

*Alma Mater Studiorum - Università di Bologna*

---

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCATALISI APPLICATA E  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIALE**

**XX CICLO**

**Dipartimento di Scienze Farmaceutiche**

**Settore scientifico disciplinare di afferenza: CHIM/11**

**Impatto di rifaximina sul microbiota intestinale:  
selezione di bifidobatteri antibiotico resistenti**

**Presentata da:**

**Dott. Silvia Turroni**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Patrizia Brigidi**

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Diego Matteuzzi**

**Esame Finale Anno 2008**

---

# Indice

<b>Abstract</b>	A
<b>Introduzione</b>	1
<b>Il microbiota intestinale</b>	2
Composizione: Batteri, Archea, Eucarioti, Virus	3
Localizzazione	8
Ageing	9
Forze ecologiche ed evolutive che modellano la diversità microbica	12
Principali contributi funzionali	15
Attività metaboliche	15
Funzioni trofiche	18
Funzioni protettive	19
Interazioni molecolari tra batteri, epitelio e sistema immune mucosale	20
Ecologia microbica: nuovi approcci coltura-indipendenti	26
<i>Evolutionary diversity</i>	28
<i>Genomic diversity</i>	31
<i>Viability and metabolic activity</i>	33
<b>Phylum <i>Actinobacteria</i></b>	36
Caratteristiche generali	36
Tassonomia	36
Genome sequencing projects	37
<b>Genere <i>Bifidobacterium</i></b>	40
Storia e tassonomia	40
Caratteristiche generali	42
Morfologia	44
Fisiologia	44
Habitat	45
Nutrizione, metabolismo e capacità biosintetiche	46
Strutture extracellulari ed interazione con l'ospite	50
Produzione di batteriocine	51
Risposta a stress	52
Analisi genomica comparativa	52
Genome evolution	53
Elementi prophage-like	53

Elementi di DNA extracromosomici	54
<b>Probiotici</b>	<b>56</b>
Definizione e caratteristiche generali	56
Prerequisiti e criteri di selezione	58
Sicurezza	58
Tolleranza a pH, osmolarità e sali biliari	64
Adesione alla mucosa intestinale	66
Attività antimicrobica	67
Interazione con il sistema immune dell'ospite	67
Attività anti-infiammatoria	71
Effetti nutritivi e terapeutici	72
Miglioramento della tolleranza al lattosio	72
Riduzione del contenuto plasmatico di colesterolo	72
Sintesi di vitamine	72
Sintesi di amminoacidi	72
Inibizione della riduzione del nitrato	72
Effetti su assorbimento minerale, contenuto minerale osseo e struttura ossea	73
Rinforzo della barriera intestinale	73
Applicazioni	75
Gastroenterite acuta	75
Infiammazione gastrica	76
Diabete	76
Dolore addominale	76
Anormalità della flora colonica indotte da stress	76
Anoressia nervosa	77
Cancro colon-rettale	77
Allergie	79
Irritable bowel syndrome	80
Inflammatory bowel disease	80
Paucite	87
Disordini diverticolari	91
Disordini correlati all'accumulo di ossalato	91
Infezioni del tratto respiratorio	92
Infezioni del tratto urinario	92
Invecchiamento	92
Cross-talk con l'ospite	93
<b>Rifaximina</b>	<b>96</b>
Caratteristiche generali	96
Attività antibatterica	97

Farmacocinetica	99
Interazioni tra farmaci	100
Farmacodinamica	100
Potenziale terapeutico	101
Infezioni intestinali e diarrea	101
Encefalopatia epatica	103
Diverticolosi	103
Inflammatory bowel disease	104
Morbo di Crohn	105
Colite ulcerosa	105
Paucite	106
Small intestine bacterial overgrowth (SIBO)	106
Irritable bowel syndrome	107
Profilassi chirurgica	107
Gastriti ed ulcere duodenali	107
Pancreatite acuta	108
Gas intestinale e sintomi correlati alla produzione di gas	108
Vaginosi batteriche	108
Infezioni cutanee	109
Tollerabilità	109
Dosaggi, controindicazioni e precauzioni	110
Conoscenze sull'analogo strutturale rifampicina	111
Meccanismo d'azione	111
Resistenza	113
<b>Scopo della tesi</b>	<b>115</b>
<b>Capitolo 1</b>	<b>117</b>
<b>Impatto di rifaximina sul microbiota intestinale. Impiego di un modello dinamico gastrointestinale.</b>	
<b>Introduzione</b>	<b>118</b>
<b>Modelli <i>in vitro</i> del colon umano</b>	<b>118</b>
<b>Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH)</b>	<b>121</b>
<b>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)</b>	<b>122</b>
<b>FPQuest</b>	<b>125</b>
<b>Materiali e metodi</b>	
Raccolta e preparazione del materiale fecale	126
Ceppi batterici e condizioni di coltura	126
Prodotti chimici e microbiologici	126

Sistema di coltura in continuo a 3 stadi: “the colon model”	126
Conta vitale in piastra su terreni selettivi	127
Analisi FISH delle popolazioni batteriche	127
Estrazione del DNA genomico batterico	129
DNA fingerprinting del microbiota intestinale mediante PCR-DGGE	129
Analisi HPLC di acidi grassi volatili	130
Analisi statistica	130
<b>Risultati</b>	<b>131</b>
Analisi coltura-dipendente	131
Trattamento con rifaximina	131
Somministrazione combinata di rifaximina e probiotico <i>B. lactis</i> BI07	132
Analisi FISH	133
Trattamento con rifaximina	133
Somministrazione combinata di rifaximina e probiotico <i>B. lactis</i> BI07	136
DNA fingerprinting del microbiota intestinale mediante PCR-DGGE	139
Trattamento con rifaximina	139
Somministrazione combinata di rifaximina e probiotico <i>B. lactis</i> BI07	146
Analisi HPLC di acidi grassi volatili	153
Trattamento con rifaximina	153
Somministrazione combinata di rifaximina e probiotico <i>B. lactis</i> BI07	154
<b>Conclusioni</b>	<b>156</b>
<b>Capitolo 2</b>	<b>157</b>
<b>Caratterizzazione genetica e proteomica della resistenza a rifaximina in <i>B. lactis</i> BI07</b>	
<b>Introduzione</b>	<b>158</b>
<b>Proteomica</b>	<b>158</b>
Proteoma e mappe 2D	158
Elettroforesi bidimensionale	158
Preparazione del campione	159
Prima dimensione: Isoelettrofocalizzazione in gradiente di pH immobilizzato (IEF-IPG)	160
Seconda dimensione: SDS-PAGE	160
Visualizzazione dei risultati	161
Software per l’analisi di gel bidimensionali	161
Analisi con spettrometria di massa	162
Identificazione di proteine attraverso l’interrogazione di banche dati	163
<b>Materiali e metodi</b>	<b>164</b>
Ceppi batterici e condizioni di coltura	164

Selezione di mutanti spontanei resistenti a rifaximina	164
Determinazione della sequenza del gene <i>rpoB</i>	164
Analisi proteomica	165
Analisi MS di modificazioni strutturali di rifaximina	166
<b>Risultati</b>	<b>166</b>
Sviluppo di resistenza a rifaximina in <i>Bifidobacterium</i>	166
Analisi del gene <i>rpoB</i> in <i>B. lactis</i> BI07	167
Variazioni nei pattern proteomici associate alla resistenza a rifaximina in <i>B. lactis</i> BI07	167
Modificazioni di rifaximina, indotte da <i>B. lactis</i> BI07-res	173
<b>Conclusioni</b>	<b>173</b>
<b>Capitolo 3</b>	<b>175</b>
<b>Tratti molecolari e fenotipici di mutanti di <i>Bifidobacterium</i>, selezionati <i>in vitro</i>, resistenti a rifaximina</b>	
<b>Introduzione</b>	<b>176</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>176</b>
Agente antimicrobico, ceppi batterici e condizioni di coltura	176
Analisi del gene <i>rpoB</i>	176
Cell-free transcription assay	176
Binding/uptake di rifaximina in <i>B. lactis</i> BI07-res	177
Analisi gas-cromatografica degli acidi grassi di membrana	177
<b>Risultati</b>	<b>178</b>
Analisi genetica di mutanti di <i>Bifidobacterium</i> resistenti a rifaximina	178
Analisi funzionale della RNA polimerasi in <i>B. lactis</i> BI07	180
Barriera di membrana per l'uptake di rifaximina in BI07-res	182
<b>Conclusioni</b>	<b>184</b>
<b>Capitolo 4</b>	<b>186</b>
<b>Attività immunomodulante di rifaximina associata ad un mutante resistente di <i>B. lactis</i></b>	
<b>Introduzione</b>	<b>187</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>187</b>
Ceppi batterici e condizioni di coltura	187
Colture cellulari	187
Esperimenti di stimolazione	187
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	188

<b>Risultati</b>	<b>188</b>
Effetti di rifaximina e <i>B. lactis</i> BI07 sulla produzione di citochine da parte di PBMC	188
<b>Conclusioni</b>	<b>190</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>191</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>194</b>
<b>Appendice 1</b>	<b>258</b>
<b>Appendice 2</b>	<b>267</b>

## Abstract

The ideal approach for the long term treatment of intestinal disorders, such as inflammatory bowel disease (IBD), is represented by a safe and well tolerated therapy able to reduce mucosal inflammation and maintain homeostasis of the intestinal microbiota. A combined therapy with antimicrobial agents, to reduce antigenic load, and immunomodulators, to ameliorate the dysregulated responses, followed by probiotic supplementation has been proposed.

Because of the complementary mechanisms of action of antibiotics and probiotics, a combined therapeutic approach would give advantages in terms of enlargement of the antimicrobial spectrum, due to the barrier effect of probiotic bacteria, and limitation of some side effects of traditional chemotherapy (i.e. indiscriminate decrease of aggressive and protective intestinal bacteria, altered absorption of nutrient elements, allergic and inflammatory reactions).

Rifaximin (4-deoxy-4'-methylpyrido[1',2'-1,2]imidazo[5,4-c]rifamycin SV) is a product of synthesis experiments designed to modify the parent compound, rifamycin, in order to achieve low gastrointestinal absorption while retaining good antibacterial activity.

Both experimental and clinical pharmacology clearly show that this compound is a non systemic antibiotic with a broad spectrum of antibacterial action, covering Gram-positive and Gram-negative organisms, both aerobes and anaerobes. Being virtually non absorbed, its bioavailability within the gastrointestinal tract is rather high with intraluminal and faecal drug concentrations that largely exceed the MIC values observed *in vitro* against a wide range of pathogenic microorganisms. The gastrointestinal tract represents therefore the primary therapeutic target and gastrointestinal infections the main indication. The little value of rifaximin outside the enteric area minimizes both antimicrobial resistance and systemic adverse events.

