Protocollo n °: LR-FC-06

RUOLO DEL *LACTOBACILLUS REUTERI* NELLA MODULAZIONE DELL'INFIAMMAZIONE BRONCHIALE E INTESTINALE IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA (FC):

STUDIO IN DOPPIO CIECO RANDOMIZZATO CONTROLLATO VS PLACEBO

Autori: Serena Quattrucci, Matilde Rolla, Alessandra Menichella, Lucilla Manganozzi, Giovanni Di Nardo* and Salvatore Cucchiara*.

Centro di Riferimento Fibrosi Cistica Regione Lazio e

*UOC di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica, Università di Roma "La Sapienza".

Versione del 18/09/06

Introduzione

Infiammazione polmonare nella FC. Nei pazienti con fibrosi cistica l'infiammazione delle vie aeree è presente già nell'infanzia e può contribuire in modo significativo alla patogenesi del danno tissutale e al conseguente deterioramento della funzionalità polmonare (*Berger M. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:857–858*).

Alcuni autori hanno riscontrato che nei pazienti con FC vi è una alterata regolazione dei processi infiammatori, sia attraverso una persistente produzione di citochine pro-infiammatorie quali l'IL-6, l'IL-8 e il TNFα, che attraverso la ridotta produzione di citochine anti-infiammatorie quali l'IL-10 (*Bonfield TL. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:2111-2118; Dean TP. Pediatr Res 1993;34:159-161, Bonfield TL. J Allergy Clin Immunol 1999;104:72–78*). Per tale motivo vi è un crescente interesse sui farmaci in grado di modulare la risposta infiammatoria. In particolare uno studio recente ha dimostrato che il montelukast, un antagonista dei recettori dei leucotrieni, è capace di: 1) migliorare lo score della tosse e del wheezing, 2) migliorare il FEV1 e il PEF, 3) ridurre i livelli di IL-8 e aumentare quelli di IL-10 nell'espettorato, concludendo quindi che il Montelukast ha un effetto anti-infiammatorio nei pazienti con FC e che a tale effetto corrisponde un miglioramento dei sintomi (*Stelmach I, Ann Allergy Asthma Immunol. 2005;95:372-80*).

Infiammazione intestinale nella FC e ruolo dei probiotici. Bruzzese et al. hanno recentemente dimostrato che anche l'infiammazione intestinale è comunemente presente nei pazienti con FC. Gli autori hanno inoltre osservato che dopo 4 settimane di terapia con *Lactobacillus GG* i livelli di calprotectina fecale (marker non invasivo utilizzato per lo studio dell'infiammazione intestinale) si erano notevolmente ridotti, suggerendo che la flora batterica intestinale gioca un ruolo importante nella genesi dell'infiammazione intestinale e che i probiotici possono avere un effetto terapeutico (*E. Bruzzese. Aliment Pharmacol Ther 2004; 20: 813–819*).

Lactobacillus Reuteri: quale ruolo nella FC ? Il *L. reuteri* è una specie eterofermentante che risiede nel tratto gastrointestinale (GI) dell'uomo ed è considerato come una delle poche specie di *Lactobacillus* autoctone nell'uomo (*Reuter G. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2001;2:43-53*). 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 battericide (*Casas, I.A., Microbial Ecology in Health and Disease 2000;12: 247-285*).

Studi in modelli animali. Sia nel pulcino che nel topo il trattamento con *L. reuteri* riduce il tasso di mortalità dovuta all'infezione da *Salmonella typhimurium* e da *Cryptosporidium parvum (ref).*

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, infatti, il *L. reuteri* è capace di prevenire la traslocazione dei microrganismi patogeni dall'intestino ad altri organi e di mantenere l'integrità della mucosa intestinale*(ref)*.

Effetti di L. reuteri sull'immunità. Gli effetti di L. reuteri sul sistema immune intestinale sono stati investigati in diversi studi. Casas 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 *(ref)*.

Successivamente, Maassen 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. Fra i vari effetti, gli investigatori hanno mostrato che *L. reuteri* ha significativamente aumentato i livelli di IgA nei linfociti B della lamina propria e migliorato la specifica risposta anticorpale IgG sugli antigeni *(ref)*.

