



Valutazione del ruolo di alcuni batteri lattici in soggetti in età pediatrica sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche

Ida Nardiello, Chiara Gagliardone, Elena Bergami, Francesca Introzzi,
Gian Luigi Marseglia, Marco Zecca, Patrizia Comoli, Anna Maria Castellazzi

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Valutazione del ruolo di alcuni batteri lattici in soggetti in età pediatrica sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche

Lo studio si propone di analizzare la fattibilità di un trattamento con probiotici per la prevenzione delle complicanze gastrointestinali e delle infezioni in riceventi pediatrici di trapianto di cellule staminali emopoietiche, alla luce del dibattito tuttora in corso sulla sicurezza di impiego dei probiotici nell'ospite immunocompromesso, valutandone l'impatto sulla composizione della flora fecale, sul profilo della ricostituzione immunologica e sull'outcome clinico.

Evaluation of the role that some lactic acid bacteria play in pediatric patients undergone hematopoietic stem cell transplantation

The study's purpose is to examine the feasibility of probiotics treatment for prevention of gastrointestinal complications and infections in pediatric recipients of hematopoietic stem cell transplantation, considering the debate, currently in progress, regarding the safety in use of probiotics into immunocompromised host, analyzing the effect on fecal macrobiotic composition, immunological reconstitution profile and clinical outcome.

Introduzione

Microbiota e probiotici

La flora intestinale è formata da circa 10^{14} batteri, pari cioè a quasi dieci volte il numero delle cellule che costituiscono il corpo umano [1]. La sua composizione è variabile: troviamo infatti batteri aerobi e anaerobi facoltativi, quali Streptococcus, Lactobacillus ed Enterobacteriaceae, a livello del piccolo intestino, mentre prevalgono gli anaerobi obbligati, quali Bacterioides, Bifidobacterium e Clostridium, in corrispondenza del colon [1]. Essa è inoltre distinta in due differenti nicchie ecologiche: quella mucosale, che include batteri adesi alla superficie delle cellule epiteliali, prevalentemente coinvolti nei processi immunologici e infiammatori, e quella luminale, a cui va riconosciuto un ruolo metabolico. Nel 2001 la Food and Agriculture Organization of the United Nations e la World Health Organization hanno definito i probiotici come "micro-

ganismi vivi che, quando somministrati in quantità adeguate, conferiscono all'ospite un beneficio per la salute". Essi sono disponibili come integratori, ma possono essere ingeriti anche tramite i cosiddetti cibi funzionali, alimenti arricchiti, a cui sono stati addizionati ceppi batterici selezionati.

Trapianto di cellule staminali emopoietiche

Per trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE) si intende l'infusione delle medesime in un soggetto con la finalità di ottenere la ricostituzione della normale emopoiesi [2]. Classicamente, si valuta l'attecchimento in base alla comparsa in circolo di neutrofili e piastrine, tralasciando invece l'aspetto della ricostituzione immunitaria che avviene in tempi diversi. Le cellule NK sono le prime a comparire, di solito già entro 2-3 settimane dal trapianto, seguite dai linfociti B, i cui livelli permangono bassi durante i primi 3 mesi dopo il trapianto, per poi aumentare e raggiungere un plateau tra i 6 e i 9 mesi. La sintesi di IgM si normalizza intorno al terzo mese dal TCSE, mentre per quanto concerne le IgG la loro secrezione viene rilevata tra i 12 e i 24 mesi nella maggior parte dei casi. La ricostituzione dei linfociti T è invece più tardiva: la conta periferica delle cellule T si normalizza dopo un periodo di tempo variabile dai 3 ai 12 mesi e il completo recupero funzionale spesso richiede ancora più tempo. È questo uno dei più importanti elementi che pregiudicano la riuscita del trapianto, in cui l'immunità T-cellulare è fondamentale per la prevenzione di infezioni opportunistiche o della Graft-versus-Host Disease (GvHD). La GvHD acuta e le infezioni sono tra le complicanze maggiormente temute dopo TCSE [2].

La radio/chemioterapia di condizionamento pre-TCSE determina un danno della mucosa intestinale che, unitamente al diffuso impiego di profilassi antimicrobica, porta al sovvertimento della flora batterica residente. L'alterazione del microbiota favorisce la colonizzazione della mucosa da parte di patogeni, che, nell'ospite immunocompromesso, possono più facilmente superare la barriera mucosale e traslocare ad altri organi, dando luogo a batteriemia, setticemia fino a quadri di multi-organ failure. La GvHD è un disordine immunologico multisistemico causato dall'aggressione dei tessuti sani del ricevente immunocompromesso da parte dei linfociti T immunocompetenti del donatore, che riconoscono proteine cellulari di superficie non condivise e attaccano le cellule che li esprimono.

Scopo del lavoro

Nel caso dei pazienti sottoposti a TCSE, i probiotici potrebbero avere un ruolo nella profilassi delle infezioni, essendo queste ultime causate dalla flora endogena traslocata dalla mucosa intestinale.

Inoltre, attraverso un'azione di ripristino dell'equilibrio del microbiota e ad un'influenza diretta sul sistema immune, con effetto sostanzialmente antinfiammatorio ed immunomodulatore, potrebbero contribuire a ridurre il rischio di GvHD acuta. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare, in una coorte di riceventi pediatrici di TCSE in condizioni cliniche stabili e a circa due mesi dalla procedura trapiantologica, la fattibilità di una terapia profilattica con probiotici nella prevenzione delle infezioni e delle complicanze gastroenterologiche del TCSE, valutandone l'impatto sulla composizione della flora fecale, sul profilo della ricostituzione immunologica e sull'outcome clinico.

Materiali e metodi

Per l'arruolamento sono stati considerati 19 pazienti, in età pediatrica, sottoposti a TCSE allogenico presso il Reparto di Oncoematologia Pediatrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di

Pavia, a partire dal mese di novembre 2011. L'età mediana era di 10 anni, con un range tra i 4 mesi e i 16 anni. I pazienti sono stati arruolati al momento della valutazione di preparazione al TCSE e seguiti per un periodo variabile di 3-6 mesi, sulla base della tipologia di trapianto e dell'outcome clinico. I soggetti sono stati suddivisi in modo arbitrario in due gruppi: gruppo A, formato da coloro che hanno assunto il probiotico nel periodo di follow-up post-TCSE; gruppo B (gruppo controllo), comprendente coloro che non hanno assunto probiotico nel periodo post-TCSE.

I pazienti del gruppo A hanno ricevuto, tra il primo ed il secondo mese post-TCSE, due diverse formulazioni di probiotico, in base alla compliance e alle condizioni cliniche:

1. Fiorilac PS: integratore alimentare in gocce, contenente *Lactobacillus paracasei* I 1688, *Lactobacillus salivarius* I 1794. Assunzione di 5 gocce al giorno se peso corporeo inferiore ai 10 Kg, 10 gocce al giorno se superiore, disciolte in acqua o latte.
2. Prevesil 10: integratore alimentare in formulazione granulare, contenente *Bifidobacterium bifidum* W23, *Bifidobacterium lactis* W52, *Lactococcus lactis* W58 (1:1:1). Assunzione di una bustina al giorno disciolta in acqua o latte.

Sono stati raccolti campioni di feci ai seguenti tempi: basale pre-TCSE, basale post-TCSE pre-assunzione di probiotico ed in seguito a 20, 50 e 80 giorni dall'assunzione di probiotico. Nei pazienti arruolati nel gruppo di controllo, i campioni sono stati raccolti mensilmente dopo TCSE. Agli stessi tempi, in occasione dei normali controlli di routine, sono stati ottenuti campioni di sangue periferico per lo studio della ricostituzione immunologica post-TCSE. Ad oggi, è stato completato il follow-up di 10 pazienti, 6 appartenenti al gruppo A e 4 appartenenti al gruppo B.

Risultati

Analisi della flora batterica intestinale

L'analisi della flora batterica intestinale è stata condotta tramite la tecnica DGGE che fornisce un semplice approccio per ottenere profili di comunità microbiche complesse. Prendiamo in considerazione 3 soggetti appartenenti al gruppo A:

- Il caso del paziente 1, affetto da LAL, è risultato particolarmente esemplificativo, mostrando al tempo pre-TCSE, T^{ptcse} , un totale sovvertimento del microbiota rispetto al profilo normale, con comparsa del genere *Enterococcus*. Nel post-TCSE pre-probiotico, T^0 , tale reperto viene confermato a fronte di una crescente povertà della flora microbica intestinale. La somministrazione del probiotico, nella fattispecie una miscela di *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus salivarius*, modifica sostanzialmente il quadro. Al T^{+20} e ancor più al T^{+50} , il tracciato si rivela estremamente eterogeneo, indice di un progressivo ritorno alla normale colonizzazione del tratto gastrointestinale confermato dalla scomparsa dell'*Enterococcus*.
- Il paziente 2, affetto da un'emopatia non maligna, presenta un T^{ptcse} con alterazione della flora fecale meno drammatica. Nel post-TCSE si assiste però ad un'improvvisa rottura dell'equilibrio, con importante incremento dell'*Enterococcus*, che rimane il genere prevalente anche dopo 20 giorni dall'assunzione del medesimo probiotico. Solo a partire dal T^{+50} si osserva l'evoluzione del microbiota verso la normalità.
- Il paziente 3 mostra al T^{ptcse} un profilo eterogeneo che viene prontamente meno dopo il trapianto. In seguito alla somministrazione del probiotico, in questo caso contenente soprattutto Bifidi, la flora batterica si arricchisce, seppur è degna di nota la comparsa dell'*Enterococcus*, che avviene in questo caso più tardivamente rispetto ai due soggetti precedentemente presi in considerazione.

La Real-Time PCR ha consentito di tipizzare la natura di alcune bande particolarmente in evidenza sui tracciati DGGE e di ricercare nelle feci i batteri somministrati come probiotico (Tabella 1). Nel caso dei pazienti del gruppo controllo, dopo il sovvertimento della flora batterica contestuale al TCSE, più lento è il ripristino del normale microbiota.

Valutazione della ricostituzione immunologica post-TCSE

Popolazioni NK ed attività NK in vitro

Lo studio delle sottopopolazioni NK al T⁰ ha mostrato per molti pazienti bassi livelli di cellule NK CD16+/CD56+. A distanza dall'assunzione del probiotico, nel gruppo A non si è osservato un significativo incremento delle popolazioni NK, se non nel paziente 3. Analoghi risultati si sono osservati nei pazienti di controllo. Tuttavia, mentre nei primi, in seguito all'assunzione di probiotico si è assistito ad un incremento della funzionalità NK, al contrario nei pazienti appartenenti al gruppo B l'attività NK è calata o rimasta invariata (Figura 2).

Popolazioni T-cellulari e risposta ad attivatori policlonali e ad antigeni in vitro

È stata valutata la distribuzione delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ e CD4+ e la loro funzionalità. Nel periodo di ricostituzione post-TCSE, la gran parte dei pazienti mostrava una prevalenza di linfociti T CD3+ CD8+, con un numero basso di linfociti T helper CD4+. Dall'inizio dell'assunzione del probiotico, i pazienti del gruppo A hanno mostrato un incremento di entrambe le popolazioni. Analoghi risultati sono stati osservati nei pazienti appartenenti al gruppo B, seppure la variazione in questo caso sia stata meno marcata. Tale incremento numerico non ha portato però ad un significativo aumento della loro capacità di produrre citochine in risposta ad uno stimolo aspecifico. Tuttavia, è noto che in caso di sviluppo di infezioni, in particolare virali, nei primi 30-60 giorni dopo TCSE, alcuni pazienti sono in grado di montare una risposta T protettiva e, analogamente, alcuni sviluppano una risposta alloreattiva che porta poi allo sviluppo di GvHD.

È stato suggerito che i probiotici potrebbero avere un'azione inibente le risposte. Sebbene nei pazienti studiati non sia stato possibile valutare questo aspetto a causa della scarsità del recupero cellulare pre-TCSE, insufficiente per l'allestimento di colture miste linfocitarie, per stabilire se l'assunzione del probiotico possa interferire con le risposte T-specifiche verso patogeni rilevanti, quali l'Adenovirus, è stata valutata la frequenza di cellule virus-specifiche in un saggio ELISPOT. L'andamento della risposta, bassa o assente nell'immediato periodo post-TCSE, si è dimostrato variabile: talora, in concomitanza con una riattivazione virale asintomatica, si è osservato un incremento della frequenza di cellule specifiche, non influenzato negativamente dall'assunzione del probiotico (Figura 3).

Popolazioni B-cellulari

È stata valutata la distribuzione delle sottopopolazioni di linfociti B circolanti CD19+ ai vari tempi dall'assunzione del probiotico. In due pazienti, afferenti rispettivamente al gruppo A e al gruppo B, che avevano sviluppato una infezione precoce da virus di Epstein-Barr dopo TCSE, trattata con anticorpo monoclonale anti-linfociti B Rituximab, il livello delle cellule B CD19+ si è mantenuto assente per il periodo di osservazione. Negli altri pazienti si è assistito ad un loro fisiologico incremento numerico, senza differenze di rilievo nei due gruppi. La funzionalità B, espressa come capacità secernente Ig in vitro dopo stimolo, non è stata valutata, in quanto la sua mediana di ricostituzione dopo TCSE è di oltre 12 mesi, superiore al tempo di follow-up dei nostri pazienti (4-5 mesi).

Impatto dell'assunzione di probiotici sull'andamento clinico dei pazienti arruolati

Sono stati raccolti dati clinici relativi al follow-up post-TCSE dei pazienti arruolati nello studio. Nessuno dei pazienti afferenti al gruppo A ha sviluppato sepsi o altre complicanze riferibili a germi traslocati dal tratto intestinale dopo assunzione di probiotico. Tre dei sei pazienti non hanno sviluppato GvHD acuta nel periodo post-TCSE. Un paziente, con GvHD intestinale di grado I, associata a viremia da CMV, ha risolto la sintomatologia clinica dopo assunzione di probiotico. Un quinto paziente ha mostrato una riattivazione dell'infezione da CMV in concomitanza con assunzione di probiotico, risoltasi dopo trattamento con farmaci antivirali. A distanza di circa 2 mesi ha sviluppato una late acute GvHD epatica, trattata con successo con sedute di fotochemioterapia (FEC). Infine, un paziente con GvHD acuta intestinale di grado IV, non responsiva al trattamento con farmaci immunosoppressori, steroidi, FEC, cellule staminali mesenchimali, e complicata da sovrapposizione di colite da Adenovirus, ha risolto il grave quadro clinico dopo terapia con anticorpo monoclonale anti-TNF Infliximab, seguito da somministrazione di probiotici e latteferrina. Nei pazienti afferenti al gruppo B sono state registrate una riattivazione da CMV, una da EBV e lo sviluppo di GvHD acuta in 2 pazienti, rispettivamente intestinale di grado II, ed epatica di grado II.

Discussione e conclusioni

Non esistono dati in letteratura sull'impiego dei probiotici nei riceventi pediatrici di TCSE e non è stata riportata una precisa analisi della flora fecale nel periodo peritrapiantologico. I nostri dati preliminari mostrano un pattern di colonizzazione profondamente alterato dopo TCSE. Il confronto dei profili DGGE su campioni prelevati immediatamente prima dell'assunzione di probiotici, mette in evidenza la prevalenza dell'*Enterococcus faecium*, con decremento numerico degli anaerobi obbligati, evento che favorirebbe complicanze settiche, come dimostrato in pazienti in terapia intensiva [3]. In seguito alla somministrazione di probiotico, si osserva un lento ripristino della normale eterogeneità del microbiota, seppur il riscontro del microrganismo nelle feci non sia garanzia di colonizzazione dello stesso a livello della mucosa intestinale. L'assunzione di probiotici potrebbe avere inoltre, in riceventi un TCSE per patologia oncoematologica, il vantaggio di favorire la sorveglianza antitumorale attraverso il potenziamento dell'immunità innata [4]. Nella nostra casistica, sebbene non si sia osservato un incremento numerico delle cellule NK, in seguito all'assunzione di probiotico si è assistito ad un aumento dell'attività NK, ad indicare un beneficio sull'attivazione cellulare, che potrebbe rivelarsi di supporto all'effetto antitumorale mediato dalle popolazioni di linfociti NK alloreattivi emergenti dopo TCSE T-depletato da donatore aploidentico.

Per quanto riguarda l'effetto dei probiotici su altre componenti del sistema immunitario nel paziente trapiantato, non si è osservata alcuna differenza significativa su composizione ed attività dei linfociti T. I dati della letteratura, ottenuti in modelli animali di GvHD, indicano un possibile effetto soppressivo dell'attività T, in particolare della risposta all'LPS, indotto dai probiotici [5]. Data la rilevanza della GvHD quale complicanza del TCSE, questo aspetto verrà analizzato mediante allestimento di colture miste linfocitarie e valutazione delle loro caratteristiche ed attività. Abbiamo per ora voluto analizzare l'impatto del trattamento con probiotici sulle risposte T virus-specifiche, focalizzandoci sulla risposta immune all'Adenovirus. I risultati dimostrano come l'assunzione di probiotici non inibisca lo sviluppo precoce di linfociti dotati di attività IFN γ -secernente, sebbene l'incremento di cellule specifiche non si sia osservato in tutti i pazienti.

La letteratura suggerisce che la somministrazione di *Lactobacillus casei* possa stimolare la maturazione dei linfociti B in plasmacellule IgA secernenti [6]. Nei pazienti sottoposti a TCSE, la ricostituzione del numero, ma, soprattutto, dell'attività, delle popolazioni B avviene piuttosto tardivamente, con una mediana oltre l'anno dal TCSE, il che non ne ha reso possibile la valutazione. Trattandosi di uno studio preliminare, con un follow-up della durata di quattro mesi, non è stato ritenuto utile valutare ad oggi questo aspetto, riservandosi di compiere l'analisi ad un anno.

In ambito di Terapia Intensiva Neonatale, è stato dimostrato come l'impiego di probiotici prevenga complicanze fatali, quali l'enterocolite necrotizzante o le sepsi [7]. Tuttavia, l'utilizzo di probiotici nei pazienti trapiantati è dibattuto anche alla luce di studi che hanno mostrato, in soggetti immunocompromessi, la possibilità di traslocazione batterica dalla mucosa intestinale ad altri organi, quali miocardio, linfonodi, milza, fegato, evento che, attraverso una fase batteriemica, può partecipare al determinismo di una insufficienza multiorgano. Malgrado queste osservazioni, lo studio di Salminen et al [8], effettuato su un gruppo di 89 pazienti i quali ricevevano probiotico, nella fattispecie *Lactobacillus*, ha dimostrato come l'exitus in coloro che sviluppavano una sepsi, fosse nell'82% dei casi da correlare ad un più complesso quadro clinico, nell'ambito di patologie in fase avanzata o scompensate. I dati preliminari della nostra casistica non ci permettono di trarre conclusioni su questo aspetto. Tuttavia, va sottolineato come nessun paziente abbia sviluppato infezioni batteriche nel periodo di follow-up.

Per quanto concerne lo sviluppo di GvHD, un paziente del gruppo A, che aveva assunto probiotici in presenza di una GvHD di grado lieve, ha risolto il quadro dopo assunzione di probiotico, in assenza di altri interventi terapeutici. Sulla scorta di questa esperienza preliminare, abbiamo trattato con probiotico e lattoferrina un paziente con GvHD acuta gastrointestinale di grado IV non responsiva a diverse linee di trattamento, condizione gravata da una prognosi generalmente infausta. Si è potuto osservare un progressivo miglioramento delle condizioni cliniche e la biopsia eseguita a quattro mesi dal trattamento mostra un quadro di grado II, con risoluzione delle lesioni infiammatorie. Sebbene non si possa attribuire al solo trattamento con probiotici questo importante risultato clinico, va tuttavia evidenziato come, in questo paziente con importanti lesioni gastrointestinali, la somministrazione del probiotico non abbia portato allo sviluppo di infezione batterica sistemica.

Tabelle e figure

Tabella 1. Tipizzazione, tramite Real-Time PCR, di bande in evidenza sul tracciato DGGE.

		<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Bifidobatteri</i>	<i>Enterococchi</i>
Pz 1	$T^{pretcse}$	<8E+3	4,23E+06	7,68E+10
	T^0	<8E+3	1,06E+07	2,81E+10
	T^{+20}	1,20E+06	1,25E+07	2,93E+07
	T^{+50}	3,20E+06	1,60E+07	2,40E+006
Pz 2	$T^{pretcse}$	< 8E+3	3,72E+06	2,13E+08
	T^0	< 8E+3	3,75E+06	2,19E+10
	T^{+20}	1,86E+07	1,46E+07	3,86E+10
	T^{+50}	4,27E+06	2,11E+07	1,84E+08
	T^{+80}	7,05E+06	2,01E+06	1,39E+05
Pz 3	$T^{pretcse}$	<8E+3	4.18E+06	4.74E+08
	T^0	1.60E+06	1.59E+06	1.08E+07
	T^{+20}	1.22E+06	2.51E+07	6.78E+09
	T^{+50}	<8E+3	1.96E+10	2.75E+09
	T^{+80}	<8E+3	1.74E+10	2.53E+09

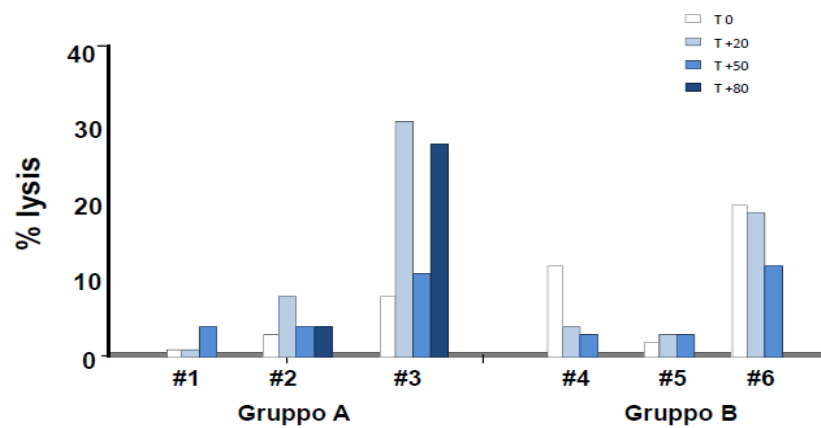


Figura 2. Attività NK in alcuni pazienti rappresentativi della casistica analizzata, ai vari tempi.

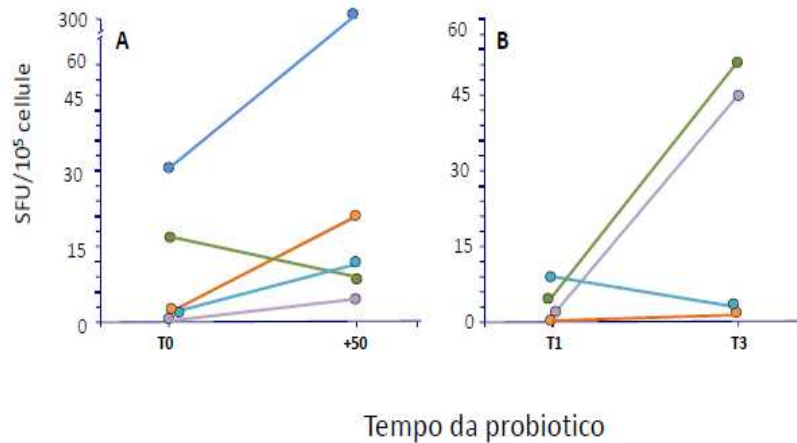


Figura 3. Variazioni della risposta all'adenovirus nei pazienti appartenenti alla casistica analizzata durante il periodo di follow-up.

Bibliografia

1. Ringel-Kulka T. Targeting the Intestinal Microbiota in the Pediatric Population: A Clinical Perspective. *Nutr Clin Pract* 2012; 27:226-223.
2. Nelson Textbook of Pediatrics, *Saunders Elsevier*, Philadelphia, USA, 2007.
3. Shimizu K, Ogura H. Altered gut flora are associated with septic complications and death in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Dig Dis Sci* 2011;56:1171-1177.
4. Aso Y, Akaza H, Kotake T et al. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. *Eur Urol* 1995;27:104-109.
5. Gerbitz A, Schultz M, Wilke A et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood* 2004;103:4365-4367.
6. Maldonato CG, Perdigòn G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(2):219-226.
7. AlFaleh KM, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011;3:CD05496.
8. Liang M. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutrition Rev* 2008;66:192-202.