Fermented dairy products enriched with probiotic bacteria have developed into one of the most successful categories of functional foods. Probiotics are defined as "live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host" (FAO/WHO, 2002), and mainly include *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. Probiotic bacteria exert a direct effect on the intestinal microbiota of the host and contribute to organoleptic, rheological and nutritional properties of food. Administration of pharmaceutical probiotic formula has been associated with therapeutic effects in treatment of diarrhoea, constipation, flatulence, enteropathogens colonization, gastroenteritis, hypercholesterolemia, IBD, such as ulcerative colitis (UC), Crohn's disease, pouchitis and irritable bowel syndrome.

Prerequisites for probiotics are to be effective and safe. The characteristics of an effective probiotic for gastrointestinal tract disorders are tolerance to upper gastrointestinal environment (resistance to digestion by enteric or pancreatic enzymes, gastric acid and bile), adhesion on intestinal surface to lengthen the retention time, ability to prevent the adherence, establishment and/or replication of pathogens, production of antimicrobial substances, degradation of toxic catabolites by bacterial detoxifying enzymatic activities, and modulation of the host immune responses.

This study was carried out using a validated three-stage fermentative continuous system and it is aimed to investigate the effect of rifaximin on the colonic microbial flora of a healthy individual, in terms of bacterial composition and production of fermentative metabolic end products. Moreover, this is the first study that investigates *in vitro* the impact of the simultaneous administration of the

antibiotic rifaximin and the probiotic *B. lactis* BI07 on the intestinal microbiota. Bacterial groups of interest were evaluated using culture-based methods and molecular culture-independent techniques (FISH, PCR-DGGE). Metabolic outputs in terms of SCFA profiles were determined by HPLC analysis.

Collected data demonstrated that rifaximin as well as antibiotic and probiotic treatment did not change drastically the intestinal microflora, whereas bacteria belonging to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* significantly increase over the course of the treatment, suggesting a spontaneous upsurge of rifaximin resistance. These results are in agreement with a previous study, in which it has been demonstrated that rifaximin administration in patients with UC, affects the host with minor variations of the intestinal microflora, and that the microbiota is restored over a wash-out period. In particular, several *Bifidobacterium* rifaximin resistant mutants could be isolated during the antibiotic treatment, but they disappeared after the antibiotic suspension.

Furthermore, bacteria belonging to *Atopobium* spp. and *E. rectale*/*Clostridium* cluster XIVa increased significantly after rifaximin and probiotic treatment. *Atopobium* genus and *E. rectale*/*Clostridium* cluster XIVa are saccharolytic, butyrate-producing bacteria, and for these characteristics they are widely considered health-promoting microorganisms.

The absence of major variations in the intestinal microflora of a healthy individual and the significant increase in probiotic and health-promoting bacteria concentrations support the rationale of the administration of rifaximin as efficacious and non-dysbiosis promoting therapy and suggest the efficacy of an antibiotic/probiotic combined treatment in several gut pathologies, such as IBD.

To assess the use of an antibiotic/probiotic combination for clinical management of intestinal disorders, genetic, proteomic and physiologic approaches were employed to elucidate molecular mechanisms determining rifaximin resistance in *Bifidobacterium*, and the expected interactions occurring in the gut between these bacteria and the drug. The ability of an antimicrobial agent to select resistance is a relevant factor that affects its usefulness and may diminish its useful life.

Rifaximin resistance phenotype was easily acquired by all bifidobacteria analyzed [type strains of the most representative intestinal bifidobacterial species (*B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis* and *B. bifidum*) and three bifidobacteria included in a pharmaceutical probiotic preparation (*B. lactis* BI07, *B. breve* BBSF and *B. longum* BL04)] and persisted for more than 400 bacterial generations in the absence of selective pressure. Exclusion of any reversion phenomenon suggested two hypotheses: (i) stable and immobile genetic elements encode resistance; (ii) the drug moiety does not act as an inducer of the resistance phenotype, but enables selection of resistant mutants.

Since point mutations in *rpoB* have been indicated as representing the principal factor determining rifampicin resistance in *E. coli* and *M. tuberculosis*, whether a similar mechanism also occurs in *Bifidobacterium* was verified. The analysis of a 129 bp *rpoB* core region of several wild-type and resistant bifidobacteria revealed five different types of miss-sense mutations in codons 513, 516, 522 and 529. Position 529 was a novel mutation site, not previously described, and position 522 appeared interesting for both the double point substitutions and the heterogeneous profile of nucleotide changes. The sequence heterogeneity of codon 522 in *Bifidobacterium* leads to hypothesize an indirect role of its encoded amino acid in the binding with the rifaximin moiety. These results demonstrated the chromosomal nature of rifaximin resistance in *Bifidobacterium*, minimizing risk factors for horizontal transmission of resistance elements between intestinal microbial species.

Further proteomic and physiologic investigations were carried out using *B. lactis* BI07, component of a pharmaceutical probiotic preparation, as a model strain. The choice of this strain was determined based on the following elements: (i) *B. lactis* BI07 is able to survive and persist in the gut; (ii) a proteomic overview of this strain has been recently reported.

The involvement of metabolic changes associated with rifaximin resistance was investigated by proteomic analysis performed with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Comparative proteomic mapping of BI07-wt and BI07-res revealed that most differences in protein expression patterns were genetically encoded rather than induced by antibiotic exposure. In particular, rifaximin resistance phenotype was characterized by increased expression levels of stress proteins. Overexpression of stress proteins was expected, as they represent a common non specific response by bacteria when stimulated by different shock conditions, including exposure to toxic agents like heavy metals, oxidants, acids, bile salts and antibiotics. Also, positive transcription regulators were found to be overexpressed in BI07-res, suggesting that bacteria could activate compensatory mechanisms to assist the transcription process in the presence of RNA polymerase inhibitors. Other differences in expression profiles were related to proteins involved in central metabolism; these modifications suggest metabolic disadvantages of resistant mutants in comparison with sensitive bifidobacteria in the gut environment, without selective pressure, explaining their disappearance from faeces of patients with UC after interruption of antibiotic treatment.

The differences observed between BI07-wt e BI07-res proteomic patterns, as well as the high frequency of silent mutations reported for resistant mutants of *Bifidobacterium* could be the consequences of an increased mutation rate, mechanism which may lead to persistence of resistant bacteria in the population. However, the *in vivo* disappearance of resistant mutants in absence of selective pressure, allows excluding the upsurge of compensatory mutations without loss of resistance. Furthermore, the proteomic characterization of the resistant phenotype suggests that rifaximin resistance is associated with a reduced bacterial fitness in *B. lactis* BI07-res, supporting the hypothesis of a biological cost of antibiotic resistance in *Bifidobacterium*.

The hypothesis of rifaximin inactivation by bacterial enzymatic activities was verified by using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Neither chemical modifications nor degradation derivatives of the rifaximin moiety were detected. The exclusion of a biodegradation pattern for the drug was further supported by the quantitative recovery in BI07-res culture fractions of the total rifaximin amount (100 µg/ml) added to the culture medium.

To confirm the main role of the mutation on the  $\beta$  chain of RNA polymerase in rifaximin resistance acquisition, transcription activity of crude enzymatic extracts of BI07-res cells was evaluated. Although the inhibition effects of rifaximin on *in vitro* transcription were definitely higher for BI07-wt than for BI07-res, a partial resistance of the mutated RNA polymerase at rifaximin concentrations > 10 µg/ml was supposed, on the basis of the calculated differences in inhibition percentages between BI07-wt and BI07-res. By considering the resistance of entire BI07-res cells to rifaximin concentrations > 100 µg/ml, supplementary resistance mechanisms may take place *in vivo*.

A barrier for the rifaximin uptake in BI07-res cells was suggested in this study, on the basis of the major portion of the antibiotic found to be bound to the cellular pellet respect to the portion recovered in the cellular lysate. Related to this finding, a resistance mechanism involving changes of membrane permeability was supposed. A previous study supports this hypothesis, demonstrating

the involvement of surface properties and permeability in natural resistance to rifampicin in mycobacteria, isolated from cases of human infection, which possessed a rifampicin-susceptible RNA polymerase.

To understand the mechanism of membrane barrier, variations in percentage of saturated and unsaturated FAs and their methylation products in BI07-wt and BI07-res membranes were investigated. While saturated FAs confer rigidity to membrane and resistance to stress agents, such as antibiotics, a high level of lipid unsaturation is associated with high fluidity and susceptibility to stresses. Thus, the higher percentage of saturated FAs during the stationary phase of BI07-res could represent a defence mechanism of mutant cells to prevent the antibiotic uptake. Furthermore, the increase of CFAs such as dihydrosterculic acid during the stationary phase of BI07-res suggests that this CFA could be more suitable than its isomer lactobacillic acid to interact with and prevent the penetration of exogenous molecules including rifaximin.

Finally, the impact of rifaximin on immune regulatory functions of the gut was evaluated. It has been suggested a potential anti-inflammatory effect of rifaximin, with reduced secretion of IFN- $\gamma$  in a rodent model of colitis. Analogously, it has been reported a significant decrease in IL-8, MCP-1, MCP-3 e IL-10 levels in patients affected by pouchitis, treated with a combined therapy of rifaximin and ciprofloxacin.

Since rifaximin enables *in vivo* and *in vitro* selection of *Bifidobacterium* resistant mutants with high frequency, the immunomodulation activities of rifaximin associated with a *B. lactis* resistant mutant were also taken into account.

Data obtained from PBMC stimulation experiments suggest the following conclusions: (i) rifaximin does not exert any effect on production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10, whereas it weakly stimulates production of TNF- $\alpha$ ; (ii) *B. lactis* appears as a good inducer of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ; (iii) combination of BI07-res and rifaximin exhibits a lower stimulation effect than BI07-res alone, especially for IL-6.

These results confirm the potential anti-inflammatory effect of rifaximin, and are in agreement with several studies that report a transient pro-inflammatory response associated with probiotic administration.

The understanding of the molecular factors determining rifaximin resistance in the genus *Bifidobacterium* assumes an applicative significance at pharmaceutical and medical level, as it represents the scientific basis to justify the simultaneous use of the antibiotic rifaximin and probiotic bifidobacteria in the clinical treatment of intestinal disorders.

# Introduzione

## Il microbiota intestinale

L'intestino umano rappresenta uno degli ecosistemi microbici con la maggiore densità di popolazione presente in natura. Le dimensioni del microbiota intestinale umano, con un carico di  $10^{13}$ - $10^{14}$  microrganismi ed un peso pari a circa 1 kg, superano di gran lunga quelle delle altre comunità microbiche associate alle superfici del corpo umano, e sono circa 10 volte superiori rispetto al numero totale delle nostre cellule somatiche e germinali (Savage, 1977). La grande maggioranza di questi microrganismi risiede nel colon dove le densità di popolazione raggiungono tipicamente valori di  $10^{11}$ - $10^{12}$  microrganismi/ml di contenuto luminale. Se si considera che la terra è abitata da 6.5 miliardi di esseri umani, la riserva intestinale globale risulta allora costituita da  $10^{23}$ - $10^{24}$  cellule microbiche, un numero inferiore di soli 5 ordini di grandezza rispetto agli oceani terrestri che si stima contengano  $10^{29}$  cellule (Whitman *et al.*, 1998).