Studi di efficacia clinica. Weizman ha effettuato un lavoro in doppio-cieco placebo controllato, con formule infantili addizionate o con L. reuteri o con B. bifidum per 12 settimane. I due probiotici hanno prodotto meno episodi di malattie GI, meno episodi febbrili e meno infezioni del placebo e gli autori hanno rilevato che L. reuteri si è dimostrato superiore al placebo ed al Bifidobacterium bifidum nel mantenere lo stato di salute gastrointestinale dei lattanti riducendo il numero delle visite mediche, delle prescrizioni di antibiotici e delle assenze dal nido *(ref)*. Interessanti dati clinici sono stati prodotti da Rosenfeldt, in un lavoro in doppio-cieco, crossover placebo controllato con una miscela di *L. reuteri* e *L. rhamnosus* in 41 bambini con dermatite atopica. Tali dati indicano un miglioramento della dermatite acuta, dei sintomi gastrointestinali e della permeabilità intestinale in questi pazienti *(ref)*.

In conclusione tutti questi dati, ottenuti sia in modelli sperimentali che in studi clinici, suggeriscono che il *L. reuteri* oltre alle note attività probiotiche esercita una attività immunomodulatoria sia locale che sistemica e di protezione contro i patogeni. Per tale motivo in questo studio vogliamo testare l'ipotesi che nei pazienti con FC il *L. reuteri* possa svolgere una attività anti-infiammatoria e/o antinfettiva anche a livello polmonare.

Obiettivi

Valutare, in pazienti con Fibrosi Cistica Lieve, l'effetto della somministrazione per 6 mesi di una dose standard di *Lactobacillus Reuteri* sui seguenti parametri clinici, laboratoristici e strumentali:

1. numero di episodi infettivi respiratori, gastrointestinali o a carico di altri organi ed apparati.
2. colonizzazione di nuovi micorganismi.
3. sviluppo di antibiotico resistenza.
4. espressione di citochine pro- (IL- 6, IL- 8) ed anti-infiammatorie (IL- 10) sia sul siero che sull'espettorato indotto.
5. infiammazione intestinale.
6. funzionalità respiratoria.

Disegno dello studio

60 pazienti che soddisferanno i criteri di inclusione saranno sottoposti al momento dell'arruolamento alle seguenti valutazioni:

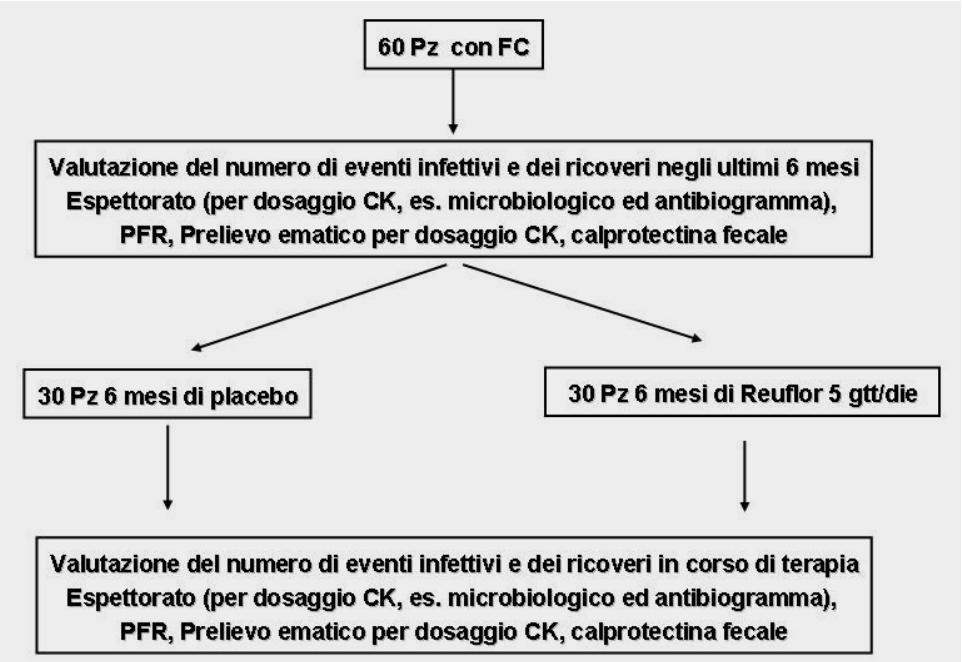
1. Registrazione del numero di ricoveri e di eventi infettivi (includendo non solo le riacutizzazioni broncopolmonari, ma anche episodi infettivi gastrointestinali e infezioni a carico di altri organi ed apparati) negli ultimi 6 mesi.
2. Espettorato indotto sul quale eseguire:
    - Esame microbiologico per la ricerca dei microrganismi comuni, dell'aspergillo e dei micobatteri con successivo antibiogramma.
    - Dosaggio dell'IL-6, IL-8 e IL-10.
3. Prelievo ematico comprendente: emocromo, PCR, creatininemia, azotemia, AST, ALT, gamma-GT, bilirubina totale e frazionata, colesterolo, trigliceridi, proteine

totali, albumina, PT, PTT, fibrinogeno, lipasi, amilasi, dosaggio sierico del IL-6, IL-8 e IL-10.

4. Prove di funzionalità respiratoria.
5. Dosaggio della calprotectina fecale.

Qualora nel corso dei precedenti esami non emergano criteri di esclusione i pazienti saranno randomizzati in doppio cieco in modo da ricevere un gruppo (30 pazienti) 5 gocce di Reuflor e l'altro gruppo (30 pazienti) 5 gocce di placebo per 6 mesi.

Al termine dei sei mesi di trattamento i pazienti verranno sottoposti alle stesse procedure effettuate al momento dell'arruolamento in modo da testare l'effetto della terapia sui vari parametri oggetto dello studio. (si veda schema)



Pazienti e Metodi

Pazienti

Criteri di inclusione.

1. Diagnosi di fibrosi cistica (cloro nel sudore > 60 meq/L o presenza di 2 mutazioni note).
2. FEV1 > 70%

Criteri di esclusione.

1. FEV1 < 70%
2. Colonizzazione con *B. cepacia,* aspergillo o con micobatteri.
3. Riacutizzazione broncopolmonare negli ultimi 2 mesi.
4. Uso di farmaci anti-infiammatori quali: steroidi sistemici, FANS, stabilizzanti della membrana mastocitaria, antileucotrieni.

Lo studio sarà approvato dal comitato etico e un consenso informato sarà fatto firmare ai pazienti o, in caso di pazienti minorenni, ai genitori o a chi ne esercita la patria potestà.

Prove di funzionalità respiratoria (PFR)

Le PFR verranno effettuate sia all'inizio che alla fine dello studio in entrambi i gruppi di trattamento al fine di valutare il possibile effetto del *L. Reuteri* sulla funzionalità respiratoria.

Induzione dell'espettorato

La raccolta dell'espettorato indotto verrà effettuata entro le 10.30 del mattino in pazienti a digiuno. Per l'esecuzione dell'espettorato indotto verrà applicato un protocollo precedentemente validato (*N. Reinhardt, Eur Respir J 2003;22:497–502.*) e comprendente l'inalazione di 200 μg di salbutamolo prima della procedura al fine di minimizzare il rischio di broncocostrizione. La soluzione salina ipertonica sarà somministrata mediante nebulizzatore a ultrasuoni utilizzando tre concentrazioni crescenti (3, 4 e 5%) ciascuna inalata per 5 minuti.

Ognuno dei 5 minuti di inalazione sarà seguito da una espettorazione. I tre campioni di espettorato così ottenuti saranno microscopicamente separati dalla saliva e processati per l'esame microbiologico con antibiogramma e per il dosaggio delle citochine.

L' espettorato indotto verrà effettuato sia all'inizio che alla fine dello studio in entrambi i gruppi di trattamento al fine di valutare il possibile effetto del *L. Reuteri* sulla colonizzazione microbica, sullo sviluppo di antibiotico-resistenza e sulla produzione di citochine pro- e/o anti-infiammatorie.

Esame microbiologico, antibiogramma e dosaggio delle citochine su espettorato indotto

I tre campioni di espettorato indotto, raccolto dopo la somministrazione di concentrazioni crescenti di soluzione salina sterile e apiretica a temperatura ambiente, saranno trasportati in contenitori sterili e immediatamente processati in laboratorio.

Il primo campione verrà inviato per l'esame microbiologico; il secondo usato per la conta cellulare differenziata e per la fissazione di vetrini sottoposti a colorazione May-Grunwald-Giemsa e Red Oil. La percentuale di granulociti eosinofili, neutrofili, macrofagi e linfociti verrà calcolata al microscopio ottico con la conta di 200 cellule.

In seguito dal terzo campione verrà sedimentata la componente cellulare tramite centrifugazione a temperatura ambiente, 1500 giri per 10 minuti; il supernatante verrà allontanato, aliquotato e conservato a – 70° C fino alla processazione per il dosaggio delle citochine.

Verranno dosati i livelli di due citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-8) e di una citochina anti-infiammatoria (IL-10) usando un saggio immunoenzimatico ELISA (R&DSystem, Inc.-Minneapolis, USA). Ogni campione verrà analizzato in doppio. La procedura verrà eseguita in accordo con le istruzioni del produttore e tutti i campioni verranno analizzati con la medesima diluizione e paragonati al range della curva di calibrazione (*Mamessier E, Milhe F, Badier M, Thomas P, Magnan A, Reynaud-Gaubert M. Comparison of induced sputum and bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. J Heart Lung Transplant. 2006 May;25(5):523-32*).

Dosaggio delle citochine sieriche.

Il siero raccolto sia prima che dopo i sei mesi di terapia verrà conservato a – 70° C fino alla processazione per il dosaggio delle citochine.

Verranno dosate le medesime citochine dosate su espettorato utilizzando la stessa procedura.

Studio dell'infiammazione intestinale

L'infiammazione intestinale verrà valutata mediante il dosaggio della calprotectina fecale che è considerata un affidabile marker non invasivo di infiammazione intestinale *(Bunn SK, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; Bunn SK, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; 33: 14–22).* Il dosaggio della calprotectina fecale verrà effettuato sia al momento del reclutamento che dopo sei mesi di terapia e in entrambi i gruppi di trattamento (placebo e Reuflor) al fine di valutare l'effetto del *L. Reuteri* sull'infiammazione intestinale.

I campioni di feci raccolti prima e dopo terapia verranno storati a -80°C. La concentrazione della calprotectina fecale sarà misurata con metodica ELISA usando un kit commercialmente reperibile (Calprest Eurospital, SpA, Trieste, Italy). In breve una aliquota di feci congelate verrà sospesa in un buffer prediluito, vortexata e centrifugata, il sovrannatante verrà analizzato mediante ELISA (in accordo con le istruzioni fornite dalla casa produttrice).

La concentrazione normale di calprotectina fecale nell'adulto va da 0 a 50 μg/g di feci; un valore tra 50 e 100 μg/g viene considerato border-line e richiede follow-up, al contrario valori maggiori di 100 μg/g indicano infiammazione intestinale. Questo livello di cut off può essere usato anche nei bambini al di sopra dei 4 anni (*Fagerberg UL, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 37: 468–72*, *Olafsdottir E, et al. Acta Paediatr 2002;91: 45–50*).

Il dosaggio della calprotectina fecale verrà effettuato sia all'inizio che alla fine dello studio in entrambi i gruppi di trattamento al fine di valutare il possibile effetto del *L. Reuteri* sull' infiammazione intestinale.

Valutazione dei parametri clinici

Numero di riacutizzazioni broncopolmonari. Il numero di riacutizzazioni broncopolmonari verrano valutati sia nei sei mesi precedenti l'inizio del trattamento che nei mesi di trattamento in modo da valutare l'eventuale effetto del *L. Reuteri* sulle infezioni broncopolmonari. Sarà definita riacutizzazione broncopolmonare la presenza di segni e sintomi suggestivi di infezione broncopolmonare (tosse, dispnea, febbre, aumento dell'espettorato) solo se supportati da esami laboratoristici (quali l'emocromo e la PCR) e dalla radiografia del torace che comprovino la natura infettiva dei sintomi.

Numero di infezioni gastrointestinali o a carico di altri organi ed apparati. Il numero di infezioni gastrointestinali o a carico di altri organi ed apparati verrano valutati sia nei sei

mesi precedenti l'inizio del trattamento che nei mesi di trattamento in modo da valutare l'eventuale effetto del *L. Reuteri*. Sarà definita infezione gastrointestinale la presenza di segni e sintomi suggestivi di infezione gastrointestinale (vomito, diarrea, febbre, dolore addominale) solo se supportati da esami laboratoristico-strumentali che escludano altre cause di tali sintomi (infezioni a carico dell'apparato urinario, respiratorio o di altri apparati) o che ne documentino l'agente etiologico (esame colturale delle feci, ricerca del rotavirus sulle feci). Le infezioni a carico di altri organi ed apparati (otiti, sinusiti etc…) saranno aggiunte al computo delle infezioni solo se diagnosticate da medici dell'equipe del centro fibrosi cistica o in corso di visita specialistica.

Durata dello studio

Ciascun paziente parteciperà allo studio per un totale di 6 mesi. La durata complessiva prevista per il reclutamento dei 60 pazienti e per il completamento del trattamento è di circa 2 anni. Gli sperimentatori si impegnano tuttavia a comunicare al Comitato Etico qualsiasi variazione circa la durata dello studio.

Farmaco in studio, placebo e custodia del farmaco.

Reuflor contiene per ogni goccia (0,19 ml) 10^8 CFU di *Lactobacillus Reuteri*.

Il *Lactobacillus reuteri* è considerato una delle poche specie autoctone di Lattobacilli del tratto gastrointestinale (*Reuter G. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2001;2:43-53*) umano ed è ampiamente usato, per le sue proprietà probiotiche, come trattamento per il riequilibrio della flora batterica gastrointestinale (*Nollet L.J.A., Microbial Ecol. Health Dis. 11: 13-21*).
La sicurezza di *L. reuteri* 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 (*Wolf B.W., Microbial Ecology Health Disease 1995;8:41-50; Ruiz-Palacios G., Pediatr.Res. 1996;39:Abstract no.1090*). In particolare gli altri ceppi di *Lactobacilli* sono stati collegati a casi di infezione in pazienti immunocompromessi o affetti da altre gravi condizioni cliniche. Al contrario non ci sono segnalazioni di un collegamento del *L. reuteri* con malattie o processi patologici nell'uomo o negli animali (*Salminen MK Clin Inf Dis 2002 35, 1155-1160*).

Sia il farmaco che il placebo saranno custoditi a temperatura ambiente e somministrati alla dose di 5 gocce/die indifferentemente dai pasti. Le gocce possono essere miscelate in acqua o in altre bevande fredde di qualsiasi tipo, il farmaco può essere mescolato nel latte ad una temperatura non superiore a 37 °C.

Le gocce di placebo saranno preparate in modo da essere indistinguibili sia al gusto e che alla vista dal prodotto in studio.

Sanitario responsabile della custodia dei farmaci durante la sperimentazione: Dott.ssa Serena Quattrucci.

Convenzione economica

Lo studio è di natura spontanea e come tale è regolato dal D.M. del 17/12/04. La società Italchimici, in conformità dell'art. 2, comma 6 fornirà gratuitamente il prodotto in studio ed il corrispondente placebo, nonché la copertura assicurativa (punto precedente). I dati derivanti dallo studio saranno di esclusiva proprietà dell'Azienda Ospedaliera.

Bibliografia

Berger M. Lung inflammation early in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:857–858.

Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:2111-2118

Stelmach I, Korzeniewska A, Stelmach W, Majak P, Grzelewski T, Jerzynska J. Effects of montelukast treatment on clinical and inflammatory variables in patients with cystic fibrosis. Ann Allergy Asthma Immunol. 2005;95:372-80

E. Bruzzese, V. Raia, G. Gaudiello, G. Polito, V. Buccigrossi, V. Formicola, A. Guarino. Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. Aliment Pharmacol Ther 2004; 20: 813–819

Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol 1999;104:72–78

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.

Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Golden BE. Faecal calprotectina as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; 32:171–77.

Dean TP, Dai Y, Shute JK, Church MK, Warner JO. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum and sera of children with cystic fibrosis. Pediatr Res 1993;34:159-161.

Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE. Faecal calprotectin validation has a non-invasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; 33: 14–22.

Fagerberg UL, Loof L, Merzoug RD, Hansson L-O, Finkel Y. Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 37: 468–72.

Casas, I.A., Dobrogosz, W.J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. Microbial Ecology in Health and Disease 2000;12: 247-285.

Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. Acta Paediatr 2002;91: 45–50.

Reuter G. The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2001;2:43-53.

Nollet L.J.A., D.I. Pereira and W. Verstraete. Effect of a probiotic salt hydrolytic *Lactobacillus reuteri* on the human gastrointestinal microbiota as simulated in the SHIME reactor system. Microbial Ecol. Health Dis. 1999;11: 13-21.

Wolf B.W., K. Garleb, D. Ataya, and I.A. Casas. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* in healthy adults male subjects. Microbial Ecology Health Disease 1995;8:41-50.

Ruiz-Palacios G., F. Tuz, F. Arteaga, M. Guerrero, M. Dohnalek, and M. Hilty. Tolerance and fecal colonization with *Lactobacillus reuteri* in children fed a beverage with a mixture of *Lactobacillus* spp. Pediatr.Res. 1996;39:Abstract no.1090.

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.

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.

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.

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.

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

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.