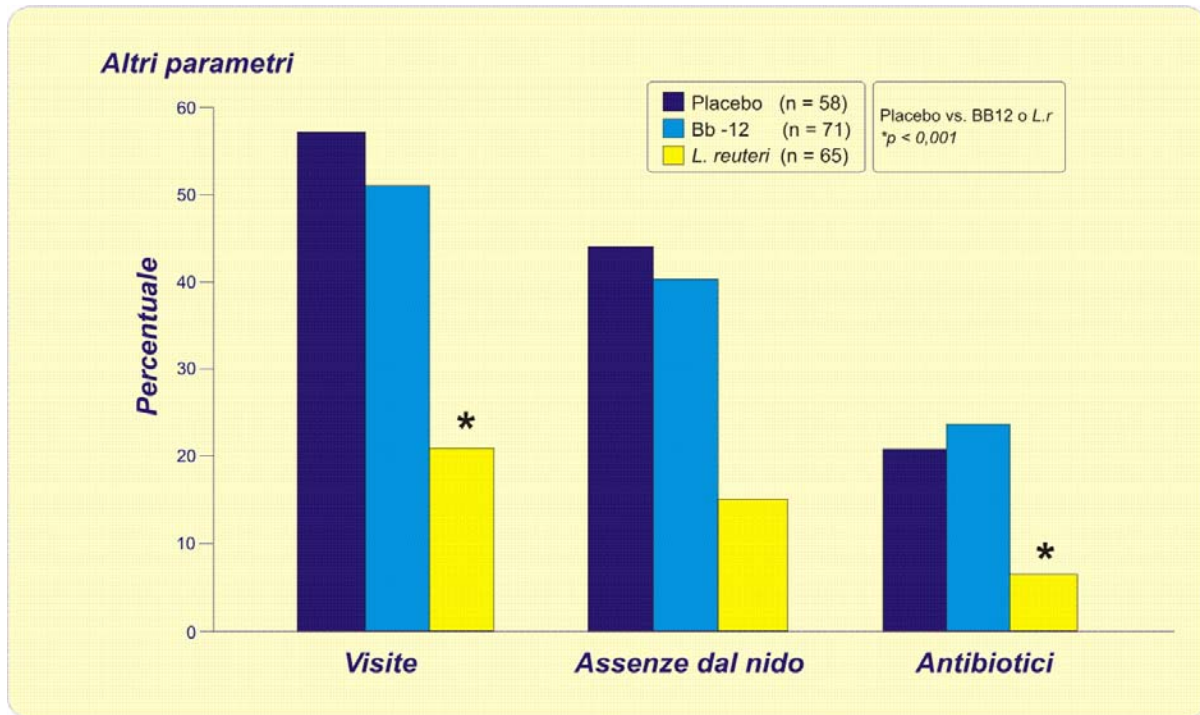
Figura 14

Effetto di *L. reuteri* sulla prevenzione di episodi febbrili ed infezioni gastrointestinali nei lattanti

Lattanti sani alimentati con formula contenente *L. reuteri* ATCC 55730 o *Bifidum* Bb-12 o placebo per 12 settimane.

Figura 15

Effetto di *L. reuteri* sul miglioramento della salute nei lattanti



Lattanti sani alimentati con formula contenente *L. reuteri* ATCC 55730 o *Bifidum Bb-12* o placebo per 12 settimane.

Nuovi ed interessanti dati clinici sono stati prodotti da Rosenfeldt³⁶⁻³⁸, in un lavoro in doppio-cieco, crossover placebo controllato con una miscela di *L. reuteri* (DSM 12246) e *L. rhamnosus* (19070-2) in 41 bambini con dermatite atopica. Tali dati indicano un miglioramento della dermatite acuta, dei sintomi gastrointestinali e della permeabilità intestinale in questi pazienti (Tab. 10 e Fig. 16)

Tabella 10

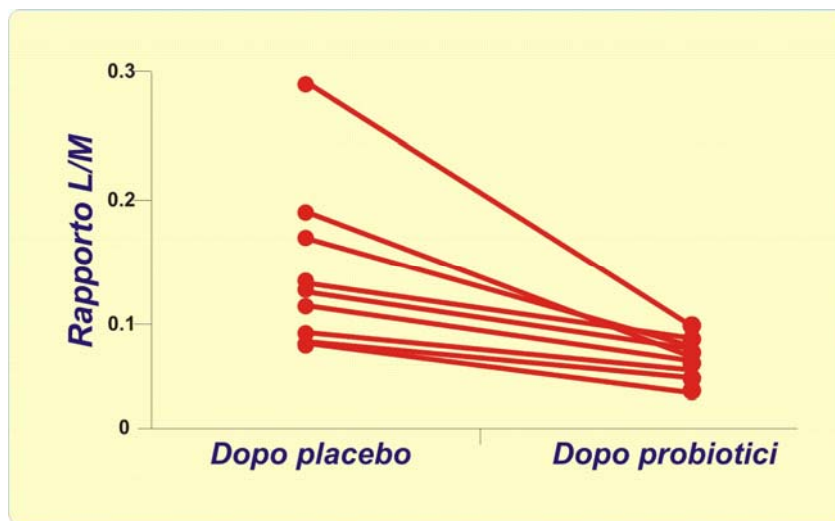
Prevalenza dei sintomi GI nei pazienti in trattamento con probiotici

n =41	Placebo n (%)	Probiotici n (%)	p
Solo vomito	1	0	
Solo diarrea	6	1	
Solo dolore addominale	6	2	
Diarrea e dolore addominale	3	1	
Altri sintomi GI	6 (39)	4(9)	.002