Il microbiota intestinale umano, spesso indicato come “a forgotten organ of the human body” (O’Hara e Shanahan, 2006), contiene un numero di geni almeno 100 volte superiore rispetto al genoma umano (Bäckhed *et al.*, 2005). Il numero di geni presenti nell’uomo è stato infatti calcolato essere 31897 (<http://eugenescience.org/>), un valore relativamente piccolo se si considerano i 7547 geni del lievito, le 29388 ORF di *Arabidopsis thaliana* e le 23399 ORF del nematode *Caenorhabditis elegans*.

Alla luce di queste considerazioni, l’uomo può essere quindi considerato un superorganismo costituito da cellule umane e microbiche, il cui corredo genetico è rappresentato dall’insieme dei geni presenti nel genoma umano e nel genoma del microbiota intestinale (microbioma) (Lederberg, 2000).

Lo sviluppo della microflora intestinale di un individuo dipende da numero e tipo di microrganismi con cui l’individuo entra in contatto nelle prime fasi di crescita, e dal patrimonio genetico dell’individuo stesso. La complessità di questi processi di interazione e la stocasticità delle popolazioni microbiche con cui l’individuo entra in contatto contribuiscono a rendere unico il microbiota di ogni singolo individuo adulto. Quest’unica e specifica comunità microbica è dotata di una struttura che si mantiene relativamente stabile nel tempo (Zoetendal *et al.*, 1998; Eckburg *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2006). La composizione della microflora può, infatti, subire alterazioni in caso di disordini, come diarrea acuta, durante trattamento antibiotico e, in misura minore, in seguito a modifiche nella dieta, ma i pattern individuali tendono a rimanere costanti (Guarner e Malagelada, 2003). Nell’ambito di un determinato habitat intestinale, alcuni membri microbici sono riconosciuti quali autoctoni o “residenti”, mentre altri, alloctoni, derivano dal cibo ingerito, dall’acqua o da altre componenti dell’ambiente esterno, il che rende questo ecosistema estremamente dinamico.

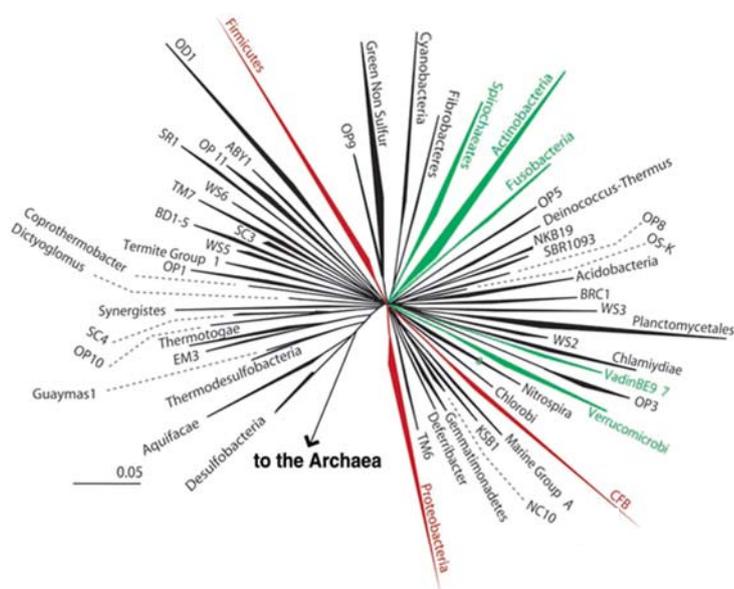
La relazione che si instaura tra ospite e componenti del microbiota è stata spesso descritta come commensale (un partner trae beneficio mentre l’altro non risulta influenzato), mentre è sicuramente più realistico definirla simbiotica o mutualistica (entrambi i partner incrementano il loro fitness). In questo rapporto mutualistico, l’ospite acquisisce energia, mediante assorbimento dei prodotti finali delle fermentazioni batteriche [short chain fatty acid (SCFA)], mentre il microbiota si trova in un ambiente anossico protetto con un ricco buffet di nutrienti e a temperatura relativamente costante (Bäckhed *et al.*, 2005).

## Composizione: Batteri, Archea, Eucarioti, Virus

Il microbiota intestinale umano contiene tutti e tre i domini della vita, batteri, archeobatteri ed eucarioti. Nonostante le altissime densità cellulari dei batteri (Whitman *et al.*, 1998), la diversità a livello di divisioni è tra le più basse di qualsiasi ecosistema (Hugenholtz *et al.*, 1998). Le stime disponibili, basate sulle sequenze del gene 16S rRNA, indicano infatti che più del 90% dei tipi filogenetici (filotipi) dei batteri del colon appartengono solo a 2 divisioni (phyla) delle 70 note nel dominio dei batteri, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (rispettivamente 60 e 80% della comunità fecale totale, ed entrambi a basso contenuto in G+C ma, rispettivamente, Gram negativi e positivi), con i rimanenti filotipi distribuiti tra altre 8 divisioni (Eckburg *et al.*, 2005). All'interno del phylum *Firmicutes*, la maggior parte delle sequenze fino ad ora disponibili appartiene alla famiglia *Lachnospiraceae*, che include i gruppi clostridiali XIVA e IV (Eckburg *et al.*, 2005). Con un numero di specie batteriche pari ad un valore compreso tra 500 e 1000 [il 99% dei batteri appartengono, tuttavia, a sole 30 o 40 specie principali (Beaugerie e Petit, 2004)] e con più di 7000 ceppi (Ley *et al.*, 2006), l'albero evolutivo del microbiota intestinale umano può essere visualizzato con 9 rami corrispondenti alle divisioni identificate sino ad ora (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *VadinBE97*), ciascuno sovrastato da fronde rappresentanti le stirpi discendenti, e ciascuna fronda composta da innumerevoli foglie che rappresentano i batteri strettamente correlati tra loro (Fig. 1) (Bäckhed *et al.*, 2005). A confronto, il suolo, definibile come "l'intestino" della biosfera terrestre in cui avviene la degradazione della materia organica, può essere raffigurato come un immenso cespuglio contenente almeno 20 divisioni batteriche (Dunbar *et al.*, 2002) (Fig. 2A e B). L'architettura filogenetica del microbiota intestinale umano (alti livelli di variazione di ceppi a partire da una comunità limitata) riflette probabilmente l'età evolutiva dell'intestino di mammiferi [circa 100 milioni di anni per i mammiferi con placenta (Murphy *et al.*, 2001), contro i > 3.85 miliardi di anni per l'ecosistema microbico oceanico]. Recentemente, Frank *et al.* (2007), mediante utilizzo di  $S_{\text{chao1}}$  estimator, e modeling bootstrap resampled collector's curves, in maniera analoga all'impiego del plot Lineweaver-Burk in enzimologia, hanno individuato i limiti inferiori relativi alla ricchezza del microbioma del tratto gastrointestinale umano. Entrambi i metodi hanno permesso di stimare almeno 1800 generi e circa 15000-36000 specie batteriche, a seconda che le specie siano classificate in maniera conservativa (97% Operational Taxonomic Unit, OTU) o libera (99% OTU). La mole di sequenze attualmente disponibili rappresenta quindi al meglio, il 50% della diversità predetta a livello di specie.

Nonostante siano 13 le divisioni di archeobatteri descritte fino ad ora, la comunità archea dell'intestino umano risulta molto semplice e consiste di soli 3 isolati, dei quali *Methanosphaera stadtmanae* è raro (Miller e Wolin, 1985), e *Methanobrevibacter ruminantium* è stato riportato in un singolo studio datato 1968 (Nottingham e Hungate, 1968). La presenza di un solo archeobatterio appartenente agli Euryarchaea, l'abbondante *Methanobrevibacter smithii* (fino al 10% del microbiota intestinale), è stata confermata da studi molecolari (Miller e Wolin, 1986; Eckburg *et al.*, 2005). *M. smithii* accoppia l'ossidazione di H<sub>2</sub> alla riduzione di CO<sub>2</sub> per produrre metano (CH<sub>4</sub>). Nelle feci di produttori di metano, gli archeobatteri metanogeni sono stati rilevati a concentrazioni > 10<sup>8</sup>/ml, mentre in non produttori i loro livelli sono compresi tra 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup>/ml (Doré *et al.*, 1995). Fornendo lo step finale nel processo di estrazione di energia mediante degradazione di composti organici, gli

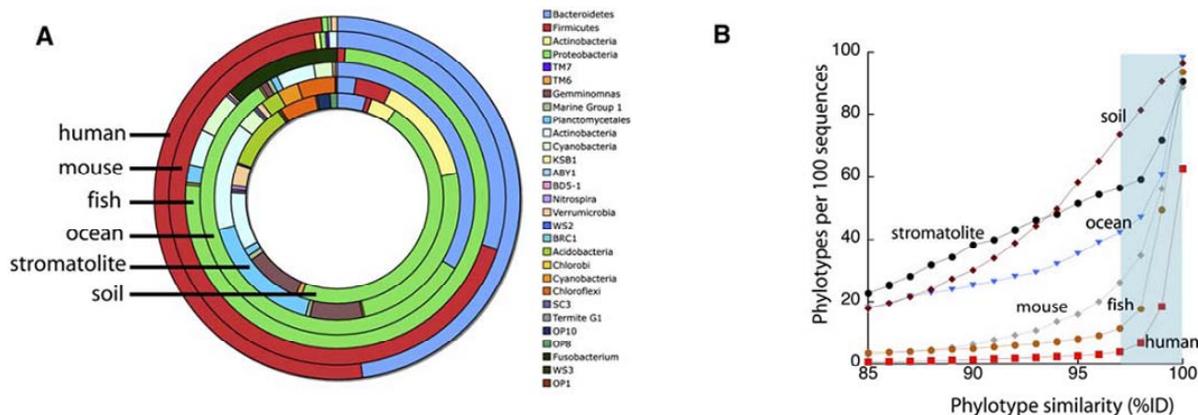
archaea possono alterare la termodinamica dell'intero sistema, con profonde conseguenze per l'ospite. Nonostante un possibile coinvolgimento del genotipo dell'ospite, fattori ambientali e della dieta sembrano essere i principali responsabili nel determinare numero e attività dei metanogeni a livello intestinale (Florin *et al.*, 2000). Ulteriori studi restano comunque necessari per verificare la bassa diversità degli archeobatteri (Rieu-Lesme *et al.*, 2005).



**Fig. 1.** Diversità batterica nell'intestino umano. L'albero filogenetico relativo al dominio Bacteria è stato costruito da Bäckhed *et al.* (2005) sulla base di 8903 sequenze rappresentative del gene 16S rRNA. Le divisioni (superkingdom) numericamente abbondanti sono mostrate in rosso, quelle rare in verde, mentre il colore nero indica divisioni "undetected". I proteobacteria sono comuni ma solitamente non dominanti (Seksik *et al.*, 2003). La lunghezza delle linee è una misura della distanza evolutiva dal progenitore comune.

La scale bar indica il grado di diversità (distanza evolutiva) all'interno di una divisione, in termini di frazione di nucleotidi del gene 16S rRNA che differiscono tra i diversi membri.

CFB, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*.



**Fig. 2.** Confronto della diversità microbica tra colon umano, cieco murino, oceano e suolo.

(A) Rappresentazione percentuale delle divisioni presenti in ciascun ambiente. Per l'intestino umano, sono state utilizzate 11831 sequenze del gene 16S rRNA (Eckburg *et al.*, 2005). I 5088 dati relativi al cieco di topo provengono da Ley *et al.* (2005); il dataset dell'oceano (1082 sequenze) è stato fornito da Acinas *et al.* (2004); le 1387 sequenze relative all'intestino di zebrafish sono state ottenute da Rawls *et al.* (2006). Il dataset relativo al suolo deriva dalla combinazione di 2 studi indipendenti [1379 sequenze di Axelrod *et al.* (2002) e Tringe *et al.* (2005)]. Le 321 sequenze di stromatoliti (Papineau *et al.*, 2005) sono state ottenute da Gen-Bank. Le sequenze sono state allineate da Ley *et al.* (2006).

(B) Architettura filogenetica delle comunità microbiche mostrate in (A).

Per ciascun habitat, Ley *et al.* (2006) hanno riportato il numero di filotipi ogni 100 sequenze del gene 16S rRNA a differenti livelli di identità di sequenza (%ID). La barra azzurra evidenzia i filotipi con %ID  $\geq 97\%$ , valore di cutoff normalmente impiegato per designare i taxa specie e sottospecie. Le matrici di distanza sono state calcolate da Ley *et al.* (2006). A differenza di suolo ed oceano, l'intestino mostra il declino più accentuato nell'abbondanza filotipica a %ID  $\leq 97\%$ . La forma delle curve riflette la struttura della diversità. La dimensione dei campioni influenza la relativa posizione delle curve.

In Tab. 1 è riportata la distribuzione filogenetica, basata sulle sequenze geniche di SSU (Small Subunit, 16S e 18S) rRNA, dei filotipi procariotici del tratto gastrointestinale umano. In Fig. 3A e B sono riportate, rispettivamente, la distribuzione filogenetica delle classi di phylum fino ad ora identificate (vedi Tab. 1), e l'abbondanza relativa dei phylum di appartenenza (Eckburg *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Bik *et al.*, 2006, Gill *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2007).

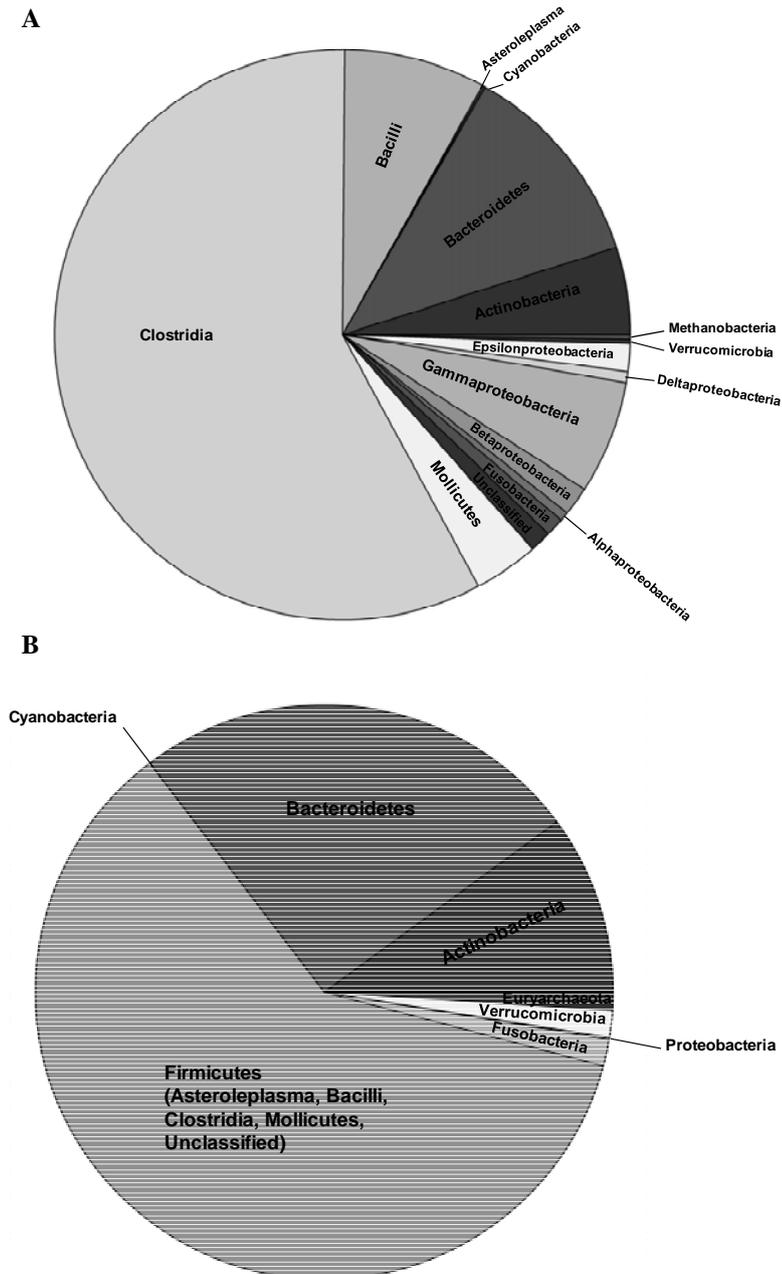
La diversità degli eucarioti presenti nel microbiota intestinale umano è stata determinata esclusivamente mediante approcci coltura-dipendenti. Da campioni intestinali umani sono state isolate 17 specie appartenenti ai generi *Candida*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Anderson, 1917; Finegold *et al.*, 1974; 1977; Taylor *et al.*, 1985; Biasoli *et al.*, 2002). Fatta eccezione per *Candida albicans* e *C. rugosa*, gli eucarioti non sono risultati né ampiamente distribuiti né tantomeno abbondanti nell'intestino umano [si stima che rappresentino circa lo 0.05% del microbiota fecale (Simon e Gorbach, 1984)].

In un recente studio, è stata descritta la composizione dei geni rRNA fungini di tessuti e del contenuto luminale dell'intestino murino. Mediante utilizzo di un metodo coltura-indipendente, denominato fingerprinting oligonucleotidico dei geni rRNA (OFRG), Scupham *et al.* (2006) hanno identificato i generi *Acremonium*, *Monilinia*, *Fusarium*, *Cryptococcus/Filobasidium*, *Scleroderma*, *Catenomyces*, *Spizellomyces*, *Neocallimastix*, *Powellomyces*, *Entophlyctis*, *Mortierella*, *Smittium*, e l'ordine *Mucorales*, appartenenti ai 4 maggiori phyla fungini *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Zygomycota*. Nell'uomo, popolazioni fungine sono state analizzate solo in numero limitato di pazienti affetti da paucite e sottoposti a terapia probiotica (Kühbacher *et al.*, 2006).

I virus rappresentano un ulteriore ed importante costituente del microbiota intestinale umano come indicato da studi recenti che riportano l'identificazione, nelle feci umane, di più di 1200 genotipi virali con una densità fino a  $10^9$  virioni/g di materiale secco (Breitbart *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006), e di batteriofagi nella mucosa di soggetti sani e affetti da malattie infiammatorie intestinali (IBD) (Lepage, 2005). I batteriofagi esercitano una forte influenza sulla diversità batterica e sulla struttura della popolazione, e probabilmente sono coinvolti in fenomeni di disbiosi, destabilizzando le comunità batteriche (Riley, 2004). Recentemente, Lepage *et al.* (2008) hanno misurato la comunità virale totale associata alla mucosa intestinale in individui sani ed in pazienti affetti da morbo di Crohn. Mediante microscopia ad epifluorescenza, sono state osservate particelle virus-simili (VLP) con una media di  $1.2 \times 10^9$  VLP per campione bioptico ( $4.4 \times 10^7$  -  $1.7 \times 10^{10}$ ,  $10^{10}/\text{mm}^3$  di tessuto). Particelle virali corrispondenti a batteriofagi con morfotipi di *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae*, sono risultate dominanti, ed ogni individuo è apparso colonizzato da un'unica famiglia fagica prevalente.

**Tab. 1.** Distribuzione filogenetica delle sequenze geniche di SSU rRNA (1998-2006) dei filotipi procariotici del tratto gastrointestinale umano, riportate da Rajilić *et al.* (2007).

Phylum	Class	Order	Family/Cluster			
<i>Actinobacteria</i>	57 <i>Actinobacteria</i>	57 <i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i> 6			
			<i>Corynebacteriaceae</i> 6			
			<i>Micrococcaceae</i> 4			
			<i>Propionibacteriaceae</i> 6			
<i>Bacteroidetes</i>	136 <i>Bacteroidetes</i>	136 <i>Bacteroidales</i>	<i>Bifidobacteriales</i> 20			
			<i>Coriobacteriales</i> 15			
			<i>Rikenellaceae</i> 15			
			<i>Bacteroidaceae</i> 45			
			<i>Prevotellaceae</i> 36			
			<i>Porphyromonadaceae</i> 21			
			Unclassified 19			
			<i>Cyanobacteria</i> 1			
			<i>Firmicutes</i>	818	92	<i>Chroococcales</i> 1
						<i>Anaeroplasmatales</i> 1
<i>Bacillales</i> 18	<i>Bacillaceae</i> 14					
	<i>Staphylococcaceae</i> 4					
	<i>Lactobacillales</i> 74					
	<i>Aerococcaceae</i> 1					
	<i>Carnobacteriaceae</i> 1					
	<i>Lactobacillaceae</i> 36					
	<i>Leuconostocaceae</i> 2					
	<i>Lactococcaceae</i> 2					
	<i>Streptococcaceae</i> 32					
	<i>Clostridia</i> 669	<i>Clostridiales</i> 669				
<i>Cl. cluster I</i> 27						
<i>Cl. cluster III</i> 7						
<i>Cl. cluster IV</i> 212						
<i>Cl. cluster IX</i> 40						
<i>Cl. cluster XI</i> 31						
<i>Cl. cluster XIII</i> 8						
<i>Cl. cluster XIVa</i> 276						
<i>Mollicutes</i> 42	Unclassified 42					
	<i>Cl. cluster XVI</i> 14					
	<i>Cl. cluster XVII</i> 5					
	<i>Cl. cluster XVIII</i> 9					
	Unclassified 14					
<i>Fusobacteria</i> 12	12 <i>Fusobacteria</i>	12 <i>Fusobacteriales</i>	<i>Fusobacteriaceae</i> 11			
			<i>Incertae sedis 11</i> 1			
<i>Proteobacteria</i> 124	124	6	<i>Rhizobiales</i> 1			
			<i>Sphingomonadales</i> 1			
			Unclassified 4			
			<i>Betaproteobacteria</i> 19	19	18 <i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i> 8
						<i>Oxalobacteriaceae</i> 3
						<i>Burkholderiaceae</i> 1
						<i>Incertae sedis 5</i> 1
						Unclassified 5
						<i>Neisseriales</i> 1
			<i>Gammaproteobacteria</i> 74	74	4	<i>Aeromonadales</i> 4
						<i>Succinivibrionaceae</i> 2
						<i>Enterobacteriales</i> 51
						<i>Pasteurellales</i> 2
						<i>Pseudomonadales</i> 11
						<i>Moraxellaceae</i> 6
						<i>Pseudomonadaceae</i> 5
						<i>Vibrionales</i> 4
						<i>Xanthomonadales</i> 2
<i>Desulfovibrionales</i> 7						
<i>Epsilonproteobacteria</i> 18	18	18 <i>Campylobacteriales</i>	<i>Campylobacteraceae</i> 12			
			<i>Helicobacteraceae</i> 6			
			<i>Verrucomicrobia</i> 3			
<i>Verrucomicrobia</i> 3	3	3 <i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i> 3			
			<i>Euryarchaeota</i> 3			
<i>Methanobacteria</i> 3	3	3 <i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i> 3			



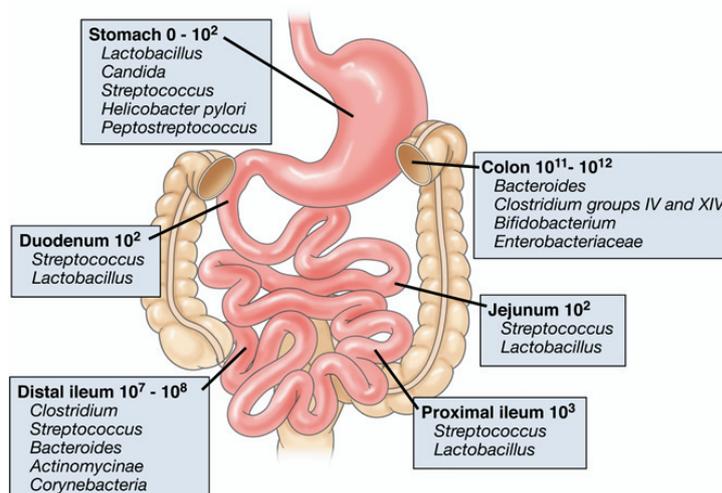
**Fig. 3.** Diversità procariotica del tratto gastrointestinale umano.

(A) Distribuzione filogenetica, basata sulle sequenze geniche SSU rRNA, delle classi di phylum identificate dal 1998 fino agli inizi del 2006.

(B) Abbondanza relativa dei phylum nel tratto gastrointestinale umano, calcolata sulla base degli studi effettuati da Eckburg *et al.* (2005), Wang *et al.* (2005), Bik *et al.* (2006), Gill *et al.* (2006), Ley *et al.* (2006), e Palmer *et al.* (2007).

## Localizzazione

Il microbiota intestinale umano differisce a livello quantitativo e qualitativo lungo il tratto gastrointestinale (Fig. 4) (Savage, 1977; Berg, 1996). A queste differenze si aggiunge una stratificazione orizzontale, con la presenza di diverse comunità microbiche nel lumen intestinale, nello strato di muco, nelle cripte e direttamente aderenti alle cellule epiteliali (Roze *et al.*, 1982; Lee, 1984).



**Fig. 4.** Composizione e concentrazioni luminali delle specie microbiche dominanti nelle differenti regioni del tratto gastrointestinale umano.

In termini quantitativi, esofago e stomaco portano il minore carico batterico. Il normale microbiota esofageo è relativamente semplice in termini di composizione in specie, ed i predominanti batteri coltivabili sono anaerobi facoltativi che derivano dalla cavità orale, quali streptococchi e lattobacilli ( $10^2$ - $10^3$ /cm<sup>2</sup> di superficie mucosale o /ml di aspirato luminale).

Fatta eccezione per le poche ore immediatamente successive ad un pasto, lo stomaco umano è per lo più privo di un significativo microbiota, ma contiene solo relativamente bassi livelli di lattobacilli e di altri microrganismi acido resistenti ( $10^1$ - $10^2$ /ml di contenuto), generalmente provenienti dalla cavità orale. Nella mucosa gastrica è stata evidenziata anche la presenza di *Helicobacter pylori*, agente eziologico di gastrite, ulcera gastrica e duodenale, implicato nel cancro allo stomaco, presente nel 30-80% di individui sani. Il breve tempo di residenza (1-2 h), l'acidità del contenuto gastrico, la presenza di ossido nitrico, che deriva dalla riduzione batterica del nitrato salivario, e di enzimi proteolitici, sono i principali fattori che rendono lo stomaco una barriera al continuo accesso di batteri dall'ambiente esterno verso le parti distali del tratto gastrointestinale. Tuttavia, l'analisi recente effettuata da Bik *et al.* (2006) su sequenze del gene 16S rRNA recuperate dalla mucosa gastrica di 23 soggetti, ha permesso di scoprire una diversità maggiore di quanto considerato fino ad ora, con la caratterizzazione, per la prima volta nello stomaco umano, di membri dei phyla *Deinococcus/Thermus*. Nelle biopsie gastriche, similmente alla composizione del microbiota intestinale, sono risultati predominanti membri dei phyla *Proteobacteria* (per la maggior parte *H. pylori*), *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, mentre una minor percentuale è stata riportata per *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, TM7, *Deferribacteres* e *Deinococcus/Thermus* (Bik *et al.*, 2006).

Il rapido flusso di materiale attraverso l'intestino tenue (tempo di transito del digerito compreso tra 2 e 4 h) previene una permanente colonizzazione microbica di questo tratto. Tuttavia, il numero di batteri aumenta progressivamente lungo l'intestino in parallelo al calo del potenziale ossidoriduttivo. Il microbiota del digiuno appare dominato da specie appartenenti al genere *Streptococcus* (Wang *et al.*, 2005) ma, solo a livello ileo-cecale, è presente una significativa popolazione di batteri [ $10^8$ - $10^9$ /g di contenuto intestinale (Macfarlane *et al.*, 1995)]. L'analisi dei geni SSU rRNA, effettuata da Frank *et al.* (2007) su campioni del tratto gastrointestinale umano, ha confermato l'arricchimento, a livello di intestino tenue, di sequenze appartenenti al sottogruppo *Bacillus* del phylum *Firmicutes* (principalmente *Streptococcaceae*, corrispondenti al 23% delle sequenze ottenute contro il 5% a livello di colon). E' stato, inoltre, riscontrato un 8% corrispondente a sequenze di membri del phylum *Actinobacteria* e, in particolare, dei sottogruppi *Actinomycinaeae* e *Corynebacteriaceae*. Da campioni del piccolo intestino sono state ottenute poche sequenze di *Bacteroidetes* e *Lachnospiraceae*, contrariamente a quanto osservato a livello di colon.

L'intestino crasso rappresenta il sito del tratto gastrointestinale con il più alto numero di batteri e la maggiore diversità microbica [ $10^{11}$ - $10^{12}$ /ml di contenuto luminale, pari a circa il 60% della massa fecale (Guarner e Malagelada, 2003)]. Si tratta per la maggior parte di anaerobi stretti, spesso non sporigeni (Moore e Holdeman, 1974), il 54-75% dei quali Gram-positivi (Zoetendal *et al.*, 2006). La motilità stagnante con contrazioni retropulsive permette di trattenere il contenuto per lunghi periodi, ed il pH risulta tamponato da secrezioni di bicarbonato. A livello di colon, il microbiota viene di solito considerato un'entità omogenea; in realtà i batteri esistono in una molteplicità di differenti microhabitat e nicchie metaboliche associate alla mucosa, allo strato di muco che riveste l'intestino, e alla superficie di residui digestivi particulati, presenti nel lumen intestinale. Questi biofilm microbici sono spesso caratterizzati da un comportamento multicellulare coordinato e da un potenziale metabolico differente, in natura ed efficienza, rispetto alle loro controparti non aderenti. Molte specie all'interno dei biofilm, mostrano anche una maggiore resistenza ad antibiotici ed altri fattori ambientali, quali pH acido e misure difensive dell'ospite, deleteri per microrganismi free-living (Macfarlane *et al.*, 2007).

## Ageing

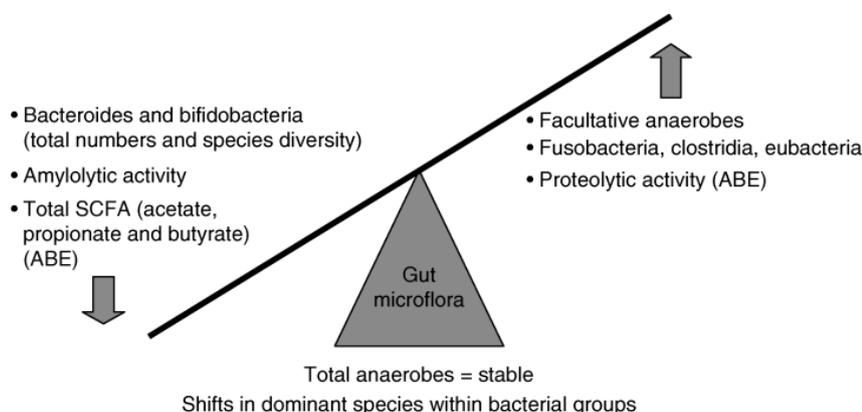
Il primo insediamento batterico nell'uomo avviene alla nascita, quando l'intestino del neonato, ancora sterile, viene colonizzato da microrganismi di origine materna o ambientale.

A differenza del microbiota intestinale adulto, la microflora neonatale risulta più variabile in composizione e meno stabile nel tempo. Nel corso del primo anno di vita, il tratto intestinale del neonato passa da una completa sterilità ad una significativa colonizzazione e, al termine di questo, mostra una miscela di microrganismi molto simile a quella presente nell'intestino adulto (Stark *et al.*, 1982). La composizione e lo sviluppo del microbiota intestinale del neonato dipendono da molti fattori, quali tipologia del parto, allattamento (al seno o artificiale), eventuali trattamenti terapeutici, livello di igiene, e background genetico, come evidenziato da studi condotti su gemelli monozigoti (Zoetendal *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2002; Favier *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2002; Fanaro *et al.*, 2003). Tuttavia, in letteratura, sono spesso riportate informazioni contrastanti. In alcuni studi, ad esempio, è riportato il dominio quasi esclusivo di *Bifidobacterium* nel microbiota di neonati allattati al seno [il che appare giustificato dalla presenza, nel latte materno, sia di oligosaccaridi naturali

(GOS) (Aggett *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2006) e peptidi bifidogenici (Liepke *et al.*, 2002) che di ceppi appartenenti ai gruppi *B. longum* e *B. animalis* (Gueimonde *et al.*, 2007)] (Stark *et al.*, 1982; Benno *et al.*, 1984; Favier *et al.*, 2002; Penders *et al.*, 2006), mentre in altri casi i bifidobatteri vengono ritrovati solo in una piccola frazione di neonati e, comunque, non risultano numericamente dominanti (Hall *et al.*, 1990; Hopkins *et al.*, 2005). Anche l'effetto della dieta sulla composizione del microbiota appare controverso, benché la maggior parte degli studi riporti una minor abbondanza di *Bifidobacterium* ed una maggior presenza di aerobi in caso di neonati nutriti con latte artificiale (Favier *et al.*, 2002; Hopkins *et al.*, 2005; Penders *et al.*, 2005). La modalità del parto e l'età gestazionale sono stati indicati come ulteriori fattori chiave capaci di modellare il microbiota neonatale. Differenze sia nel timing della colonizzazione che nella composizione sono state riportate tra bambini nati con taglio cesareo e bambini venuti alla luce con parto naturale, così come tra bambini nati prematuri e non (Hallstrom *et al.*, 2004; Penders *et al.*, 2006). Recentemente, Palmer *et al.* (2007), mediante impiego di un microarray SSU rDNA, hanno esaminato lo sviluppo del microbiota intestinale di 14 neonati sani, inclusi due gemelli dizigoti. Benché estremamente diverse ed idiosincratice nei primi mesi di vita, le comunità microbiche dei neonati sono diventate progressivamente più simili le une alle altre, fino al raggiungimento di un profilo caratteristico del tratto gastrointestinale adulto. Al termine del primo anno di vita, infatti, il microbiota intestinale dei neonati è apparso in genere caratterizzato da una preponderanza di *Bacteroides* e *Firmicutes*, dalla presenza di *Verrucomicrobia*, e da una scarsità di *Proteobacteria* e batteri aerobi Gram-negativi. L'ipotesi più accreditata è che i primissimi eventi di colonizzazione siano determinati da batteri opportunisti a cui il neonato viene esposto, generalmente provenienti dal microbiota vaginale, fecale o associato alla pelle della madre. Palmer *et al.* (2007), infatti, hanno riscontrato una significativa somiglianza tra la microflora del neonato e quella della madre, in linea con le precedenti evidenze di una trasmissione verticale dei microrganismi (Mandar e Mikelsaar, 1996; Caufield *et al.*, 2007; Linz *et al.*, 2007). Nel corso del tempo, tuttavia, il "fitness advantage" dei gruppi che tipicamente dominano il microbiota del colon adulto, prevale sul vantaggio iniziale dei primi colonizzatori [solitamente aerobi appartenenti ai generi *Staphylococcus* e *Streptococcus* o alla famiglia Enterobacteriaceae (Cooperstock e Zedd, 1983)], che probabilmente risultano meno adatti all'ambiente intestinale. La colonizzazione delle prime specie permette, inoltre, una riduzione del potenziale ossido-riduttivo a livello intestinale, ed il conseguente establishment di anaerobi stretti quali *Bacteroides* e *Clostridium* (Bezirtzoglou, 1997; Teitelbaum e Walker, 2002; Thompson-Chagoyan *et al.*, 2007). In aggiunta a questo, i progressivi cambiamenti all'interno dell'intestino, dovuti allo sviluppo intrinseco della mucosa intestinale, alla transizione ad una dieta adulta e agli effetti del microbiota stesso (Mackie *et al.*, 1999; Belenguer *et al.*, 2006; Samuel e Gordon, 2006; Sonnenburg *et al.*, 2006), potrebbero imporre una selezione ancora più stringente a favore dei batteri maggiormente adattati. Per quanto riguarda gemelli dizigoti, la significativa similarità osservata da Palmer *et al.* (2007) tra i profili temporali delle loro comunità microbiche suggerisce come il fattore ambiente rivesta un ruolo principale nel determinare le caratteristiche distintive del microbiota intestinale. A conferma e supporto di questa evidenza, uno studio precedente ha mostrato come il microbiota di famiglie di topi geneticamente equivalenti sia più simile tra membri della stessa gabbia (madre e prole condividono la medesima gabbia) che non tra differenti gabbie (Ley *et al.*, 2005).

Benché il microbiota intestinale umano sia relativamente stabile nel corso della vita adulta, cambiamenti correlati all'età nel tratto gastrointestinale, così come modifiche nella dieta e nella

reattività del sistema immune dell'ospite, inevitabilmente comportano variazioni a livello della composizione della microflora (Woodmansey, 2007). La conoscenza di queste modifiche correlate all'ageing risulta estremamente importante per il trattamento o la profilassi di malattie, e per il mantenimento di uno stato di salute nella popolazione anziana. L'incremento dei livelli soglia relativi al senso del gusto e dell'olfatto (Weiffenbach *et al.*, 1982; Doty *et al.*, 1984), il conseguente disinteresse per il cibo, la disfunzione dell'apparato masticatorio causata dalla perdita di denti e massa muscolare (Karlsson *et al.*, 1991; Newton *et al.*, 1993), e le difficoltà nel deglutire (Castell, 1988), possono portare, nella popolazione anziana, al consumo di una dieta ristretta e nutrizionalmente sbilanciata. Alle modifiche nella dieta si associano cambiamenti fisiologici a livello del tratto gastrointestinale, quali riduzione del peso fecale che si verifica con l'avanzare dell'età (Woodmansey *et al.*, 2004). Questo calo nel peso delle feci è stato correlato ad un più lento transito intestinale e ad una ridotta escrezione di materiale batterico (Stephen *et al.*, 1987). I maggiori tempi di ritenzione sono stati, a loro volta, correlati ad un incremento nella fermentazione batterica di proteine e, conseguentemente, ad un aumento nei livelli di ammonio e fenoli generati nei processi putrefattivi (Macfarlane *et al.*, 1989). Nella popolazione anziana, il conteggio medio degli anaerobi totali del microbiota intestinale rimane relativamente stabile (Woodmansey *et al.*, 2004); tuttavia, sono state riportate variazioni nella composizione dei diversi generi, accompagnate da una riduzione generale nella diversità delle specie (Fig. 5). Numerosi studi mostrano, infatti, un declino nella conta vitale e nella diversità delle specie appartenenti al genere *Bacteroides*, ed un incremento nel numero di batteri proteolitici, quali *Fusobacteria*, *Propionibacteria* e *Clostridia* (Hopkins e Macfarlane, 2002; Bartosch *et al.*, 2004; Woodmansey *et al.*, 2004). Un incremento nella conta vitale è stato riportato anche per il genere *Eubacterium* (Woodmansey *et al.*, 2004), il che potrebbe determinare una maggiore trasformazione di acidi biliari con l'ottenimento di metaboliti potenzialmente dannosi per l'ospite. Questi batteri potrebbero anche contribuire all'insorgenza dell'artrite nella popolazione anziana, come già dimostrato in ratti inoculati per via intraperitoneale con materiale cellulare proveniente da *Eubacterium aerofaciens* (Severijnen *et al.*, 1989). La forte riduzione nella diversità delle specie di bifidobatteri [uno o due microrganismi dominanti, quali *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum* o *Bifidobacterium longum* (Hopkins e Macfarlane, 2002)] potrebbe essere determinata da una ridotta adesione alla mucosa intestinale, con il risultato di una compromessa funzionalità e responsività del sistema immune ed un'incrementata suscettibilità ad infezioni gastrointestinali.



**Fig. 5.** Variazioni nella microflora intestinale della popolazione anziana. ABE, antibiotic-treated elderly.

Simili alterazioni nella composizione del microbiota fecale sono state recentemente studiate da van Tongeren *et al.* (2005) in anziani con alto Groningen Frailty Indicator (GFI). La frailty può essere generalmente definita come condizione in cui si assiste ad un progressivo calo delle risorse necessarie ad una persona per il mantenimento di un livello accettabile di funzionamento. La compromissione di fattori quali mobilità, fitness fisico, peso corporeo, vista, udito, cognizione, e risorse psicosociali, è stata associata ad una significativa riduzione nel numero di lattobacilli, *Bacteroides/Prevotella* e *Faecalibacterium prausnitzii*, ed al parallelo incremento di batteri appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae*.

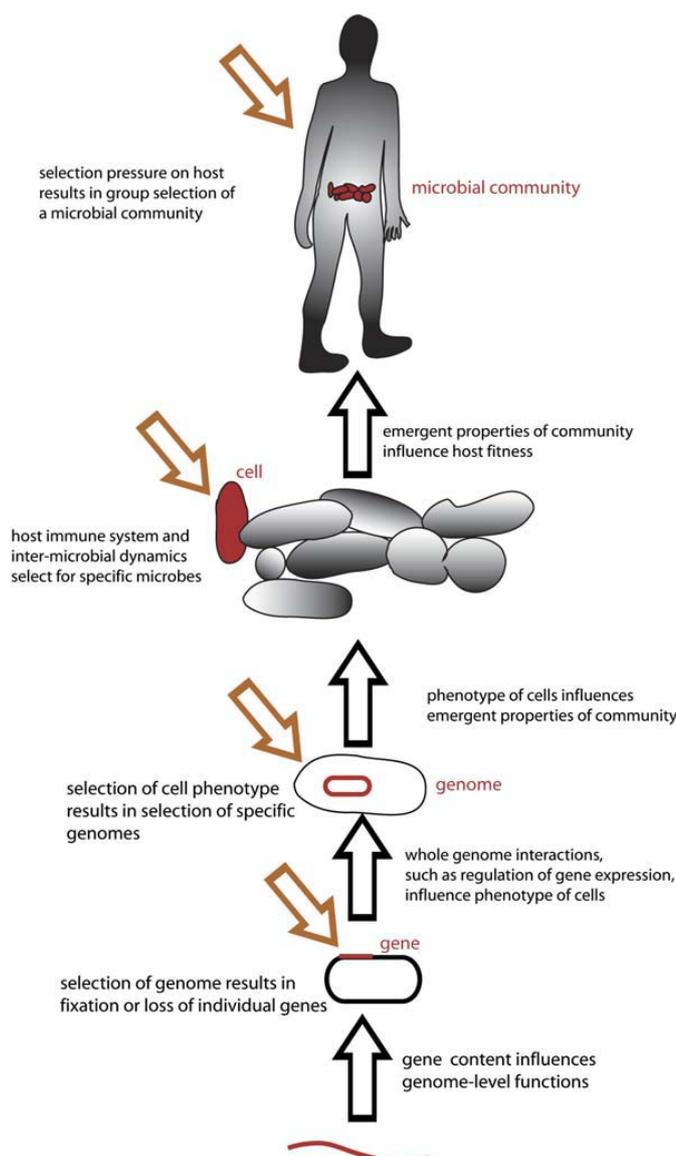
## Forze ecologiche ed evolutive che modellano la diversità microbica

La diversità microbica esistente a livello dell'intestino umano è il risultato della coevoluzione di comunità microbiche e dei loro ospiti. La struttura peculiare di questa diversità deriva da un processo di selezione naturale operante a due livelli, "top-down" e "bottom-up" (Fig. 6). Secondo i principi ecologici, la selezione che opera a livello dell'ospite (top-down) favorisce l'instaurarsi di comunità stabili con un alto grado di ridondanza funzionale ["insurance hypothesis" (Yachi e Loreau, 1999)]. Il risultato è l'ottenimento di una comunità composta da divisioni microbiche anche ampiamente divergenti ma nei cui genomi sono presenti geni che codificano per proteine con funzioni omologhe. La ridondanza funzionale permette di evitare l'instaurarsi di "keystone species", ovvero specie con un ruolo centrale nell'ecosistema, la cui perdita determinerebbe un drammatico cambiamento a livello di processi e diversità. La forza che si contrappone a questa, denominata bottom-up, costituisce, invece, una pressione selettiva che nasce dalla competizione tra membri del microbiota e favorisce una loro specializzazione funzionale (Ley *et al.*, 2006).

L'analisi della sequenza genomica completa di 3 membri appartenenti al phylum *Bacteroidetes* e ampiamente rappresentati a livello del microbiota del colon umano, ha rivelato un considerevole grado di ridondanza nelle loro capacità di degradare polisaccaridi vegetali (Xu *et al.*, 2003, 2007). Molto probabilmente, i filotipi esistenti nell'intestino umano corrispondono ad ecotipi ["habitat specialists" (Palys *et al.*, 1997; Acinas *et al.*, 2004)], caratterizzati da diversi livelli di ridondanza funzionale. Tuttavia, all'interno di una famiglia microbica, le differenti specie possono essere sia funzionalmente ridondanti ma per poter coesistere, devono suddividersi le risorse disponibili sulla base delle diverse preferenze di substrato e/o delle diverse efficienze di consumo (Sonnenburg *et al.*, 2005). Una specializzazione esclusiva a livello di nicchia può costituire una strategia alternativa, ma riduce le possibilità di una diversificazione ulteriore (Buckling *et al.*, 2003), ed aumenta il rischio che una "keystone species" venga irrimediabilmente perduta (Cohan, 2002).

Tra i fattori che influenzano la diversità microbica all'interno dell'intestino umano, l'ambiente chimico svolge sicuramente un ruolo importante. I microrganismi intestinali possono ottenere energia mediante trasferimento di elettroni da carbonio organico a (i) carbonio organico (fermentazione); (ii) carbonio inorganico (metanogenesi); (iii) solfato (riduzione del solfato). Ulteriori nicchie microbiche, quali nitrificazione e fotosintesi, non sono possibili per la mancanza di substrati e luce. A questo si aggiunge la peristalsi intestinale che limita ulteriormente il numero di nicchie microbiche disponibili. Solo gli archeobatteri sono in grado di produrre metano; la riduzione del solfato viene operata, invece, da *Desulfovibrio* spp. ( $\delta$ -*Proteobacteria*) e *Desulfotomata* spp. (*Firmicutes*). La fermentazione rappresenta il principale pathway energetico per *Bacteroidetes* e

*Firmicutes*, e di conseguenza il pathway energetico dominante all'interno del microbiota intestinale. In linea di principio, i microrganismi di una qualsiasi divisione filogenetica potrebbero acquisire, mediante horizontal gene transfer (HGT), i geni necessari alla sopravvivenza, ma la dominanza di *Firmicutes* e *Bacteroidetes* mostra come questa acquisizione sia stata limitata solo ai membri di poche divisioni filogenetiche. Comunque, le note differenze nel contenuto G+C esistenti tra microrganismi appartenenti a queste due divisioni, evidenzia come l'HGT non abbia omogeneizzato i loro genomi. La codominanza di questi phylum sembra, quindi, trarre origine dai ruoli metabolici distinti ma complementari all'interno della comunità. Del resto, i loro ruoli coevoluti e cooperativi sono codificati da un repertorio genomico troppo vasto ed eclettico per poter essere acquisito mediante un processo stocastico quale l'HGT (Ley *et al.*, 2006).



**Fig. 6.** Processi di selezione naturale che modellano la diversità microbica (Ley *et al.*, 2006).

Le frecce di color marrone indicano pressioni selettive e sono dirette verso l'unità sottoposta a selezione (mostrata in rosso). Le frecce nere indicano proprietà emergenti ad un livello che influenzano i livelli superiori nella gerarchia. In base alla "hierarchy theory", i livelli più alti determinano costrizioni sulle possibilità organizzative dei livelli inferiori. I principi ecologici predicono una selezione "top-down" guidata dall'ospite, che risulta in una comunità composta da divisioni microbiche ampiamente divergenti ma i cui genomi contengono suite di geni altamente simili (ridondanza funzionale). Un'ulteriore predizione è rappresentata dall'alta frequenza e dai numerosi meccanismi di lateral gene transfer. Al contrario, la competizione tra membri del microbiota esercita una pressione selettiva "bottom-up" con il risultato di genomi specializzati, caratterizzati da suite di geni funzionalmente differenti (tratti metabolici). Una volta instaurati, i tratti specifici possono essere conservati mediante opposizione alla ricombinazione omologa (Majewski *et al.*, 2000).

La cooperazione e/o la suddivisione delle risorse rappresenta una strategia alternativa che consente di evitare una competizione testa a testa per risorse limitanti. In base agli insegnamenti della teoria ecologica, questa competizione comporterebbe l'esclusione del perdente (Putman, 1994). All'interno dell'intestino umano, si vengono, invece, ad instaurare network in cui i prodotti di un microrganismo diventano substrati per la crescita di un altro, e la rimozione dei prodotti di

scarto del secondo incrementano la resa termodinamica del primo (Thauer *et al.*, 1977). Questi network chimici hanno il potenziale di essere incredibilmente complessi ma soprattutto variabili in base alle disponibilità di substrato e ai gradienti termodinamici.

Per quanto riguarda le forze evolutive che modellano forma e struttura dei genomi batterici, duplicazione genica, HGT, perdita di geni ed eventuali riarrangiamenti cromosomici rappresentano i principali eventi genetici responsabili dell'evoluzione e delle dinamiche dei genomi. Inizialmente l'ipotesi più accreditata era che i genomi batterici si fossero evoluti a partire da un genoma ancestrale di dimensioni decisamente inferiori, attraverso numerosi eventi di duplicazione genica con la conseguente generazione di paraloghi (Kunisawa, 1995). Successivamente, un'analisi basata sulle sequenze genomiche attualmente disponibili, ha mostrato come la duplicazione genica contribuisca solo in minima parte all'evoluzione genomica (Coenye *et al.*, 2005). Comunque, è stato osservato come geni coinvolti in una specifica situazione di adattamento siano stati preservati dopo la duplicazione, suggerendo quindi il ruolo evolutivo di questo evento genetico.

L'introduzione di geni estranei mediante HGT consente un rapido adattamento a specifiche nicchie, il che, a sua volta, potrebbe determinare diversificazione e speciazione batterica (Cohan, 2001). L'evoluzione dei genomi dei microrganismi si basa, infatti, sull'outcome combinato di geni acquisiti verticalmente, mediante divisione cellulare, ma anche orizzontalmente mediante HGT (Woese, 2000). In particolare, l'HGT è ritenuto responsabile dell'incremento di competitività dei batteri nel loro habitat naturale. Ad esempio, in alcuni batteri patogeni, sembra che le isole di patogenicità, ovvero segmenti di DNA contenenti cluster di geni virulenti, siano proprio state acquisite mediante HGT (Ochman *et al.*, 2000). L'analisi delle divergenze nel contenuto G+C, delle differenze dinucleotidiche, delle four-letter genomic signatures e/o dell'utilizzo dei codoni, mostra come la frequenza dell'HGT sia generalmente bassa (inferiore al 10% del complemento genico totale) (Snell *et al.*, 2002; Kunitz e Ouzounis, 2003). Tuttavia, una recente analisi metagenomica comparativa condotta da Kurokawa *et al.* (2007), ha evidenziato la sovraespressione nel microbioma intestinale adulto di elementi genetici mobili e trasposoni coniugativi, il che suggerisce come l'intestino possa rappresentare, invece, un "hot spot" per l'HGT tra microrganismi.

Duplicazione genica ed HGT, accoppiati a vantaggi adattativi, sono fattori responsabili dell'incremento nelle dimensioni dei genomi batterici (Mira *et al.*, 2001). Forze contrastanti sono rappresentate da delezioni e dalla deriva genetica, che tendono, invece, a contrarre i genomi. La perdita di DNA può comportare delezioni di uno o pochi nucleotidi così come la delezione di loci multipli (Andersson e Andersson, 2001). Mutazioni deleterie ma che inattivano geni che contribuiscono solo parzialmente al fitness, possono essere trasmesse alla progenie ed accumularsi nella popolazione, portando eventualmente alla perdita del gene; mutazioni in geni critici per la sopravvivenza sono, invece, eliminate dalla popolazione per evitare la perdita del gene funzionale (Ochman e Davalos, 2006). L'inattivazione genica e la conseguente perdita del gene sono eventi genetici particolarmente attivi in diversi gruppi batterici caratterizzati da uno stile di vita associato ad un ospite (simbiosi), situazione in cui l'ospite fornisce molti dei metaboliti intermedi necessari al microrganismo, eliminando quindi la necessità di conservare determinati geni biosintetici (Takano *et al.*, 2003; McLeod *et al.*, 2004). Un chiaro esempio di degradazione genomica è fornito da *Mycobacterium leprae*, nel cui genoma sono assenti più di 1000 geni se confrontato con *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 2001). Inoltre, la presenza di diversi geni non funzionali, pseudogeni, indica come la contrazione del genoma di *M. leprae* sia ancora in progress. Generalmente, gli pseudogeni includono casi in cui uno stop codon o una delezione risultano in una

proteina che non raggiunge l'80% della lunghezza della sua controparte funzionale, oppure casi in cui un frameshift o un'inserzione alterano più del 20% della sequenza amminoacidica della proteina (Lerat e Ochman, 2004). La maggior parte degli pseudogeni annotati sino ad ora nei genomi batterici corrispondono ad open reading frame (ORF) con funzioni sconosciute. La mancanza di pseudogeni conservati e condivisi da ceppi appartenenti alla stessa specie, suggerisce come questi geni non funzionali siano eliminati rapidamente dai genomi batterici (Ochman e Davalos, 2006).

A differenza dei fattori precedenti che modificano il contenuto genico, i riarrangiamenti cromosomici alterano l'organizzazione del genoma. Si tratta di eventi genetici che dipendono in larga misura dalla presenza ed attività di elementi mobili e ripetuti, quali sequenze di inserzione, trasposoni, sequenze profagiche e plasmidi (Kolsto, 1997). Genomi batterici contenenti alte densità di questi elementi mostrano maggiori frequenze di riarrangiamento ed un'accelerata perdita di ordine genico (Rocha, 2003). Eventi di ricombinazione omologa tra sequenze ripetute catalizzano sia il riarrangiamento che la perdita di geni con conseguente diversificazione dei taxa. L'evoluzione cromosomica risulta influenzata anche da grandi riarrangiamenti cromosomici, quali inversioni centrate attorno all'origine di replicazione, che determinano il manifestarsi di pattern X-shaped nell'allineamento di genomi (Eisen *et al.*, 2000).

Un ruolo significativo nel modellare la diversità microbica intestinale è svolto, infine, dal sistema immune, che rappresenta la prima linea di contatto tra ospite e microbiota. Tuttavia, la ridondanza funzionale e la variazione a livello di ceppi potrebbero rendere una risposta immune specie-specifica inefficace nel sopprimere una determinata attività microbica. Diverse osservazioni suggeriscono, infatti, come il sistema immune risponda ad intere suite di batteri. Ad esempio, cellule T clonate da pazienti affetti da IBD rispondono a specie batteriche multiple e divergenti (Duchmann *et al.*, 1999); i Toll-like receptor riconoscono ligandi prodotti da una varietà di microrganismi (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004), ed il polisaccaride capsulare A di *Bacteroides fragilis* può stimolare una frazione sorprendentemente vasta di cellule T sia nel topo che nell'uomo (Cobb *et al.*, 2004; Mazmanian *et al.*, 2005). Piuttosto che eliminare una singola specie, il sistema immune dell'ospite sembra quindi essere in grado di modulare l'abbondanza relativa di gruppi microbici che condividono caratteristiche funzionali e/o strutturali.

## **Principali contributi funzionali**

Numerosissime sono le funzioni attribuite alla microflora intestinale. Gli effetti che essa ha sull'ospite sono il risultato delle interazioni tra batteri, epitelio ed altre cellule umane, quali cellule del sistema immunitario e neuroni enterici (Drasar e Hill, 1974; Hooper *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2005).

### **Attività metaboliche**

La principale funzione metabolica svolta dal microbiota intestinale è costituita dalla fermentazione di residui della dieta non digeribili e/o di muco endogeno prodotto dall'epitelio. Il muco dell'ospite, infatti, oltre a fornire protezione contro l'adesione e l'invasione di microrganismi patogeni, costituisce una riserva consistente di glicani, mucina, glicosfingolipidi, acido ialuronico

ed eparina (Hooper *et al.*, 2002), e permette, quindi, di mitigare gli effetti relativi a drastici cambiamenti nella disponibilità di polisaccaridi della dieta (Bäckhed *et al.*, 2005).

La diversità genica esistente nella comunità microbica garantisce la presenza di numerosi enzimi e pathway biochimici diversi da quelli costitutivi dell'ospite. Nell'uomo e nel topo, l'analisi metagenomica del microbioma intestinale, ed il confronto tra diversi ecosistemi microbici, ha evidenziato, infatti, l'arricchimento in geni appartenenti alle categorie e pathway KEGG [Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa *et al.*, 2004)] relativi a metabolismo di carboidrati e glicani (Tringe *et al.*, 2005; Turnbaugh *et al.*, 2007). *B. longum* e *Bacteroides thetaiotaomicron* dedicano circa l'8% del loro genoma a funzioni di trasporto e metabolismo di carboidrati (Schell *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). In particolare, il glicobioma altamente evoluto di *B. thetaiotaomicron* contiene il maggiore set di geni, coinvolti nell'acquisizione e metabolismo di carboidrati, fino ad ora riportato per un batterio di cui sia stato sequenziato l'intero genoma: 163 paraloghi di 2 proteine della membrana esterna (SusC e SusD), che legano e trasportano amido (Shipman *et al.*, 2000), 236 putative idrolasi glicosidiche, e 15 liasi polisaccaridiche (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>). Al contrario, il genoma umano da 2.85 Gb contiene solamente 98 note o putative idrolasi glicosidiche, e manca delle attività enzimatiche necessarie per la degradazione di polisaccaridi contenenti xilani, pectine e arabinosio, componenti comuni delle fibre assunte con la dieta.

Il risultato finale delle attività metaboliche del microbiota è il recupero di energia e di substrati assorbibili per l'ospite, ed il rifornimento di energia e prodotti nutritivi per la crescita e la proliferazione dei batteri. A livello di colon, la maggior fonte di energia è la fermentazione di carboidrati non digeribili, quali polisaccaridi (amido, cellulosa, emicellulosa, inulina, pectine e gomme), oligosaccaridi, ed alcoli (Cummings *et al.*, 1987a, 1996), con la conseguente generazione di acidi grassi a corta catena (SCFA), e gas, quali H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. L'accumulo di H<sub>2</sub> riduce l'efficienza del processing di polisaccaridi, ma la generazione di metano ad opera di archeobatteri metanogeni rimuove l'idrogeno prodotto e permette di incrementare le rese di fermentazione (Stams, 1994). Anche il metabolismo anaerobico di peptidi e proteine (putrefazione) ad opera della microflora intestinale, determina la produzione di SCFA ma, allo stesso tempo, comporta la generazione di una serie di substrati potenzialmente tossici, quali ammonio, ammine, fenoli, tioli e indoli (Macfarlane *et al.*, 1986; Smith e Macfarlane, 1996). Le fonti proteiche disponibili includono elastina e collagene provenienti da fonti alimentari, enzimi pancreatici, cellule epiteliali morte e batteri lisati (Salminen *et al.*, 1998). La disponibilità giornaliera di substrati nel colon umano adulto è di circa 20-60 g di carboidrati e 5-20 g di proteine (Cummings e Englyst, 1987; Silvester *et al.*, 1995); la produzione giornaliera di SCFA si aggira sui 400 mM (Cummings, 1994). A livello di cieco e colon ascendente, una fermentazione saccarolitica intensa determina una produzione consistente di SCFA e si accompagna a valori acidi di pH (5-6) e ad una rapida crescita batterica (Cummings *et al.*, 1987a; Macfarlane *et al.*, 1992; Fallingborg, 1999). Al contrario, la disponibilità di substrato diminuisce nel colon discendente, il pH si avvicina alla neutralità, i processi putrefattivi diventano quantitativamente più importanti e le popolazioni batteriche appaiono statiche.

Gli SCFA svolgono un'importante funzione a livello della fisiologia dell'ospite. In particolare, il butirrato rappresenta la principale sorgente energetica delle cellule epiteliali del colon (circa il 70% dell'intake energetico), che lo consumano quasi interamente (Cummings *et al.*, 1987a). Acetato e propionato, invece, sono in grado di modulare il metabolismo del glucosio; il loro assorbimento determina una minore risposta glicemica dopo ingestione di glucosio orale o di un pasto standard (Venter *et al.*, 1990; Brighenti *et al.*, 1995). Un basso indice glicemico è stato,

infatti, riportato per numerosi cibi caratterizzati da alte percentuali di carboidrati non digeribili (Thorburn *et al.*, 1993; Englyst *et al.*, 1999). Acido valerico ed acidi grassi a catena ramificata, quali isobutirrico e isovalerico, si formano in quantità minore durante il catabolismo degli amminoacidi ramificati valina, leucina e isoleucina (Macfarlane e Macfarlane, 2003). Gli SCFA vengono assorbiti a livello dell'intestino umano principalmente mediante diffusione passiva dell'acido protonato, ma è attivo anche un meccanismo di uptake cellulare mediante co-trasporto di ioni  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  (Fleming *et al.*, 1991).

I microrganismi del colon esercitano un ruolo fondamentale anche nella sintesi di vitamine, quali B12 e K (Conly *et al.*, 1994; Hill, 1997), e nell'assorbimento di ioni calcio, magnesio e ferro (Roberfroid *et al.*, 1995; Miyazawa *et al.*, 1996; Younes *et al.*, 2001).

Al microbiota intestinale sono state, inoltre, attribuite (i) funzioni bioremediation-like, quale la detossificazione di carcinogeni, il che potrebbe modulare la suscettibilità dell'ospite a differenti tipi di neoplasma, sia all'interno che all'esterno dell'intestino (Reiners *et al.*, 1999); (ii) la degradazione dell'ossalato, i cui livelli sono stati correlati alla predisposizione allo sviluppo di calcoli renali (Sidhu *et al.*, 2001); (iii) la modificazione degli acidi biliari con conseguenti alterazioni del metabolismo lipidico dell'ospite (Martin *et al.*, 2007a).

Sulla base delle funzioni metaboliche esercitate dalla microflora intestinale, appare evidente come il valore nutritivo e/o energetico del cibo non sia, quindi, un valore assoluto ma largamente influenzato dalle capacità digestive del microbiota del singolo individuo (Bäckhed *et al.*, 2004, 2007; Gill *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007a). Evidenti sono le implicazioni che porteranno all'identificazione di soggetti a rischio malnutrizione od obesità, ed al trattamento di tali individui sulla base di una dieta personalizzata che tenga in considerazione l'ecologia microbica dell'intestino. Studi condotti su animali germ-free hanno, infatti, mostrato come il microbiota intestinale sia in grado di incrementare l'assorbimento di monosaccaridi con conseguente induzione di lipogenesi epatica (Bäckhed *et al.*, 2004). Inoltre, il deposito stesso di lipidi a livello di adipociti risulta favorito dalla soppressione, mediata dal microbiota, del fasting-induced adipocyte factor (Fiaf), inibitore di una lipasi lipoproteica coinvolta, come fattore limitante, nei processi di import e conservazione negli adipociti di acidi grassi derivati da trigliceridi. In individui obesi, il microbiota intestinale ha, quindi, un'incrementata e trasmissibile capacità di promuovere il deposito di grassi ed estrarre una maggiore quantità di energia dalla dieta. L'analisi delle sequenze del gene 16S rRNA ottenute da campioni di feci umane e dell'intestino crasso di topi obesi e non, ha mostrato una significativa alterazione nella composizione del microbiota, con una riduzione del 50% nel numero di *Bacteroidetes* ed un corrispondente incremento nel phylum *Firmicutes* in condizioni di obesità (Ley *et al.*, 2005, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2006). