

# Revisione trials clinici pediatrici sulla prevenzione delle allergie

**Gian Vincenzo Zuccotti**

Clinica Pediatrica  
Università di Milano  
AO Luigi Sacco

Torino, 27 ottobre 2007

# Le allergie

Il 20% della popolazione nei paesi industrializzati è allergica

Negli Stati Uniti circa 15 milioni di soggetti soffrono di asma e questa patologia è responsabile annualmente di circa 2 milioni di accessi in pronto soccorso, 500.000 ospedalizzazioni e 5000 decessi

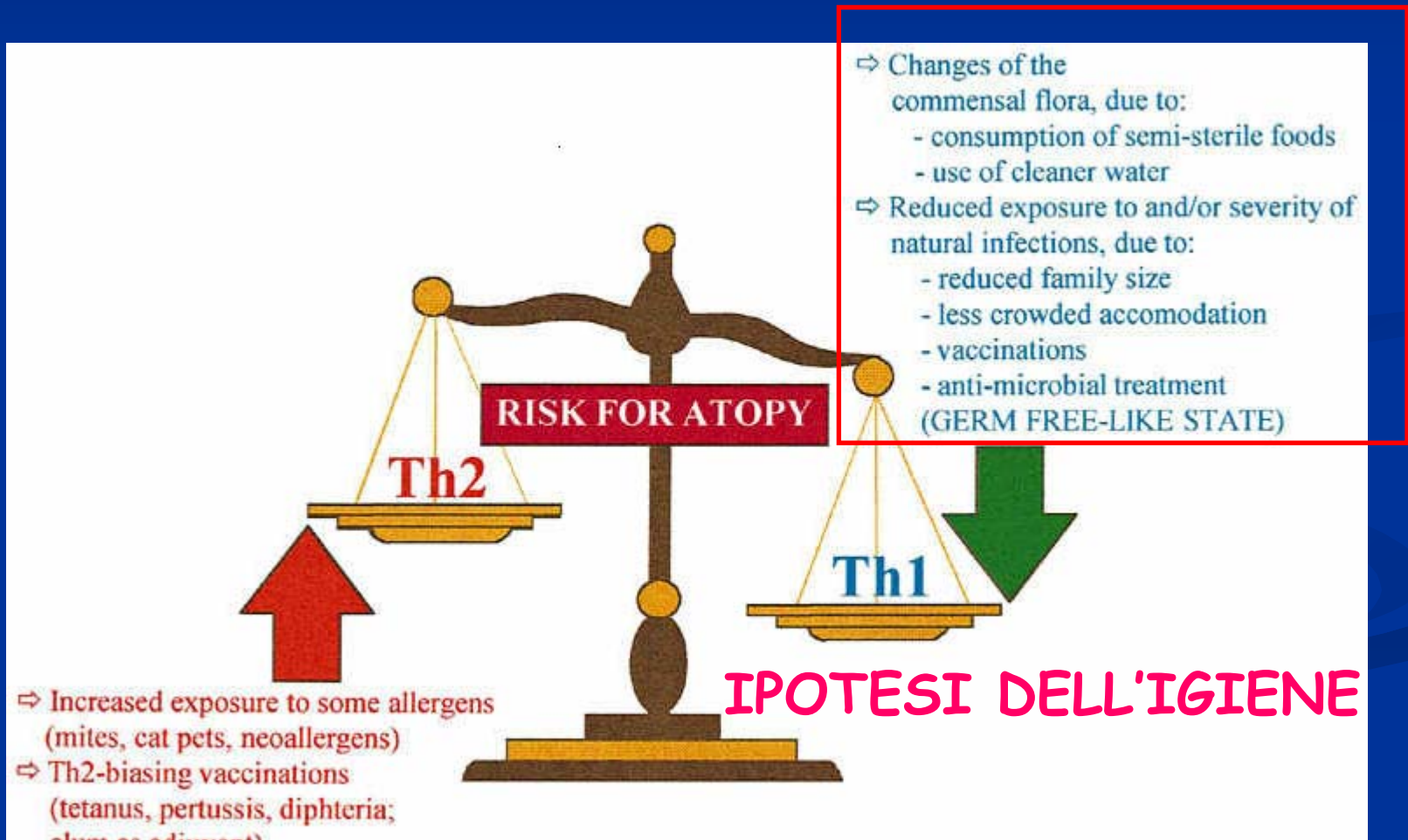
*Burke W. Am J Prev Med 2003*

La prevalenza dell'asma è aumentata del 74% dal 1980 al 1996 con un trend in continuo incremento

*Mannino D. MMWR 2002*

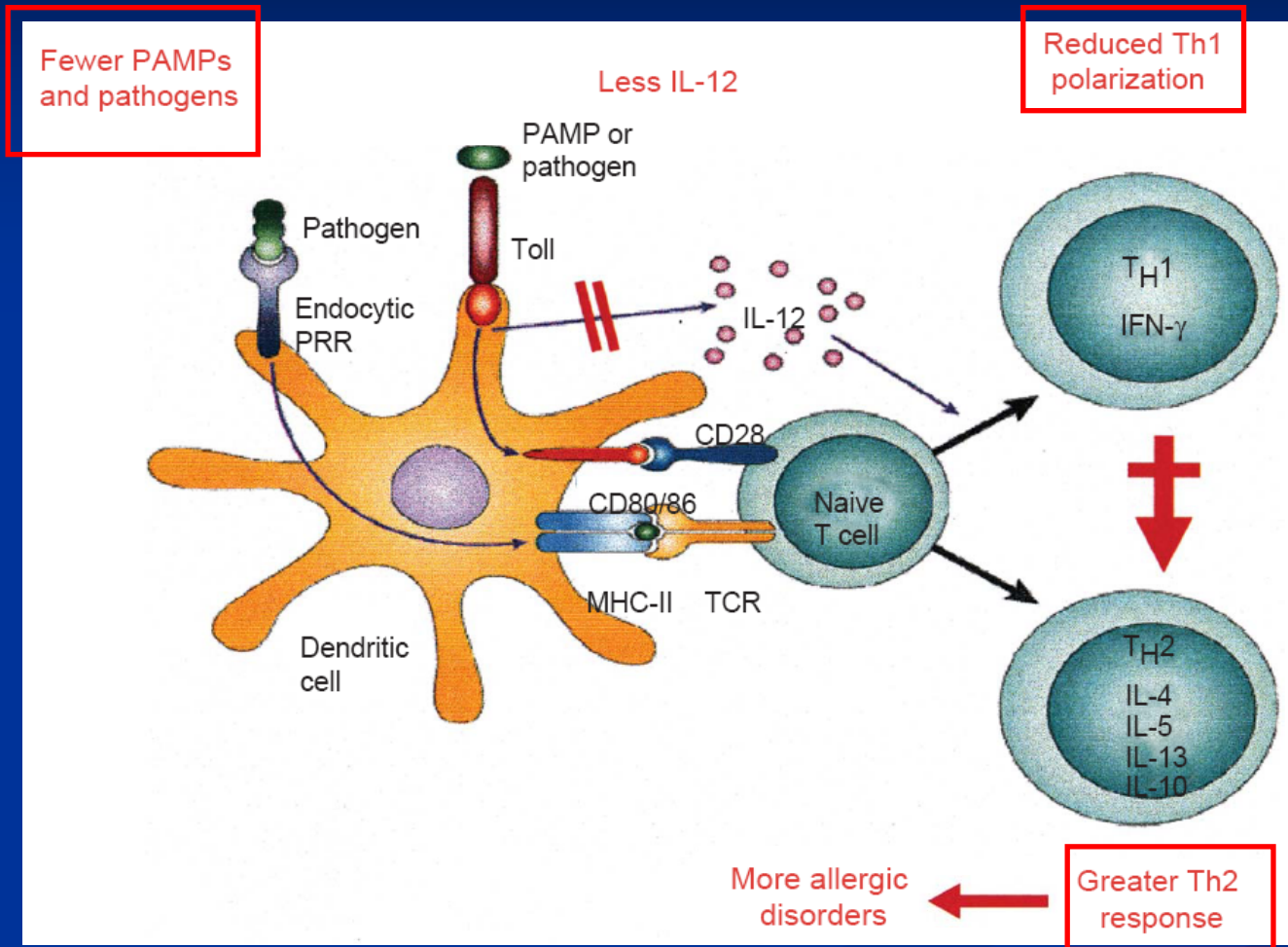
# L'AUMENTO DELL'ATOPIA...

..... potrebbe essere causato da:



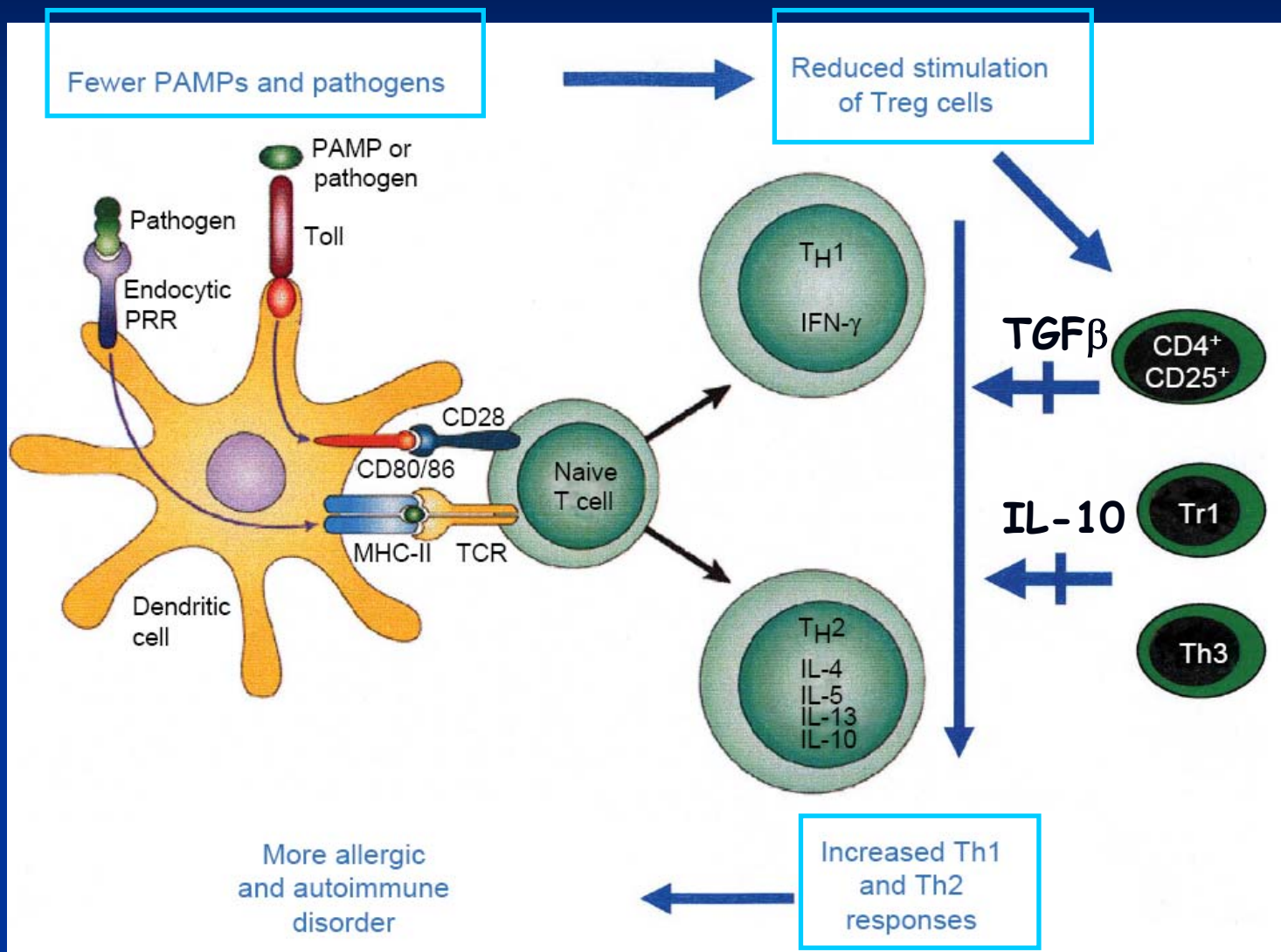
# IPOTESI DELL'IGIENE: PATOGENESI

## 1. Mancato shift Th2-Th1 (missing immune deviation)



# IPOTESI DELL'IGIENE: PATOGENESI

## 2. Ridotta attività delle T cell regolatorie (reduced immune suppression)

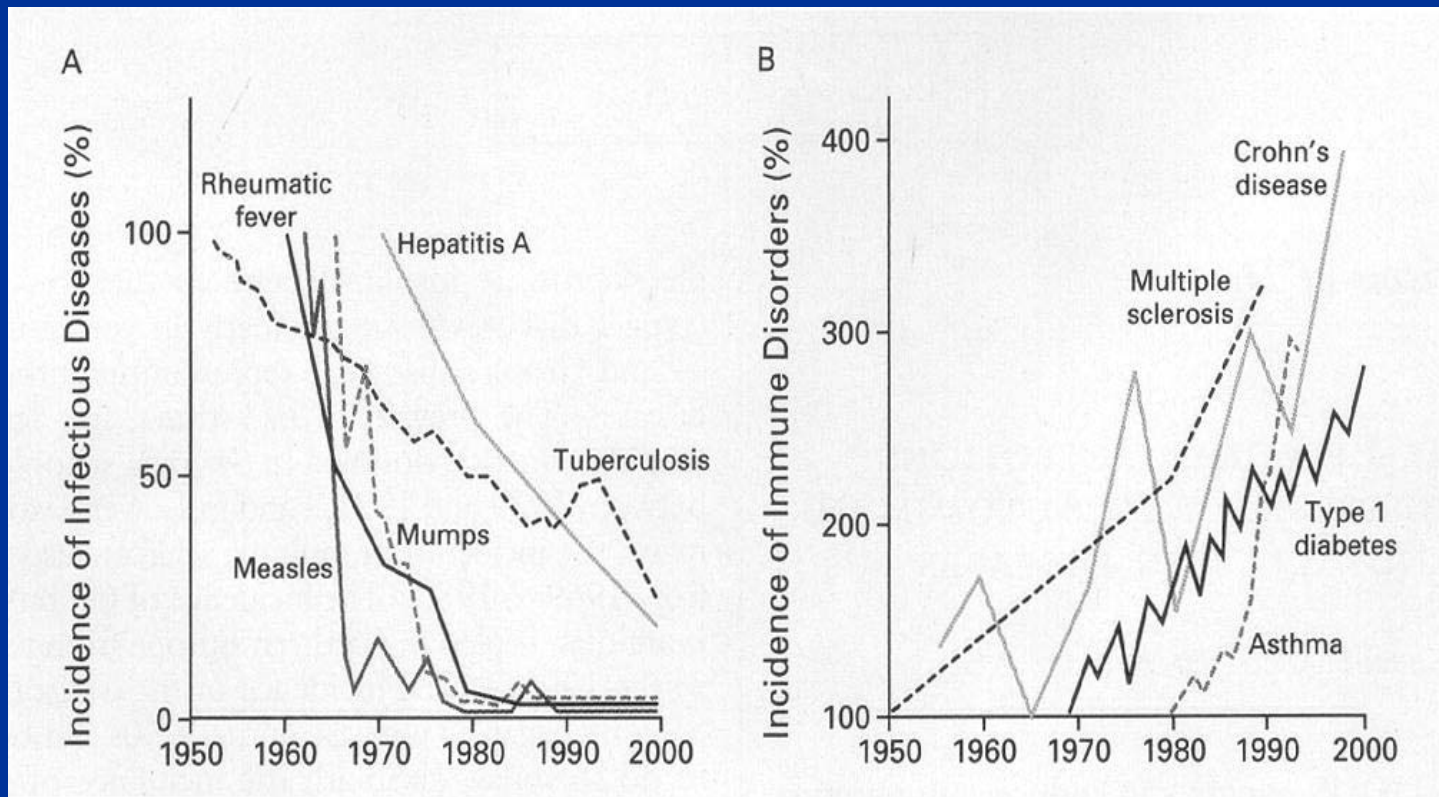




# Mechanisms of Disease: the effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases

*Bach, J-F. NEJM, 2002*

## Aumento delle malattie allergiche e autoimmuni



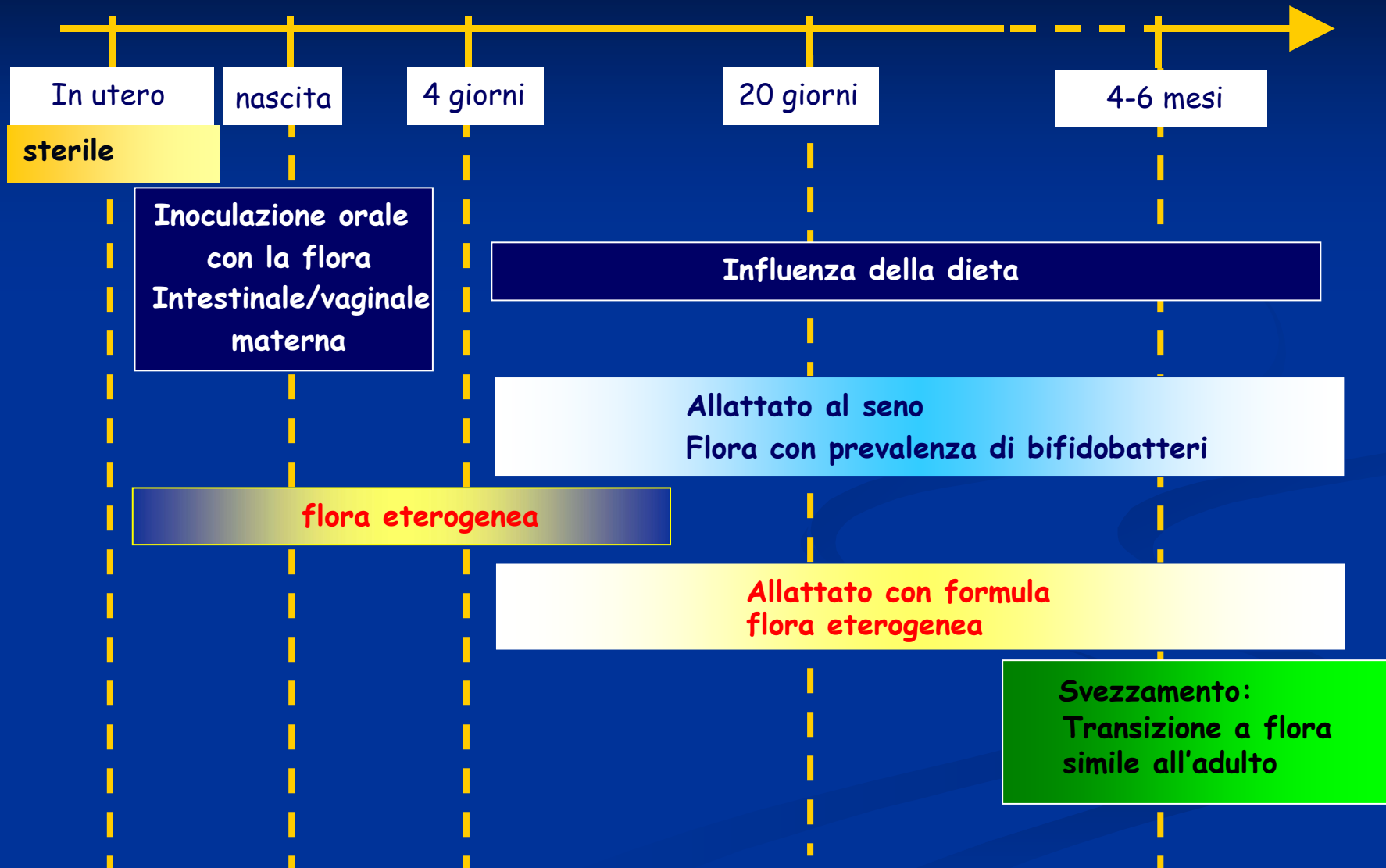
# L'AUMENTO DELL'ATOPIA...

..... potrebbe essere causato anche da:

- alterata flora microbica che favorisce la persistenza di citochine derivanti da TH2 (IL4, IL5, IL13) prevalenti alla nascita e che non consente il riequilibrio a favore di una predominante risposta TH1 con produzione di IL12, IFN $\gamma$

Negli ultimi anni sembra sempre più convincente il ruolo della composizione dell'ambiente microbico e della flora intestinale nei primi anni di vita nella induzione della tolleranza orale

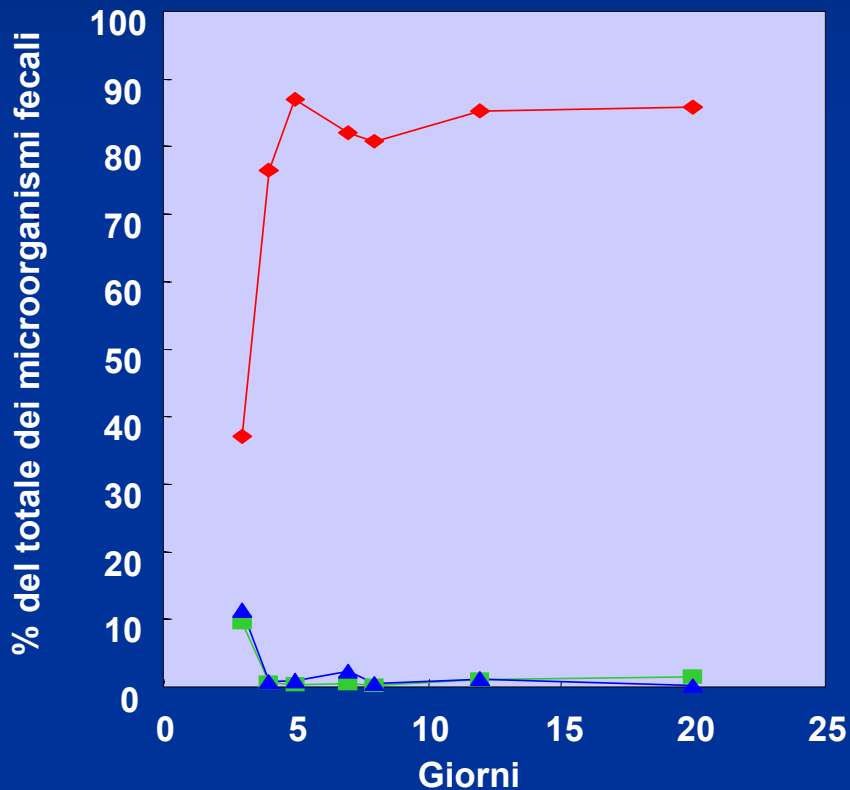
# Sviluppo della flora intestinale



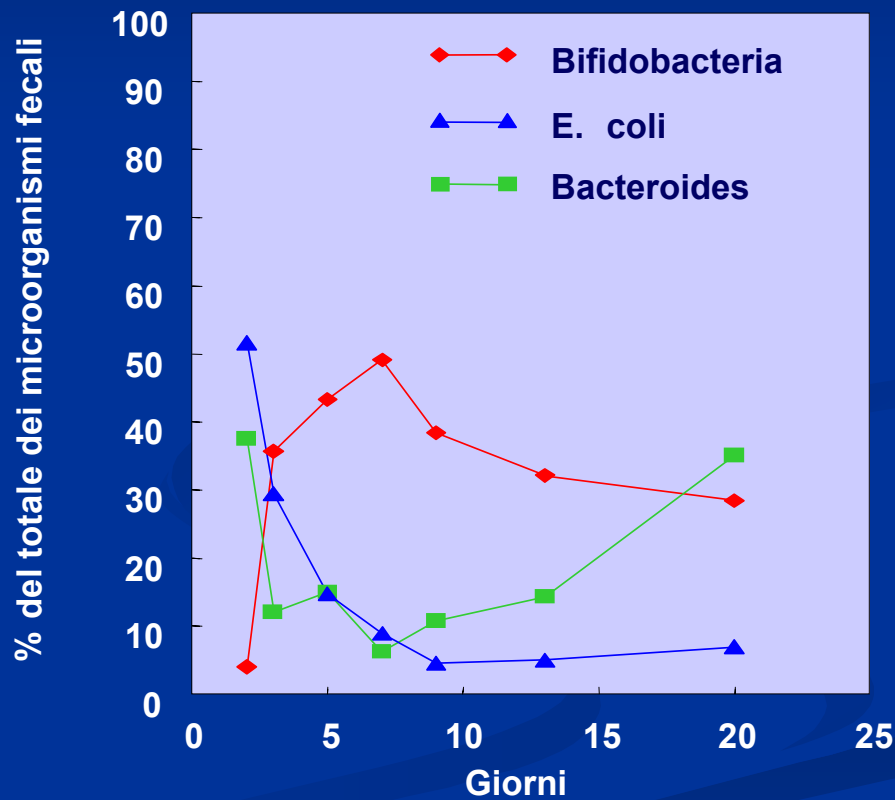


# Differente Sviluppo della flora con allattamento materno e formula

## Allattati al seno



## Allattati con formula



# PROBIOTICI E ATOPIA

Difference in the intestinal flora composition of allergic and non allergic infants:

**in allergic patients there is a prevalence of Clostridia,** on the contrary bifidobacteria are prevalent in healthy subjects.

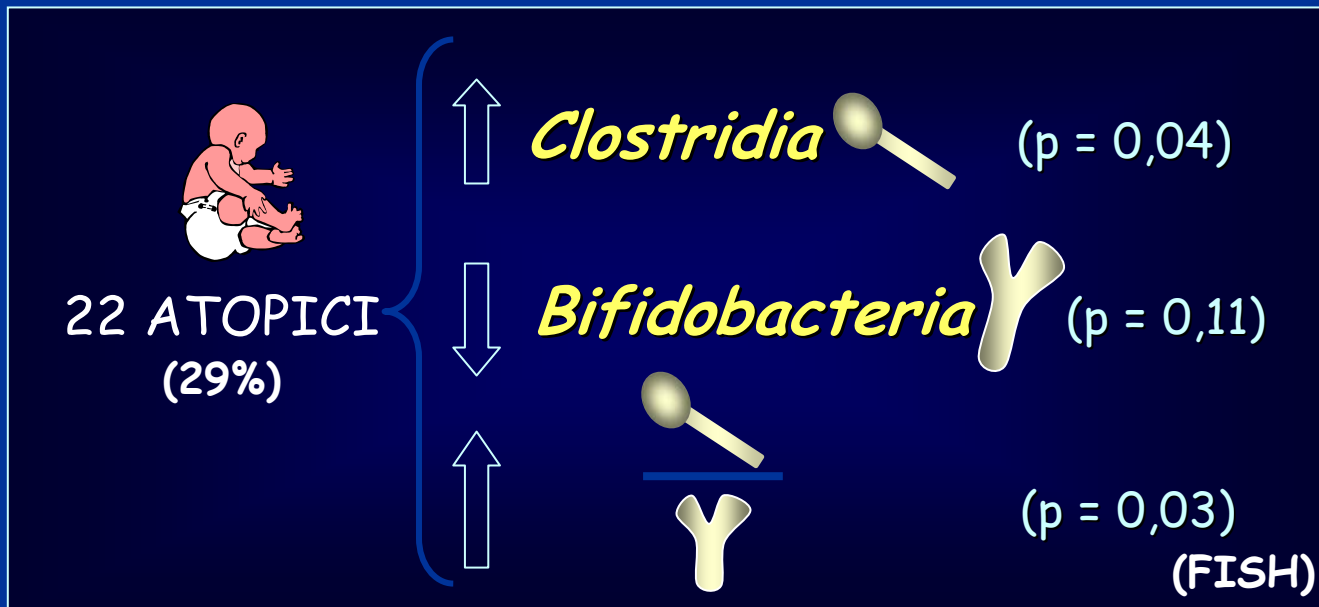
*(Sepp E, et al, Acta Paediatr. 1997)*

# Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing

M. Kalliomaki, E. Isolauri J. Allergy Clin Imm 2001

## 76 neonati ad alto rischio di atopia

**ATOPICO** = almeno 1 Prick test positivo a 12 mesi



# Sviluppo dell'immunità acquisita: TOLL-LIKE RECEPTORS (TLRs)

**PRRs** (pattern recognition receptors)

→ riconoscono pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) su microrganismi non-self

solubili: MBL, ficoline

di membrana: **TLRs**

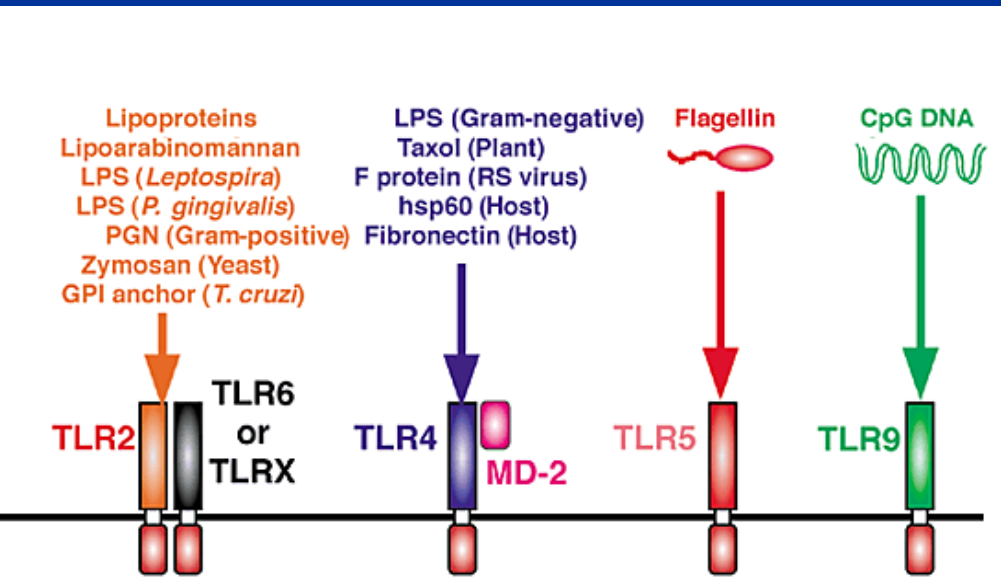
## CARATTERISTICHE

- evoluzione umana della proteina Toll della *Drosophila*

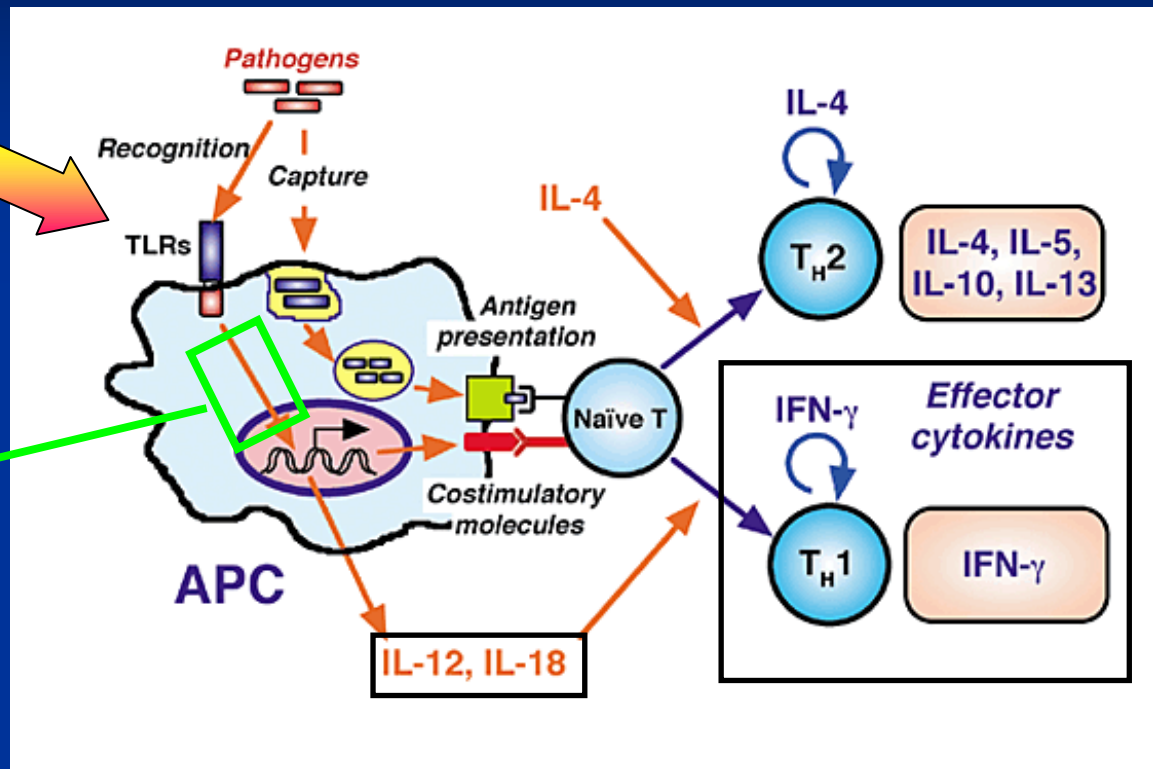
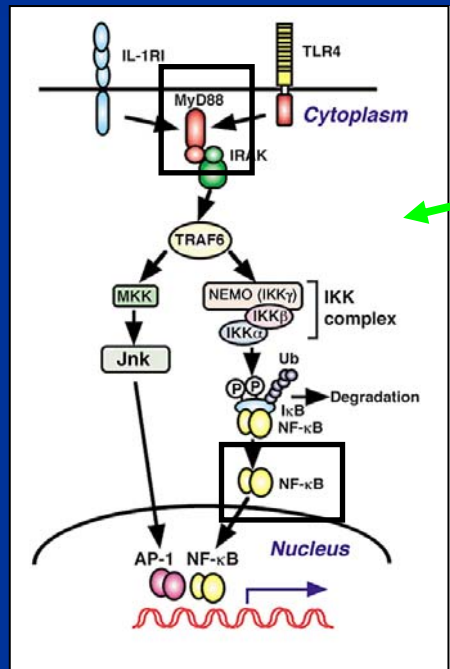
- ne esistono almeno 11 diversi tipi, ciascuno in grado di riconoscere specifici PAMPs associati a particolari classi di patogeni

- si trovano su APC, DC, monociti e, in misura minore, su cellule endoteliali vascolari, adipociti, miociti, cellule intestinali

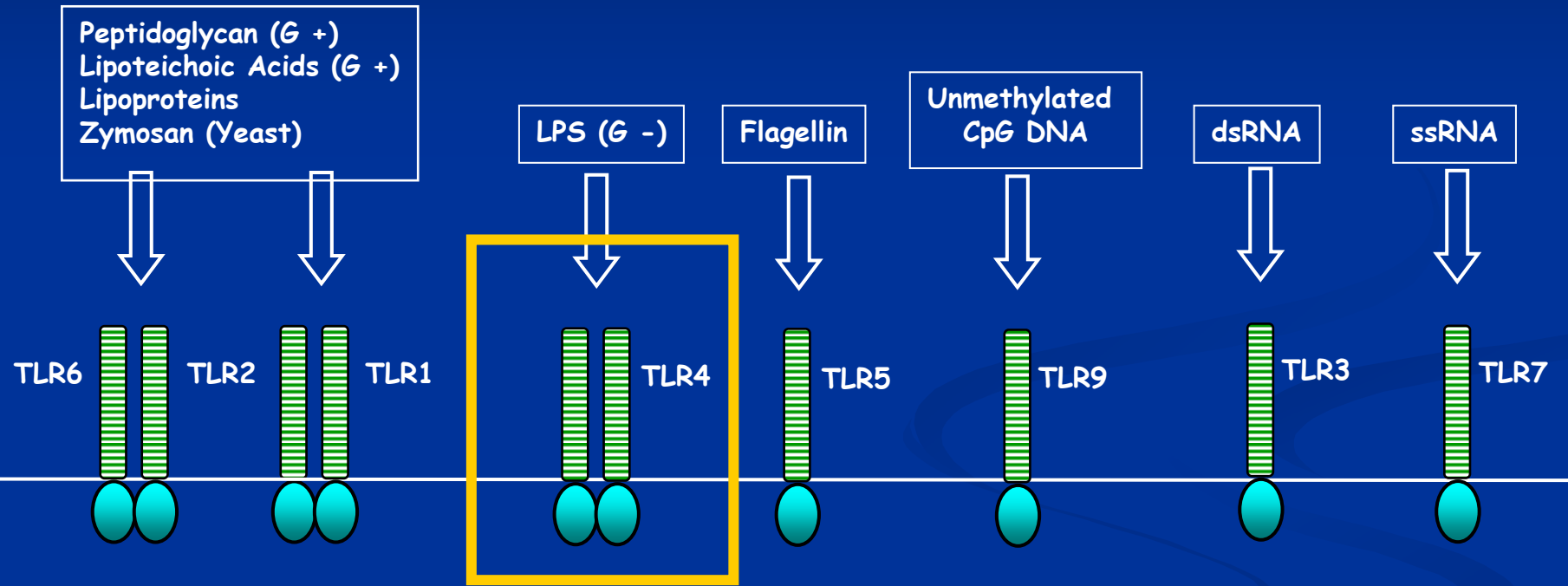
- si dividono in TLRs di membrana (1, 2, 4, 5, 6) e TLRs intracellulari (3, 7, 8, 9)



# TLRs: meccanismo d'azione



# INNATE IMMUNE RECOGNITION BY TOLL-LIKE RECEPTORS





# "Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy"

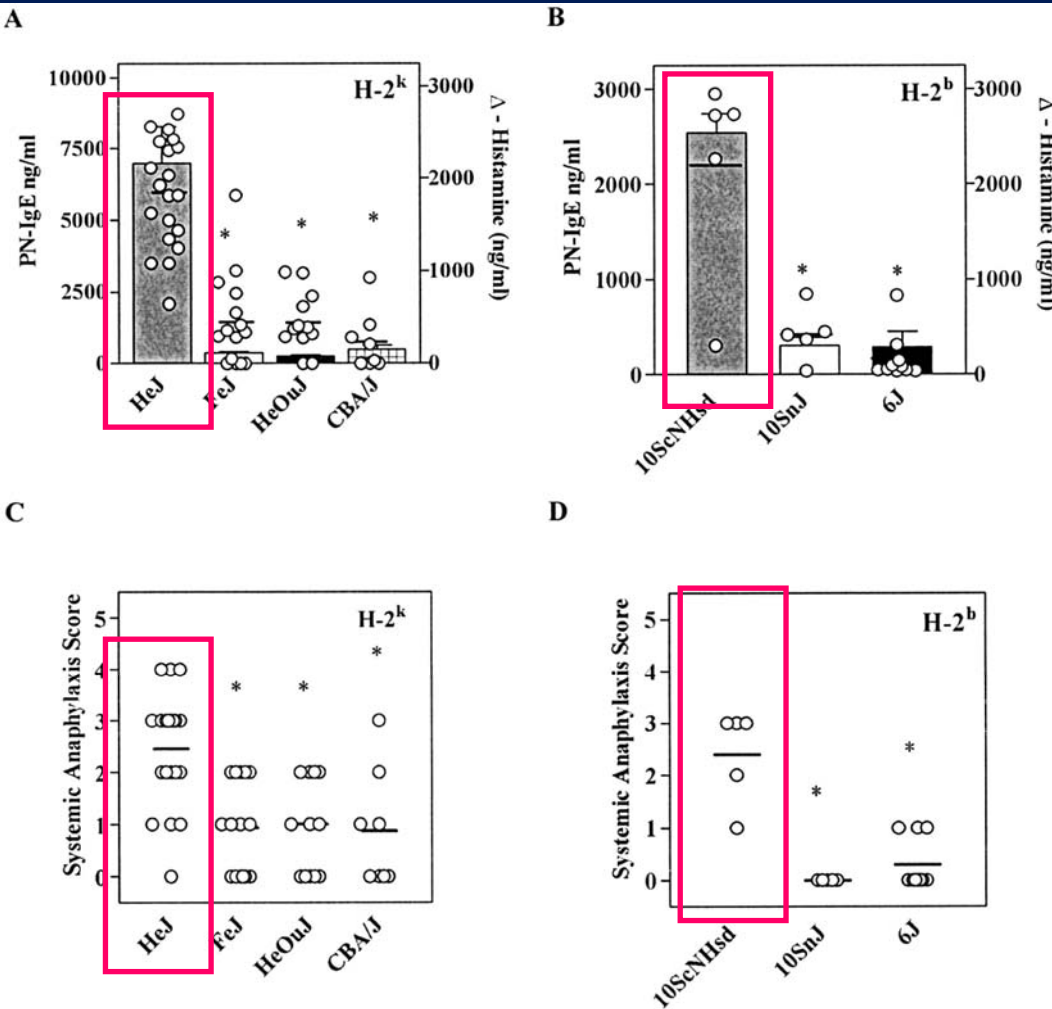
*BASHIR, J Immunol 2004*

1. Topi con mutazione di TLR4 (C3H/HeJ)  
Topi con assenza di TLR4 (C57BL/10ScNHsd)  
Topi con TLR4 wild-type (C3HeB/FeJ; C3H/HeOuj; CBA/J;  
C57BL/10SnJ; C57BL/6J)

Sensibilizzazione con 1 mg di allergene Ara h 1 (arachidi) + adiuvante CT (PN + CT) al giorno 0, 14 e 21.

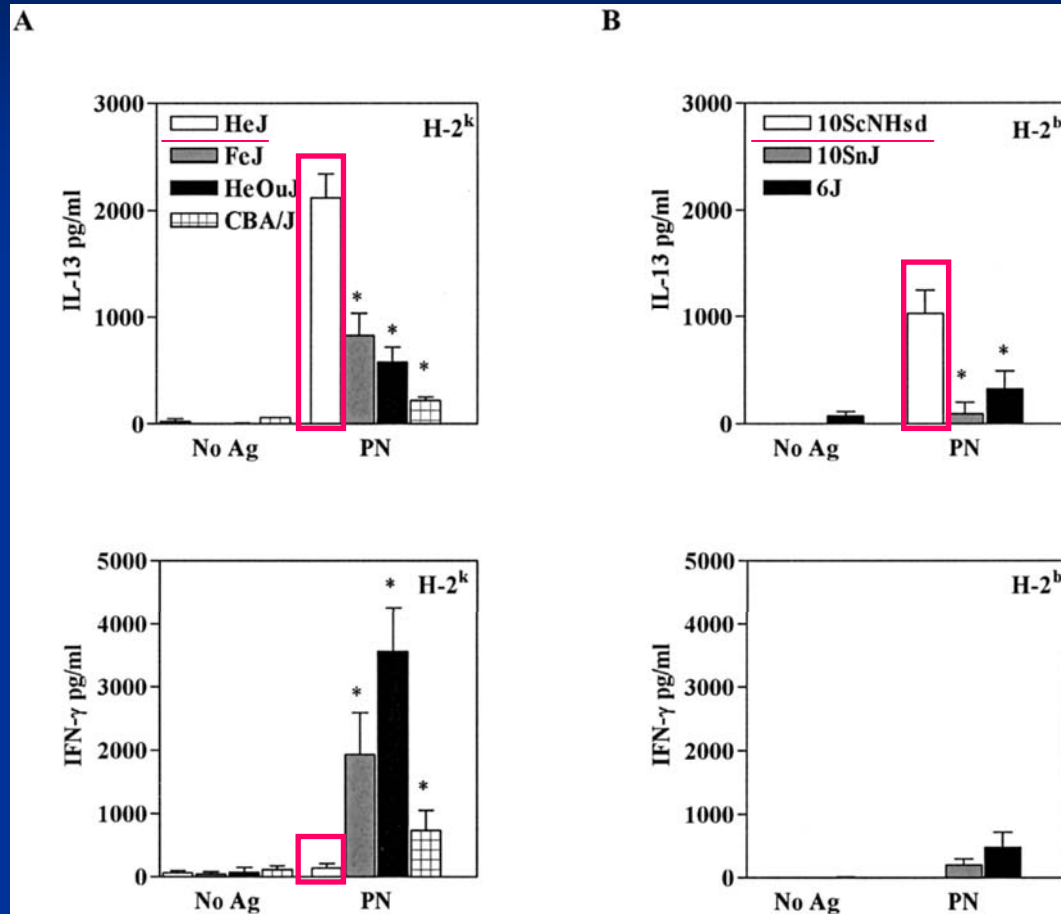
Al giorno 28 effettuato challenge con 2 dosi di Ara h 1 + CT e successivo monitoraggio per 30-40 minuti.

# RISULTATI



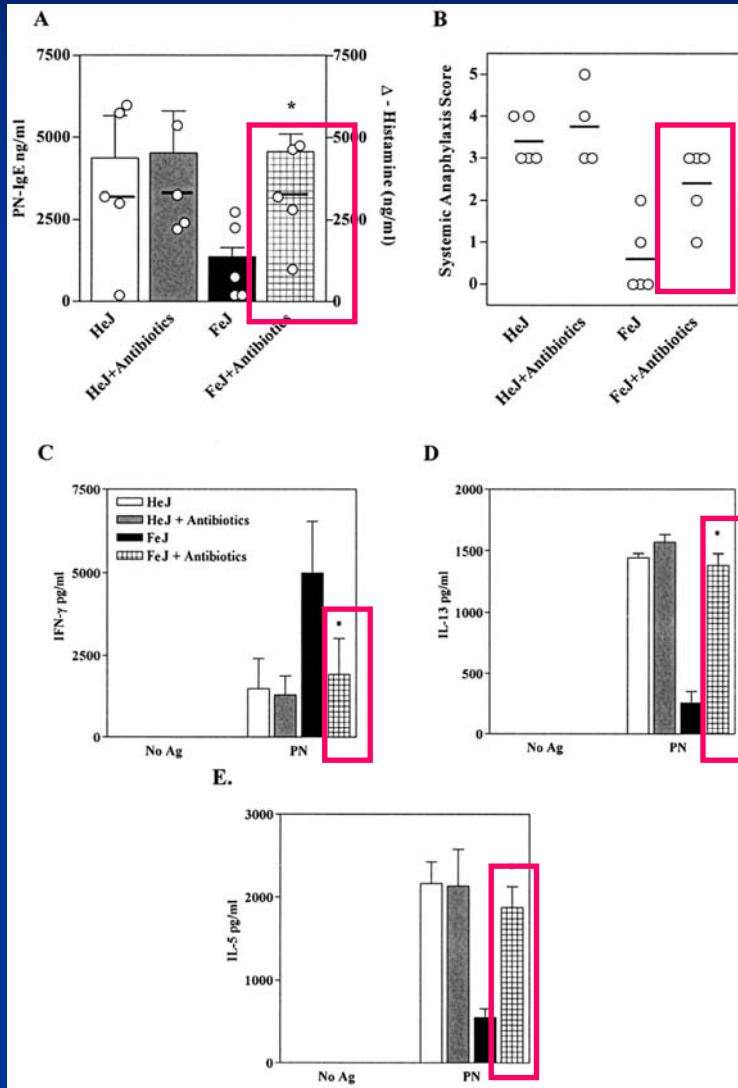
Il challenge antigenico dopo sensibilizzazione con PN + CT in presenza di TLR4 alterato o assente porta allo sviluppo di elevati livelli di **IgE specifiche** e di **istamina circolante** (•) e induce pronunciati segni clinici di **shock anafilattico**.

# RISULTATI



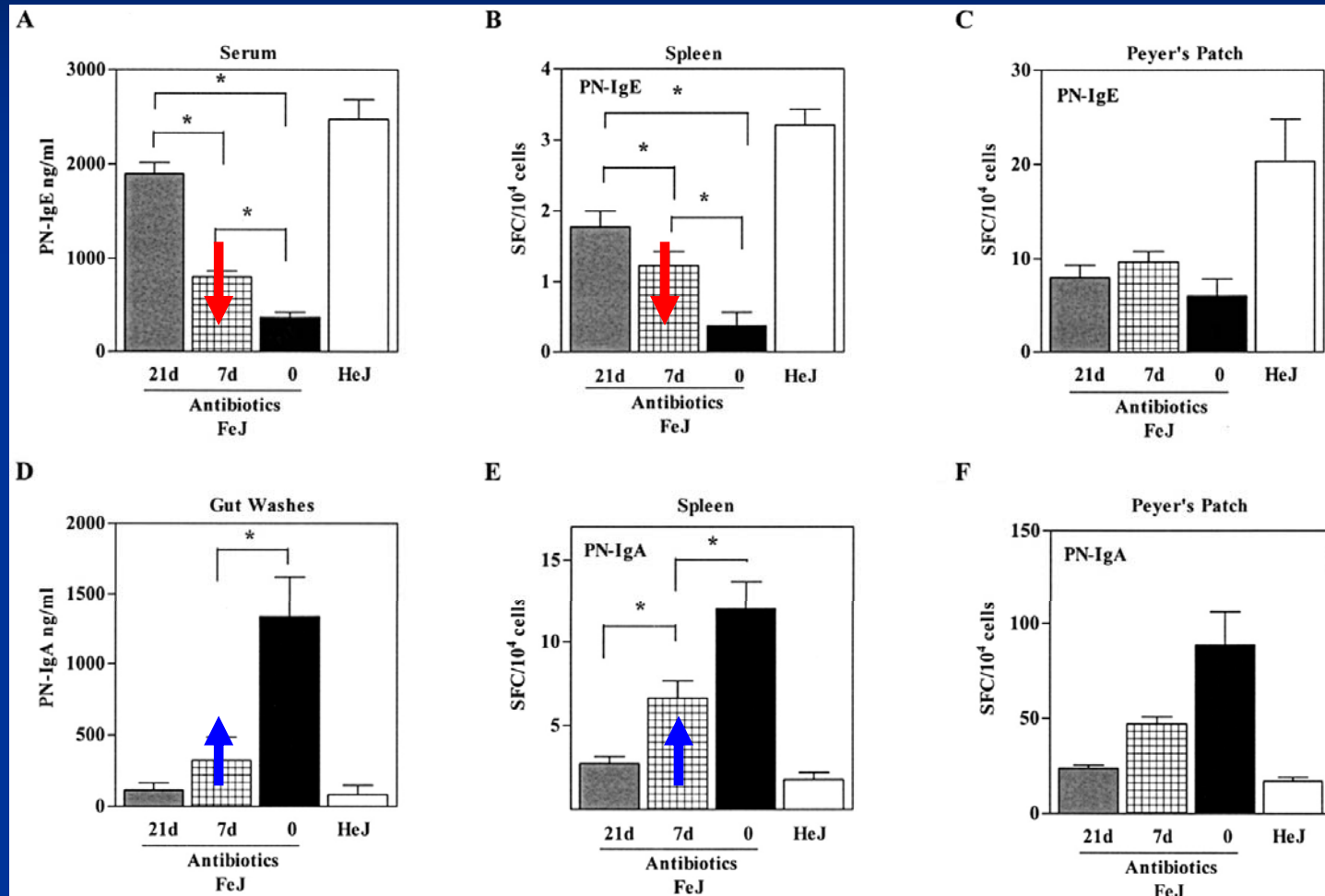
La sensibilizzazione con PN + CT in presenza di TLR4 alterato o assente porta allo sviluppo di livelli elevati di **IL-13** (Th2) e livelli bassi di **IFN $\gamma$**  (Th1), al contrario di ciò che avviene nei controlli sani.

2. Topi con mutazione di TLR4 (C3H/HeJ), NO ATB  
Topi con mutazione di TLR4 (C3H/HeJ) + ATB per 5 giorni  
Topi con TLR4 wild-type (C3HeB/FeJ), NO ATB  
Topi con TLR4 wild-type (C3HeB/FeJ) + ATB per 5 giorni



QUANDO LA COMPOSIZIONE DELLA FLORA BATTERICA E' RIDOTTA ED ALTERATA DALLA TERAPIA ANTIBIOTICA PRIMA E DURANTE LA SENSIBILIZZAZIONE ANTIGENICA, SI OTTIENE UNA RISPOSTA IMMUNOLOGICA SIMILE A QUELLA REGISTRATA IN CASO DI ALTERAZIONE RECETTORIALE (TLR4).

# ... SE RICOSTITUISCO LA FLORA BATTERICA:



# PROBIOTICI E ATOPIA

- ✓ I probiotici, riequilibrando la flora intestinale, potrebbero svolgere un ruolo chiave nella modulazione della risposta immunitaria.
- ✓ I probiotici, **in particolare i lattobacilli**, interagendo con il GALT (tessuto linfoide intestinale) ed aumentando lo shift Th2/Th1, potrebbero contribuire nella prevenzione dell'atopia



# PROBIOTICI E PREVENZIONE DELL'ATOPIA: STUDI CLINICI

“ Probiotics in primary prevention of atopic disease:  
a randomised placebo-controlled trial”

- Kalliomäki, Lancet 2001 -

- L. Rhamnosus GG,  $1 \times 10^{10}$  CFU die
- n = 132 madri con familiarità di primo grado per patologia allergica
- somministrazione alla madre 2-4 settimane prima del parto e poi per 6 mesi al neonato (NB: solo alla madre se neonato allattato al seno)
- valutazione del bambino 2 anni di vita.

- Riduzione incidenza DA a 2 anni di circa il 50%
- Non riduzione della sensibilizzazione allergica e dell'incidenza di altre patologie allergiche
- Non effetti sulla colonizzazione intestinale

# PROBIOTICI E PREVENZIONE DELL'ATOPIA: STUDI CLINICI

" Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial"

- Kalliomäki, Lancet 2003 -

- n = 132 pazienti che avevano partecipato allo studio precedente, rivalutazione a 4 anni di vita
- diagnosi di atopia basata su: visita clinica, questionario, skin-prick test, misura della concentrazione di ossido nitrico nell'aria espirata

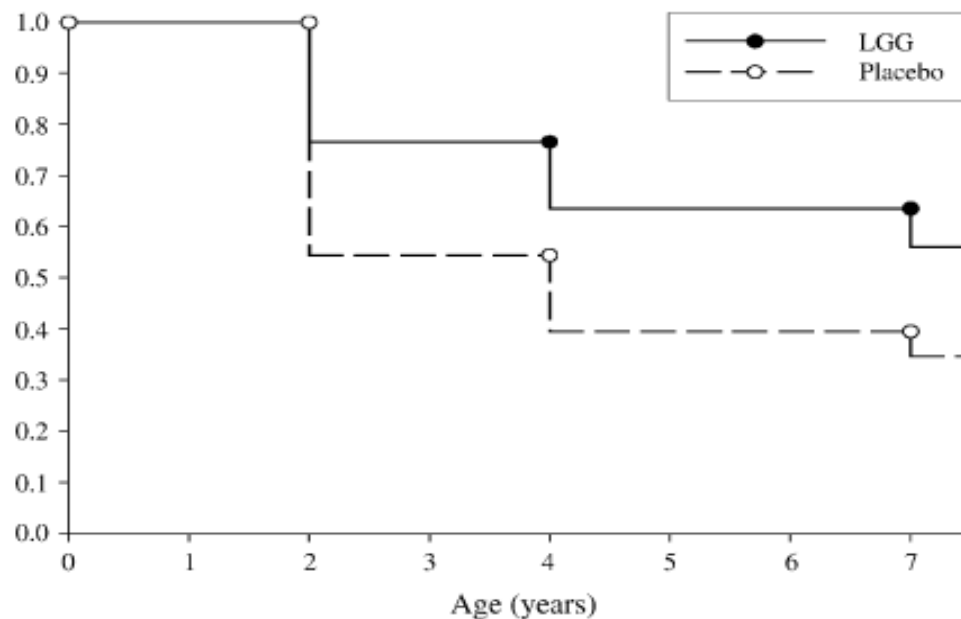
➤ L'effetto preventivo della somministrazione di L. GG sulla DA in soggetti ad alto rischio persiste a 4 anni di età.

- Non riduzione della sensibilizzazione allergica e dell'incidenza di allergia respiratoria
- Non riduzione dei livelli di IgE

# PROBIOTICI E PREVENZIONE DELL'ATOPIA: STUDI CLINICI

Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial

*Kalliomaki M J Allergy Clin Immunol 2007*



**FIG 1.** Kaplan-Meier curves for children without eczema at the ages of 2, 4, and 7 years in *Lactobacillus* GG (LGG; n = 64) and placebo (n = 68) groups; P = .008 by log-rank test.

# PROBIOTICI E PREVENZIONE DELL'ATOPIA: STUDI CLINICI

" Probiotics supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial"

-Taylor, *J Allergy Clin Immunol* 2007 -

- L. Acidophilus,  $3 \times 10^8$  CFU die
- n = 178 neonati da madri con allergia
- somministrazione **ai neonati** nei primi 6 mesi di vita
- valutazione clinica (comparsa di DA) a 6 mesi e valutazione clinica + SPT a 12 mesi

➤ Elevati livelli di colonizzazione da L. Acidophilus nel gruppo trattato, ma ...

➤ ... la supplementazione precoce con L. Acidophilus **non riduce il rischio di sviluppare DA** nei neonati ad alto rischio (25.8% nel gruppo trattato vs 22.7% nel gruppo placebo) **ed è associata ad una più elevata sensibilizzazione cutanea (P=.030) a 12 mesi.**

# PROBIOTICI E PREVENZIONE DELL'ATOPIA: STUDI CLINICI

“ Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial”

- Kukkonen, *J Allergy Clin Immunol* 2007 -

- Mix di 4 catene di probiotici: *L. Rhamnosus GG* and *LC705* ( $5 \times 10^9$  CFU  $\times$  2/die) + *B. Breve* e *Propionibacterium freudenreichii* ( $2 \times 10^9$  CFU  $\times$  2/die). Prebiotico: Galacto-olisaccaridi

- n = 1223 gravide ad alto rischio

- somministrazione del mix di probiotici alla madre 2-4 settimane prima del parto e poi somministrazione per 6 mesi al neonato dello stesso mix di probiotici + galacto-olisaccaridi

- a 2 anni valutazione clinica (comparsa di allergia alimentare, DA, asma, rinite allergica) + SPT + IgE totali

➤ Riduzione incidenza DA a 2 anni (OR, 0.66; P=.025)

➤ Effetti sulla colonizzazione intestinale (↑ lattobacilli e bifidobatteri)

➤ Non riduzione della sensibilizzazione allergica e dell'incidenza di altre patologie allergiche

# PROBIOTICI E PREVENZIONE DELL'ATOPIA: STUDI CLINICI

“ Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial”

- Abrahamsson, *J Allergy Clin Immunol* 2007 -

- *L. reuteri* ATCC 55730 ( $1 \times 10^8$  CFU die)
- n = 188 gravide ad alto rischio
- somministrazione alla madre dalla 36° SG fino al parto e poi per 12 mesi al neonato
- a 2 anni valutazione clinica (comparsa di DA) + SPT + IgE totali

➤ Non riduzione incidenza DA a 2 anni (36% vs 34% nel gruppo placebo)

➤ minore incidenza di DA IgE-associata (8% vs 20%,  $P=.02$ ) e minore sensibilizzazione in un sottogruppo di bambini con madri atopiche (SPT: 14% vs 31%,  $P= .02$ )



# A Randomized Prospective Double Blind Controlled Trial on Effects of Long-Term Consumption of Fermented Milk Containing *Lactobacillus casei* in Pre-School Children With Allergic Asthma and/or Rhinitis

MARCELLO GIOVANNINI, CARLO AGOSTONI, ENRICA RIVA, FILIPPO SALVINI, ANTONIA RUSCITTO,  
GIAN VINCENZO ZUCCOTTI, GIOVANNI RADAELLI, AND THE FELCITA STUDY GROUP

Department of Pediatrics (M.G., C.A., E.R., F.S., A.R., G.R.) and Unit of Medical Statistics (G.R.), San Paolo Hospital, University of Milan, Via A di Rudini 8, I-20142 Milan, Italy; Department of Pediatrics (G.V.Z.), L. Sacco Hospital, University of Milan, Via GB Grassi 74, I-20157 Milan, Italy

n children with rhinitis, the annual number of rhinitis episodes was lower in the intervention group, mean difference (95% CI), 1.6 (3.15 to 0.05)

# Pub Med 1978 - 2007

Studi clinici  
1978 - marzo 2007

1978 - 1988 → 3

1989 - 1998 → 232

1999 - 2007 → 3787

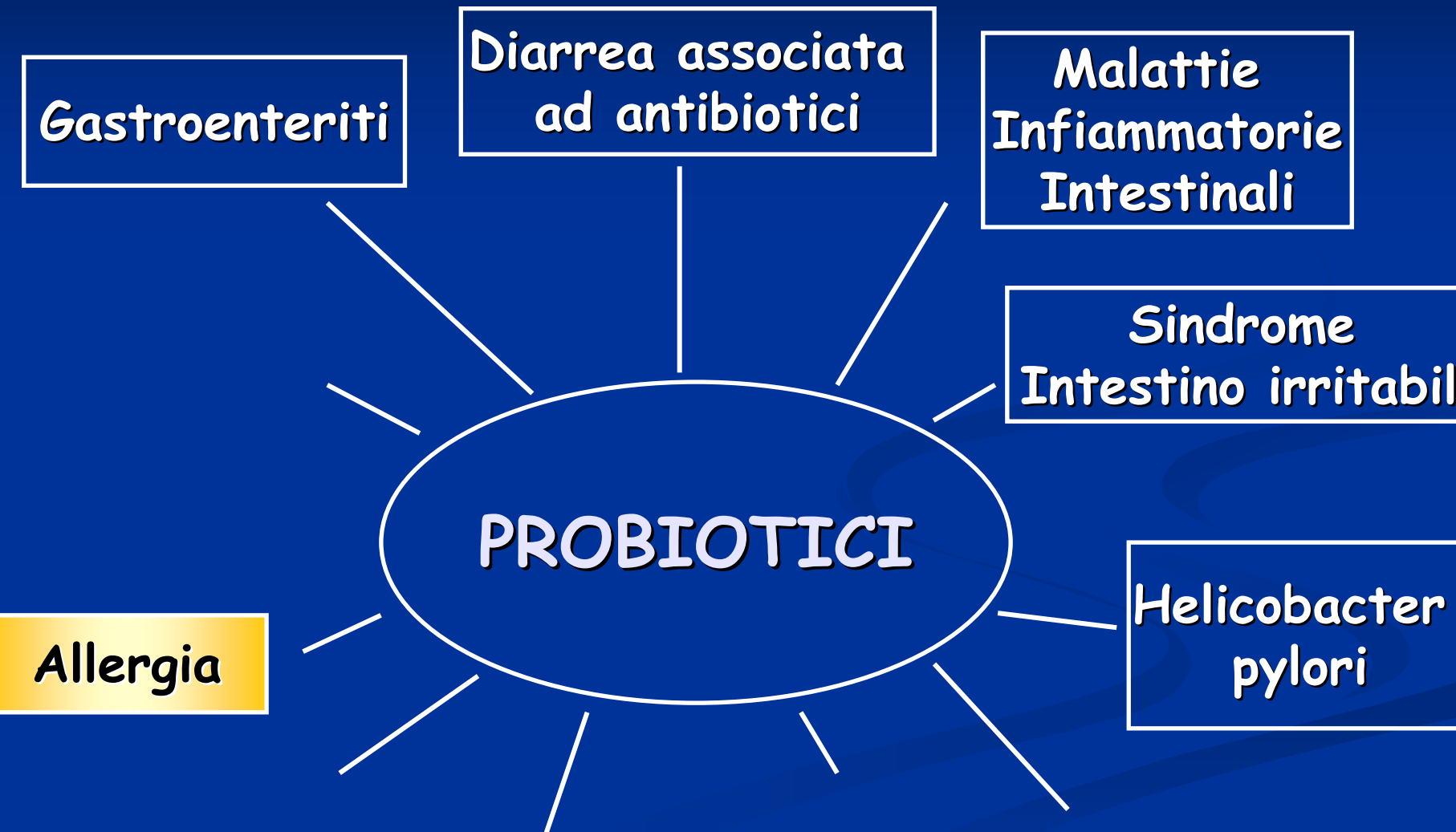
The Journal of International Medical Research  
2007; in press

## Probiotics in Clinical Practice: an Overview

GV Zuccotti, F Meneghin, C Raimondi, D  
Dilillo, C Agostoni, E Riva and M Giovannini

Department of Paediatrics, Luigi Sacco Hospital,  
Department of Paediatrics, San Paolo Hospital,  
University of Milan, Milan, Italy

# Probiotici nella Pratica Clinica



# Probiotici nella pratica clinica

- I Evidence obtained from at least one properly designed **randomized controlled study**
  - A** recommendation is based on strong positive controlled studies in the literature.
  - B** recommendation is based on positive controlled studies, but the presence of some negative studies.
  - C** recommendation is based on some positive studies, but clearly inadequate amount of work to establish certainty
- II Evidence obtained from well-designed cohort or case-controlled trials **without randomization**
- III Evidence obtained from opinions of respected authorities, based on clinical experience, descriptive studies or reports of expert committees

AUTHOR AND YEAR PUBLISHED	TYPE OF TRIAL	POPULATION STUDIED	TYPE OF PROBIOTIC	PROBIOTIC(S) DOSE	OUTCOME	TYPE OF EVIDENCE
Weston S, 2005 <sup>179</sup>	randomized, double-blind, placebo-controlled	56 (53 completed study) children (6-18 months) with moderate or severe DA	<b>Lactobacillus fermentum VRI-033 PCC</b>	1x10 <sup>9</sup> of probiotic twice daily for 8 wk	<b>beneficial</b> in improving the extent and severity of DA	I
Viljanen M, 2005 <sup>180</sup>	randomized, double-blind, placebo-controlled	230 children with suspected cow's milk allergy	<b>Lactobacillus GG (LGG), a mixture of 4 probiotic strains</b>	two groups, one with probiotic mixture and one with placebo for 4 wk	<b>alleviate</b> atopic eczema/dermatitis syndrome symptoms	I
Passeron T, 2006 <sup>181</sup>	double-blind prospective randomized study	48 children at least 2 y enrolled, 9 not completed study	<b>Lactobacillus rhamnosus Lcr35</b>	dose of 1.2x10 <sup>9</sup> cfu three times a day for 3 months	<b>significantly improve</b> manifestations of DA	I
Brouwer ML, 2006 <sup>182</sup>	randomized, double-blind, placebo-controlled	50 infants less than 5 months old with DA	<b>Lactobacillus rhamnosus Lactobacillus GG</b>	3 groups with placebo, with L rhamnosus and LGG for 3 months	<b>no clinical or immunological effect</b> of probiotic in infants with DA	I
osenfeldt V, 2004 <sup>183</sup>	double-blind, placebo-controlled, cross-over study	41 children with moderate and severe atopic dermatitis	<b>Lactobacillus rhamnosus 19070-2 Lactobacillus reuteri DSM 12246</b>	probiotic lactobacilli were administered for 6 weeks	probiotic supplementation may stabilize the intestinal barrier function and decrease gastrointestinal symptoms in children with atopic dermatitis	II

# Probiotici nella Pratica Clinica

## Allergia: sintesi

Clinical condition	Clinical effectiveness	Organisms
<b>Diarrhea</b>	<b>A</b>	<i>S. boulardii</i> , <i>LGG</i> , <i>L.reuteri</i> ( $\pm$ <i>L.rhamnosus</i> )
<b>Antibiotic-associated diarrhea</b>	<b>A</b>	<i>S.boulardii</i> , <i>LGG</i> , Lactobacilli+Bifidobatteri
Crohn disease	B	<i>LGG</i>
<b>Ulcerative colitis</b>	<b>A</b>	<i>E.coli</i> (Nissle)
	C	Bifidobatteri
<b>Pouchitis</b>	<b>A</b>	VSL#3
	B	Lactobacilli
Irritable bowel syndrome	B	Lactobacilli $\pm$ Bifidobatteri
<i>H.pylori</i> infection	C	Lactobacilli
<b>Allergy</b>	<b>B</b>	<i>LGG</i> , altri Lactobacilli
	<b>C</b>	Bifidobatteri

## Factors that could explain varied effects of probiotics in different studies

### The probiotic supplement

- strain(s)
- dose
- viability / properties
- timing / duration
- methods of administration



### The environment

- influences on colonization
  - maternal flora
  - delivery method
- feeding practices and weaning diet
- prebiotic / antibiotics
- general microbial burden
- other immunomodulatory influences

### The host

- genetic predisposition to allergic disease (multiple loci)
- polymorphisms in microbial recognition pathways (e.g. TLR)
- susceptibility to colonization
- compliance / adherence





# MATERNAL INTRAPARTUM ANTIBIOTIC PROPHYLAXIS AND GUT MICROBIOTIC COMPOSITION IN NEWBORN

Zuccotti GV, Pogliani L, Dilillo D, Bessi E<sup>2</sup>, Benenati B<sup>1</sup>, Morelli L<sup>3</sup>,  
Biasucci G<sup>1</sup>

Department of Pediatrics, University of Milan, L. Sacco Hospital, Italy

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, G. da Saliceto Hospital, Piacenza, Italy

<sup>2</sup> Advanced Analytical Technologies, Piacenza Italy

<sup>3</sup> Institute of Microbiology, Sacred Heart Catholic University, Piacenza Italy



Antibiotics are increasingly prescribed in the peripartum period, for both maternal and fetal indications.

Their effective use undoubtedly reduces the incidence of specific invasive infections in the newborn

but.....





....at the price of an increase of resistant coliform infection in preterm and LBW infants

*NEJM 2002*

....and of an increase of NEC

*Lancet 2001*

*J Pediatr Gastr Nutr 2007*

Inoltre:

the composition of early-life flora is associated with allergic sensitisation, metabolic priming and development of regulatory lymphocyte populations

*Could peripartum antibiotics have delayed health consequences for the infant? AR Bedford Russel, SH Murch*

*P TOG 2006;113:758-765*



# PROSPECTIVE OPEN CONTROLLED OBSERVATIONAL STUDY



25 nati a termine, allattamento al  
seno esclusivo

- 13 nati da madre con IAP
- 12 nati da madre senza IAP
- campioni fecali raccolti al 3° e 10° giorno di vita

## CRITERI DI INCLUSIONE:

- Et  gestazionale compresa tra 37 e 42 SG
- Parto vaginale
- Peso alla nascita  $\geq 2500$  g
- Feto unico
- Allattamento al seno esclusivo
- Madre portatrice di SBEB e trattata con IAP per il gruppo 1
- Madre non portatrice di SBEB e non trattata con IAP per il gruppo 2 di controllo

## CRITERI DI ESCLUSIONE:

- Malattia metabolica congenita
- Malformazioni congenite
- Patologie che richiedono ospedalizzazioni
- Trattamento con antibiotici



**IL GRUPPO 1 E 2  
PRESENTAVANO CARATTERISTICHE  
SOVRAPPONIBILI AL BASELINE  
(mean SD)**

	<b>GRUPPO 1</b>	<b>GRUPPO 2</b>
<b>ETA' MATERNA</b> (anni)	28.4 (3.2)	29.6 (3.6)
<b>PARITA'</b> (primo figlio)	9/13	8/12
<b>EG</b> (settimane)	39 (0.8)	40 (0.9)
<b>PESO</b> alla nascita (gr)	3290 (299)	3310 (303)

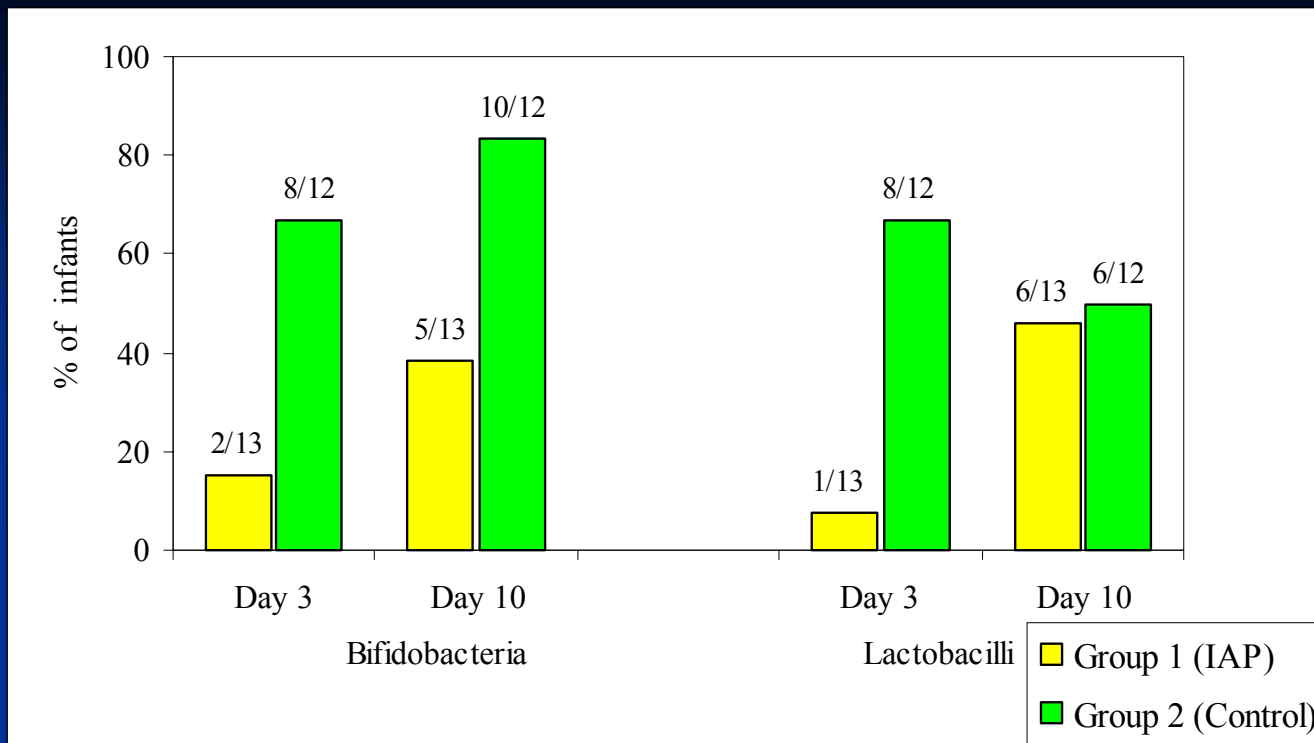


# METODI: ANALISI MICROBIOLOGICHE



Campioni fecali freschi sono stati posti su Rogosa Agar (Difco),  
TPY Agar (Sharlau) per selezionare e contare i lattobacilli ed i  
bifidobatteri. Le piastre sono state poste in incubazione a 37°C  
per 48 ore in condizioni anaerobiche





**LA PROPORZIONE DI NEONATI CON BIFIDOBATTERI E' RISULTATA PIU' BASSA NEL GRUPPO 1 SIA A**

- **3 GIORNI (15.4% VS 66.7%,  $p = 0.015$ ) che**
- **10 GIORNI (38,5% VS 83.3%  $p= 0.041$ )**

**LA PROPORZIONE DI NEONATI CON LATTOBACILLI E' RISULTATA PIU' BASSA NEL GRUPPO 1 SIA A**

- **3 GIORNI (7.7% VS 66.7%  $p= 0.004$ ) MA NON A**
- **10 GIORNI (42.2% VS 50.0%  $p= 1.0$ )**





# Mediana (range) della quantità ( $10^8$ cfu/g) di bifidobatteri e lattobacilli a 3 e 10 giorni di vita



	Bifidobatteri			Lattobacilli		
	Giorno 3	Giorno 10	$P^a$	Giorno 3	Giorno 10	$P^a$
<b>Gruppo 1 (IAP)</b>	0 (0-140)	0 (0-520)	<i>0.345</i>	0 (0-17)	0 (0-310)	<i>0.128</i>
<b>Gruppo 2 (controlli)</b>	0.23 (0-420)	40 (0-780)	<i>0.007*</i>	1.35 (0-220)	0.02 (0-64)	<i>0.859</i>
$P^b$	<i>0.026*</i>	<i>0.022*</i>		<i>0.016*</i>	<i>0.936</i>	

<sup>a</sup> significatività della differenza all'interno del gruppo

<sup>b</sup> significatività della differenza tra i gruppi

Le analisi all'interno del gruppo hanno mostrato che la quantità di ciascun microrganismo non si è modificata in modo significativo nei primi 10 giorni di vita nei neonati di madre trattata con IAP, mentre i Bifidobatteri sono aumentati nel gruppo di controllo ( $P < 0.01$ )



# CONCLUSIONI



Limiti dello studio:

- piccolo numero di pazienti
- valutazione solo di Bifidobatteri e Lattobacilli
- periodo osservazionale corto
- mancanza di follow-up

**La somministrazione materna di antibiotico-profilassi intrapartum potrebbe influenzare la microflora intestinale nei neonati con allattamento materno esclusivo in particolare per quanto riguarda i bifidobatteri**



# PROPOSTA DI RICERCA

G Reid, Nov 2005  
*Canadian Family  
Physician*