Durante gli ultimi 14 giorni del periodo di trattamento (sei settimane) con placebo, 16 dei 41 bambini (39%) hanno riportato diarrea, vomito e/o dolore addominale una e o più volte alla settimana. In contrasto, durante gli ultimi 14 giorni del periodo di trattamento (sei settimane) con probiotici, solo 4 dei 41 bambini (10%) hanno riportato sintomi gastrointestinali (p = .002).

Figura 16

Effetto della somministrazione di probiotici sulla diminuzione della permeabilità intestinale



Rapporto lattulosio/mannitolo (L/M) misurato in 14 bambini (età 4-13 anni) dopo 6 settimane di supplementazione con probiotici o placebo. La variazione del rapporto L/M è il risultato di una diminuita (50%) escrezione urinaria di lattulosio dopo trattamento con probiotici. Il lattulosio non viene assorbito in una mucosa GI sana. Nei pazienti con dermatite atopica che hanno una aumentata permeabilità intestinale il lattulosio viene assorbito e l'escrezione urinaria aumenta. Questo studio suggerisce che i probiotici stabilizzano la funzione della barriera intestinale e diminuiscono i sintomi GI nei bambini con dermatite atopica.

La Biogaia sta attualmente patrocinando un importante lavoro multicentrico sull'effetto della somministrazione di *L. reuteri* ATCC 55730 nei neonati sull'incidenza dell'allergia atopica nei primi due anni di vita; i dati dovrebbero essere presto disponibili.

Ulteriori nuovi dati clinici (Valeur⁶⁰) dimostrano la colonizzazione *in situ* della mucosa gastrointestinale umana e la conseguente risposta immune locale dopo somministrazione di *L. reuteri* ATCC 55730 compresse.

In questo studio clinico in aperto, 10 volontari sani e 9 soggetti ileostomizzati sono stati sottoposti a gastroscopia o ileoscopia con prelievo di biopsie dallo stomaco, dal duodeno e dall'ileo prima e dopo somministrazione di 4×10^8 CFU di *L. reuteri* al giorno per 28 giorni.

Le biopsie sono state analizzate per la colonizzazione (usando una sonda a fluorescenza molecolare) e per l'analisi della popolazione di cellule immunitarie.

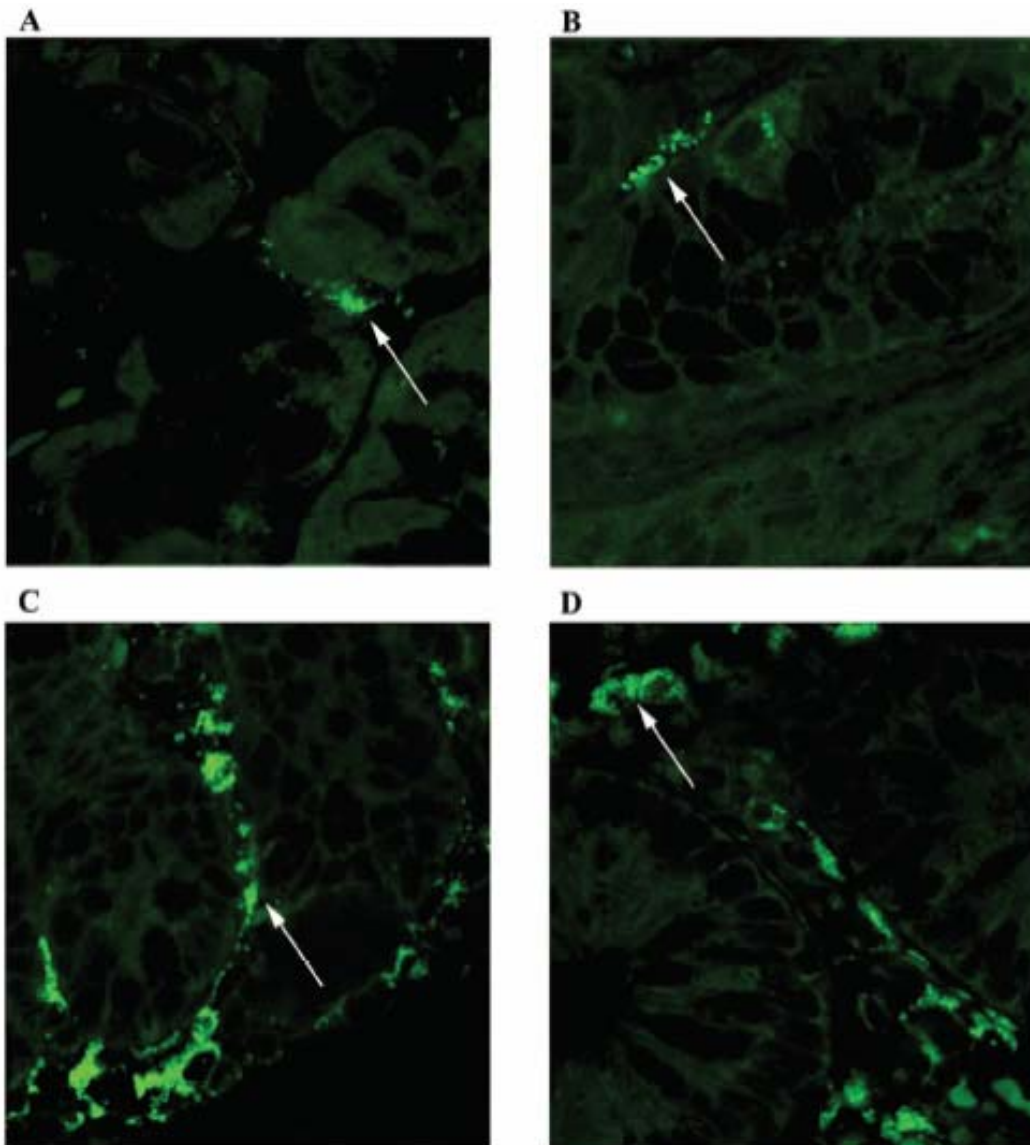
L. reuteri endogeno è stato identificato nello stomaco di 1 soggetto ed nel duodeno di 3 soggetti (su 10). Dopo la somministrazione di *L. reuteri* compresse, lo stomaco di 8 soggetti ed il duodeno di tutti i soggetti sono risultati colonizzati.

Tre soggetti ileostomizzati (dei 6 esaminati) hanno presentano *L. reuteri* endogeno alla baseline mentre dopo la somministrazione di *L. reuteri* tutti e sei i soggetti sono risultati colonizzati.

I nostri dati offrono una chiara evidenza diretta della colonizzazione dello stomaco, del duodeno e dell'ileo dopo somministrazione di *L. reuteri* (Fig. 17).

Figura 17

Colonizzazione in situ del tratto gastrointestinale umano di *L. reuteri* ATCC 5530



Identificazione di *L. reuteri* sui campioni biotici del tratto gastrointestinale umano. I campioni biotici sono stati prelevati dai soggetti alla baseline (giorno 0) dopo 28 giorni (giorno 28) di somministrazione giornaliera di *L. reuteri* ATCC 55730 alla dose di 4×10^8 CFU/die. *L. reuteri* è stato identificato usando una specifica sonda molecolare FISH per *L. reuteri*. L'area in verde delle colonie di *L. reuteri* è chiaramente visibile (come indicato dalle frecce). I campioni biotici sono stati prelevati dal corpo (A) e antro (B) gastrici, dal duodeno (C) e dall'ileo (D).

È interessante notare che la somministrazione di *L. reuteri* nel nostro studio ha indotto una significativa elevata presenza di T-linfociti CD4+ nell'epitelio dell'ileo dei soggetti (Fig 18).

L'evidenza suggerisce che l'effetto probiotico di *L. reuteri* può essere dovuto alla sua capacità di modulare il sistema immunitario del tratto gastrointestinale^{4, 39-44}.

Queste osservazioni concordano con le prime osservazioni nei pulcini⁴⁵, nei quali era stato trovato un aumentato rapporto CD4:CD8 nella mucosa ileale dopo l'assunzione di *L. reuteri*, in un modello dove la colonizzazione della *Salmonella typhimurium* era significativamente ridotta dalla somministrazione di *L. reuteri* con un conseguente ridotto tasso di mortalità dei pulcini^{4,45}.

Inoltre Mao⁴⁶ ha studiato l'enterocolite indotta da metotrexate nei ratti e ha trovato che *L. reuteri* può aumentare sia i livelli di IgA secretorie nell'ileo e nel colon, sia le cellule CD4+ e CD8+ nella lamina propria dell'intestino e che questi cambiamenti sono associati ad una diminuita permeabilità intestinale, ad una aumentata massa della mucosa ed a una guarigione dell'enterocolite⁴⁷.

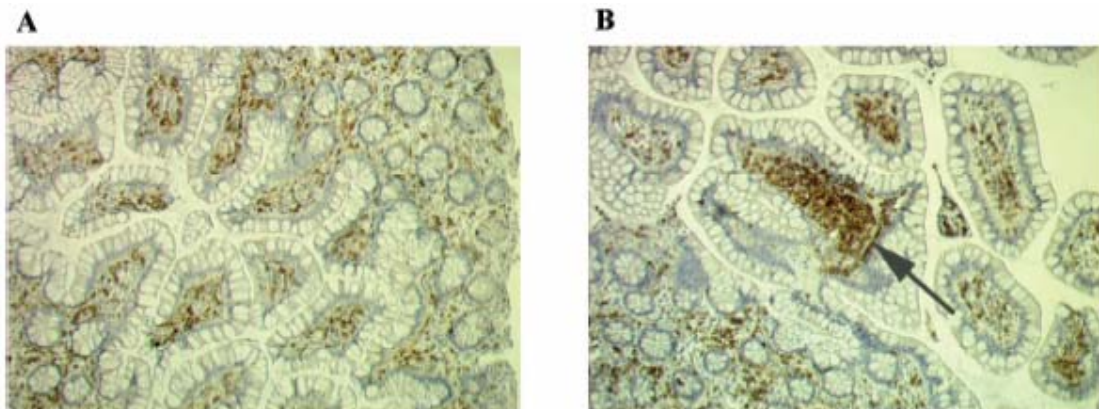
Vale la pena notare che Ferriera⁴⁸ ha dimostrato che i T-linfociti attivati nella lamina propria dell'intestino umano sono coinvolti nel miglioramento della proliferazione delle cellule epiteliali intestinali e che i probiotici⁴⁹, incluso *L. reuteri*, hanno mostrato di stimolare la crescita della mucosa negli animali.

L. reuteri è una specie indigena predominante nell'ileo⁴ e pertanto la stimolazione con *L. reuteri* delle cellule T-helper nell'ileo può essere un importante meccanismo d'azione per migliorare la salute dell'intestino dell'ospite.

In conclusione, questo studio mostra l'adesione, la crescita e la colonizzazione del tratto gastrointestinale umano di *L. reuteri* ATCC 55730 e che tale colonizzazione attiva una risposta immunologica locale nella mucosa dell'intestino umano. In base ai dati pre-clinici, la somministrazione di *L. reuteri* migliora la risposta immune gastrointestinale e la difesa contro patogeni.

Figura 18

Reclutamento delle cellule CD4+ (linfociti Thelper) nella mucosa ileale umana dopo assunzione di Lactobacillus reuteri ATCC 55730

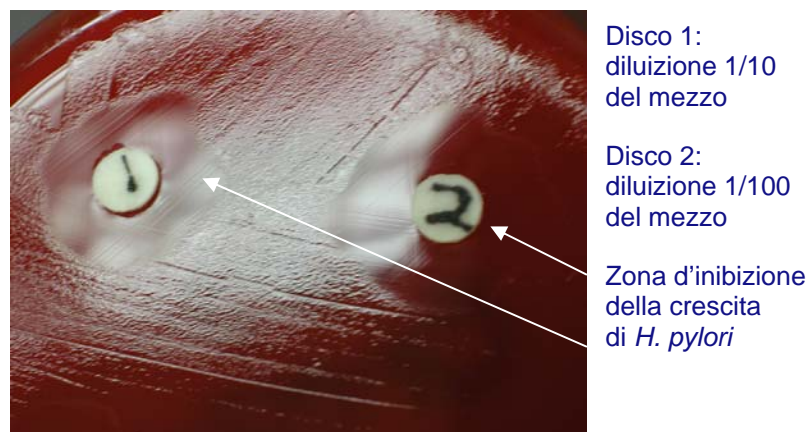


Cellule CD4-positivo (linfociti T) nella mucosa ileale prima e dopo assunzione di *L. reuteri* ATCC 55730. I campioni biotici sono stati prelevati dai soggetti alla baseline (giorno 0) dopo 28 giorni (giorno 28) di somministrazione giornaliera di *L. reuteri* ATCC 55730 alla dose di 4×10^8 CFU/die, e le sezioni biotiche sono state colorate per le cellule CD4+. (A) Prima della somministrazione di *L. reuteri* ATCC 55730 ("poche cellule disperse o aggregate"); (B) Dopo somministrazione di *L. reuteri* ATCC 55730 ("molti aggregati di gruppi di cellule" (freccia)).

La colonizzazione dello stomaco e del tratto GI superiore da parte di *L. reuteri*, la sua capacità d'inibire la crescita dell'*H. pylori*^{60,61} e dati clinici preliminari (dati in File Biogaia), incoraggiano la nostra continua ricerca in questa area.

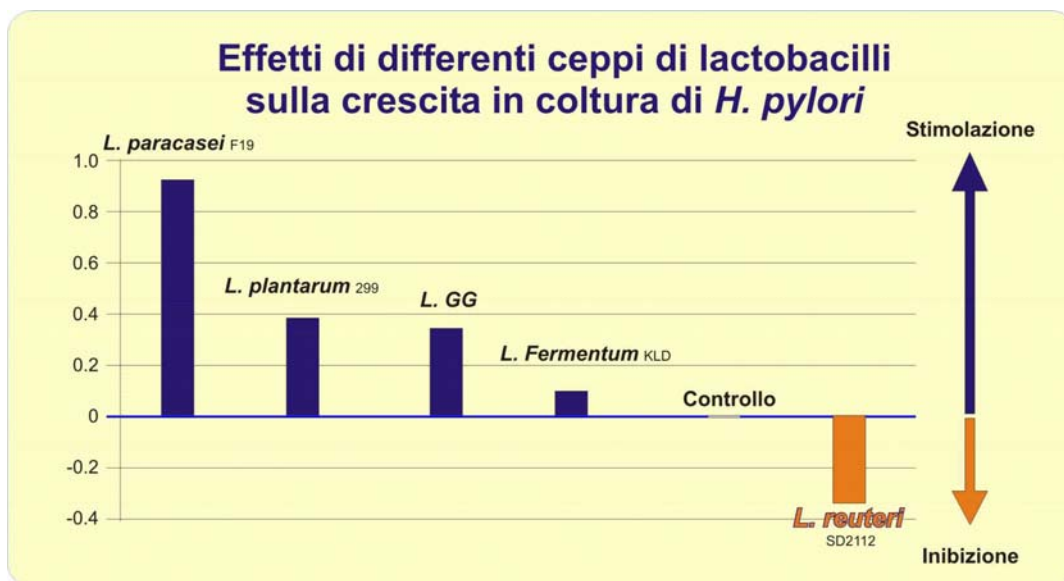
Figura 19

***L. reuteri* (ATCC 55730) in mezzo condizionato inibisce la crescita di *H. pylori* SS1**



Ceppo virulento di *H. pylori* SS1 in TSA con il 5% di sangue di pecora

Figura 20



Adattato da Ejhorn M.⁶¹

PROSPETTIVE FUTURE

Ricerche sui meccanismi molecolari attraverso i quali *L. reuteri* ATCC 55730 esplica i suoi effetti hanno mostrato che alcuni effetti probiotici sono ceppo-specifici dei lattobacilli e che tali effetti non possono essere estrapolati ad altre specie di lattobacilli.

La BioGaia ha focalizzato la sua ricerca nella selezione di nuovi ceppi di *L. reuteri* e di altre specie di *lattobacilli* che hanno la capacità di migliorare la salute nell'uomo.

Il nostro sviluppo di nuovi ceppi con proprietà antiinfiammatorie³⁶ e di prevenzione delle allergie crea le basi di una nuova generazione di probiotici capaci di migliorare la salute dell'uomo agendo in specifiche aree cliniche.

CONCLUSIONI

Lactobacillus reuteri, una delle specie veramente autoctone di *lactobacillus* nel tratto gastrointestinale umano, è ampiamente usato per le sue proprietà probiotiche per migliorare la salute dell'uomo.

Questa review illustra i lavori più significativi condotti nell'uomo e negli animali che documentano gli effetti di *L. reuteri* come probiotico.

I dati clinici su oltre 600 soggetti dagli adulti ai neonati prematuri confermano la sicurezza e l'efficacia di *L. reuteri* ATCC 55730.

I dati clinici mostrano che *L. reuteri* ATCC 55730 riduce significativamente l'incidenza e la gravità della diarrea di diversa eziologia e diminuisce i disturbi gastrointestinali e le infezioni.

La capacità di *L. reuteri* ATCC 55730 d'influenzare la risposta immune nel tratto GI può essere la base interpretativa dell'aumentata protezione contro i patogeni e del miglioramento della salute dei soggetti che assumono questo probiotico.

Tabella 11
Principali studi clinici con *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730

Trial (ref)	Aim	Study design	Groups	Nr. of subjects	Duration	Main outcome
Wolf (16)	Safety Healthy adults	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (1x10 ¹¹ CFU/day)	15 15	21 days	No clinical safety or tolerance problems
Wolf (17)	Safety Immunocompromised adults	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (1x10 ¹⁰ CFU/day)	20 15	21 days	No clinical safety or tolerance problems
Ruiz-Palacios (19)	Safety Children (1-3 years)	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuter</i> (1x10 ¹⁰ CFU/day)* <i>L. reuter</i> (1x10 ⁸ CFU/day)* <i>L. reuteri</i> (1x10 ⁶ CFU/day)*	20 18 16 18	21 days	No clinical safety or tolerance problems
Ruiz-Palacios (20)	Prevention of diarrhoea Children (1-3 years)	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (5x10 ⁷ CFU/day)*	120 119	14 weeks	Probiotic significantly reduced incidence of diarrhoea
Guerrero (21)	Prevention of diarrhoea Children (1-3 years)	R, DB, PC	Placebo Probiotic mix without <i>L. reuteri</i> ** Probiotic mix with <i>L. reuteri</i> (1.5x10 ⁸ CFU/day)**	130 129 129	16 weeks	<i>L. reuteri</i> -containing probiotic mix only significantly reduced incidence of diarrhoea
Shornikova (22)	Treatment of acute gastroenteritis in children (0.5-3 years)	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (1x10 ¹⁰⁻¹¹ CFU/day)	21 19	up to 5 days	<i>L. Reuteri</i> significantly reduced duration of gastroenteritis
Shornikova (23)	Treatment of acute rotavirus gastroenteritis in children (0.5-3 years)	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (1x10 ¹⁰ CFU/day) <i>L. reuteri</i> (1x10 ⁷ CFU/day)	25 21 20	up to 5 days	High dose <i>L. reuteri</i> significantly reduced duration of gastroenteritis Low dose tendency to similar effect
Karvonen (24)	Safety & colonisation Newborn term infants	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (1x10 ⁹ CFU/day) <i>L. reuteri</i> (1x10 ⁷ CFU/day) <i>L. reuteri</i> (1x10 ⁵ CFU/day)	28 25 25 12	30 days from birth	No clinical safety or tolerance problems Significant reduction in watery stools with <i>L. reuteri</i>
Vesikari (submitted)	Safety & colonisation Newborn term infants Premature infants	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (1x10 ⁸ CFU/day) Placebo <i>L. reuteri</i> (1x10 ⁹ CFU/day) <i>L. reuteri</i> (1x10 ⁷ CFU/day)	12 23 16 13 14	28 days from birth	No clinical safety or tolerance problems No clinical safety or tolerance problems
Weizman (25)	Safety Infants (3-65 days)	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (3x10 ⁸ CFU/day)*** <i>B. Bb12</i> (1x10 ⁹ CFU/day)	17 17 16	60 days	No clinical safety or tolerance problems with either probiotic
Weizman (35)	Prevention of infection Day-care children (4-10 months)	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (3x10 ⁸ CFU/day)*** <i>B. Lactis Bb12</i> (1x10 ⁹ CFU/day)	58 65 71	12 weeks	<i>L. reuteri</i> superior in significantly reducing incidence of gastrointestinal infection
Valeur (31)	Gastrointestinal colonisation Healthy adults	Open	<i>L. reuteri</i> (4x10 ⁸ CFU/day)	19	28 days	<i>L. reuteri</i> colonises the human stomach, duodenum and ileum
Kang (Korea)	Acute diarrhoea Children (1-3 years)	R, DB, PC	Placebo <i>L. reuteri</i> (2x10 ⁸ CFU/day)	25 25	5 days	<i>L. reuteri</i> significantly reduced duration of gastroenteritis

Abbreviations: R, randomised; DB, double-blind; B, blind; PC, placebo-controlled
 * also received *L. acidophilus* and *B. infantis* at constant dose
 ** Probiotic mix contained *L. acidophilus* and *B. infantis*
 *** Personal communication

REFERENCES

1. Reuter, G. 1965. Das vorkommen von laktobacillen in lebensmitteln und ihr verhalten im menschlichen intestinaltrakt. Zbl Bak Parasit Infec Hyg I Orig. 197 S: 468-87
2. Kandler, O., K. Stetter and R. Kohl. 1980. *Lactobacillus reuteri* sp. nov. a new species of heterofermentative lactobacilli. Zbl Bakt Hyg Abt Orig. C1: 264-9.
3. Mitsuoka, T. 1992. In: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Elsevier Applied Science, p 76.
4. Casas, I.A., Dobrogosz, W.J. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. Microbial Ecology in Health and Disease. 12: 247-285.
5. Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Volume 2). P.H. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, editors. 1208-1234.
6. Reuter, G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2:43-53
7. Axelsson, L., T. Chung, W. Dobrogosz, and S. Lindgren. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microbial Ecology Health Disease 2:131-136
8. Talarico, T.L., I. Casas, T.C. Chung and W.J. Dobrogosz. 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1854-1858.
9. Chung, T.C., L. Axelsson, S.E. Lindgren, and W.J. Dobrogosz. 1989. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. Microb.Ecol.Health Dis. 2:137-144.
10. Hölzel, A., M.G. Gänzle, G.J. Nicholson, W.P. Hammes, G. Jung. 2000. The First Low Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a New Tetramic Acid. Angew Chem Int Ed 39(15): 2766-2768.
11. Gänzle M.G., A. Hölzel, J. Walter, G. Jung and W.P. Hammes. 2000. Characterisation of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH 2584. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4325-4333.
12. Jacobsen, C., V. Nielsen, A. Hayford, P. Moller, and et al. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl.Environ.Microbiol. 65:4949-1956
13. Lorca, G.L., T. Wadström, G. Font de Valdez and Å. Ljungh . 2001. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro. Curr. Microbiol. 42:39-44.
14. Sinkiewicz, G., I. Casas and J. Thorball. 2001. Inhibition of common pathogens by the probiotic *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*). Clin. Nutr. 20 (suppl 3): 66 (abstract no. 244).
15. Kakimoto, S.Y., Y. Sumino, S. Akiyama and Y. Nakao. 1989. Purification and characterisation of acid urease from *Lactobacillus reuteri*. Agric. Biol. Chem. 53:1119-1126.
16. Nollet, L.J.A., D.I. Pereira and W. Verstraete. 1999. Effect of a probiotic salt hydrolytic *Lactobacillus reuteri* on the human gastrointestinal microbiota as simulated in the SHIME reactor system. Microbial Ecol. Health Dis. 11: 13-21.
17. Jonsson, H., E. Ström and S. Roos. 2001. Addition of mucin to the growth medium triggers mucus-binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri* in vitro. FEMS Microbiol Lett. 204:19-22.
18. Bayer, A.S., A.W. Chow, D. Betts and L.B. Guze. 1978. Lactobacillemia – report of nine cases. Am. J. Med. 64: 808-813.
19. Andriessen, M.P.H.M., J.G. Mulder and D.T. Sleufer. 1991. *Lactobacillus* septicaemia, an unusual complication during the treatment of metastatic choriocarcinoma. Gynecologic Oncology 40: 87-89
20. Aguirre, M and M.D. Collins. 1993 Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Appl. Bacteriol. 75:95-107.
21. Rautio, M., H. Jousimies-Somer, H. Kauma et al. 1999. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. Clin. Inf. Dis. 28:1159-1160.
22. Salminen MK Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, Sarna S, Valtonen V and Järvinen A. Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. Clin Inf Dis 2002 35, 1155-1160.
23. Wolf, B.W., K. Garleb, D. Ataya, and I.A. Casas. 1995. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* in healthy adults male subjects. Microbial Ecology Health Disease 8:41-50.
24. Wolf, B.W., K. Wheeler, D. Ataya, and K. Garleb. 1998. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the human immunodeficiency virus. Food Chem. Toxicol. 36: 1085-1094.
25. Ruiz-Palacios, G., F. Tuz, F. Arteaga, M. Guerrero, M. Dohnalek, and M. Hilty. 1996a. Tolerance and fecal colonization with *Lactobacillus reuteri* in children fed a beverage with a mixture of *Lactobacillus* spp. Pediatr.Res. 39: Abstract no. 1090.
26. Ruiz-Palacios, G., M. Guerrero, M. Hilty, M. Dohnalek, P. Newton, J. Calva, T. Costigan, F. Tuz, and F. Arteaga. 1996b. Feeding of a probiotic for the prevention of community-acquired diarrhea in young Mexican children. Pediatr.Res. 39:Abstract no. 1089.
27. Ruiz-Palacios, G.M., M. Guerrero and J. Calva, 1996c. Effect of viable probiotics on incidence and severity of diarrhea manuscript for publication.
28. Shornikova, A., I.A. Casas, E. Isolauri, H. Mykkanen, and T. Vesikari. 1997a. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. J. Ped. Gastro. Nutr. 24:399-404.
29. Shornikova, A., I.A. Casas, H. Mykkanen, E. Salo, and T. Vesikari. 1997b. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. Pediatr. Infect. Dis. J. 16:1103-1107.
30. Karvonen, A., I. Casas and T. Vesikari. 2001. Safety and possible anti-diarrhoeal effect of the probiotic *Lactobacillus reuteri* after oral administration to neonates. Clin. Nutr. 20 (suppl 3): 63 (abstract no. 216).
31. Alsheikh & Weizman, 2003 Safety of infant formula supplemented with two strains of probiotics in early infancy. Pediatric Academic Societies Annual Meeting 2003, Abstract 986.
32. Kelleher SL, Casas I, Carbajal N, Löönerdal B. Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys. JPNJ 35; 162-168 (2002).
33. Lapiere L, Germond JE, Ott A, et al. Appl Environ Microbiol. 65; 4002-4007 (1999)
34. Johansson, M., G. Molin, B. Jeppsson, S. Nobaek, S. Ahrne, and S. Bengmark. 1993. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *In vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. Appl. Environ. Microbiol. 59:15-20.
35. Zvi Weizman, MD; Ghaleb Asli, MD; and Ahmed Alsheikh, MD. Effect of a Probiotic Infant Formula on Infections in Child Care Centers: Comparison of Two Probiotic Agents. PEDIATRICS Vol. 115 No. 1 January 2005
36. Rosenfeldt V, Fleischer Michealsen K, Jokobsen M, Nexmann Larsen C, Lange Moller P, Pedersen P, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard. A. Effect of probiotic Lactobacillus strains in young children hospitalized with acute diarrhea. Ped Inf Dis J 2002;21(5):411-416.
37. Rosenfeldt V, Fleischer Michealsen K, Jokobsen M, Nexmann Larsen C, Lange Moller P, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard A. Effect of probiotic Lactobacillus strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. Pediatric Infectious Disease Journal 2002;21(5):417-419.

38. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Fleischer Michealsen K, Jeppesen DL, Valerius NH, Paerregaard A. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin Immunol* 2003; 111, 389-395.
39. Waters WR, Harp JA, Wannemuehler MJ, Carbajal NY, Casas IA. Effects of *Lactobacillus reuteri* on *Cryptosporidium parvum* infection of gnotobiotic TCR-alpha-deficient mice. *J Eukaryotic Microbiol* 1999; 46: 60S-61S.
40. Maasen CBM, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJH, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJA and Claassen E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 2000; 18: 2613–2623
41. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168: 171-178
42. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM and Fedorak, RN. *Lactobacilli* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterol.* 1999; 116: 1107-1114.
43. Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, Jewell LD, Renie RP, Fedorak RN. Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin-10 gene deficient mice. *Gastroenterology* 2000; 118: 1094-1105.
44. Madsen KL, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jojon H, Yachimee C, Doyle JS, Jewell LD, DeSimone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; 121: 580-591
45. Casas IA, Eden's FW, Dobrogosz WJ. *Lactobacillus reuteri*: an effective probiotic for poultry, other animals and humans. In: Salminen S, von Wright A, eds. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1998; 475-518.
46. Mao Y, Yu JL, Lungh A, Molin G, Jeppsson B. Intestinal immune response to oral administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC, *Lactobacillus plantarum* DSM 9843, pectin and oatbase on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Microbial Ecol Health Dis* 1996; 9: 261-270
47. Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, Jeppsson B. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fibre on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 111: 334-344
48. Ferreira R, Forsyth LE, Richman PL. Changes in the rate of crypt epithelial cell proliferation and mucosal morphology induced by a T-cell-mediated response in human small intestine. *Gastroenterology* 1990; 98:1255-1263.
49. Banasaz M, Norin E, Holma R, Mitvedt T. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environmental Microbiol.* 2002; 68:3031-3034
50. Eamonn Connolly. Atti 2nd Congress on Probiotic and Prebiotics Roma 7-9 Settembre 2003
51. Dunham HJ, Casas IA, Edens FW, Parkhurst CR, Garlich JD, Dobrogosz WJ. Avian growth depression in chickens induced by environmental, microbiological, or nutritional stress is moderated by probiotic administrations of *Lactobacillus reuteri*. *Biosci Microflora* 1998; 17: 133-9.
52. Casas IA, Edens FW, Parkhurst CR, Dobrogosz WJ. Probiotic administrations of *Lactobacillus reuteri* moderate avian growth depression in turkeys. *Biosci Microflora* 1998; 17: 125-31.
53. Casas IA, Edens FW, Dobrogosz WJ, Parkhurst CR. Performance of GAIAspray® and GAIAspray®: A *Lactobacillus reuteri*-based probiotic for poultry. In: Jensen JF, Hinton MH, Mulder RWW, eds. Prevention and control of potentially pathogenic microorganisms in poultry and poultry meat products. Proceedings 12, FLAIR No.6, Probiotics and pathogenicity; 1993; Beekbergen. The Netherlands: DLO Spelderholt Centre for Poultry Research and Informational Services, 1993: 63-71.
54. Alak IJ, Wolf BW, Mdurvwa EG, Pimentel-Smith GE, Adeyemo O. Effect of *Lactobacillus reuteri* on intestinal resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in a murine model of acquired immunodeficiency syndrome. *J Infect Dis* 1997; 175: 218-21.
55. Carbajal N, Sriburi A, Carter P, Dobrogosz W, Casas, I. Probiotic administrations of *Lactobacillus reuteri* protect mice from *Salmonella typhimurium* infection. Proceedings of the 36th Annual Meeting of the Association for Gnotobiotics. 1998; Bethesda (MD): Association for Gnotobiotics; 1998.
56. Casas IA, Dobrogosz WJ. *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease humans and animals. *Microbiol Ecology in Health and Disease* (2000) 12:247-285.
57. Mowat AMcL, Felstein MW, Borland A, Parrott DMV. Experimental studies in immunologically mediated enteropathy. I. Development of cell-mediated immunity and intestinal pathology during a graft-versus-host reaction in irradiated mice. *Gut* 1988; 29: 949-56.
58. Robijn RI, Logtenberg T, Wiegman 11, van Berge Henegouwen GP, Houwen RW, Koningsberger Ie. Intestinal T lymphocytes. *Scan J Gastroenterol* 1995; 212 (Suppl 30): 23-33.
59. Casas IA, Edens FW, Dobrogosz WJ. *Lactobacillus reuteri*: an effective probiotic for poultry and other animals. In: Salminen S, von Wright A, eds. *Lactic acid bacteria*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1998: 475-518.
60. Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K. (2004) Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70(2);1176-1181.
61. Ejhorn M. Presence of *Lactobacillus* spp in human stomach and their effects on *Helicobacter pylori*. Uppsala University, Sweden, June 2000.
62. Johnson C, Dicksved J, Jonsson H, Roos S. (2003) Anti *Helicobacter pylori* activity among lactic acid bacteria isolated from gastric biopsies and strains of *Lactobacillus reuteri*. Presented at the European *Helicobacter* Study Group Workshop in Stockholm, Sept. 3-6, 2003. *Helicobacter* 2003;8:473, abstract 16.33.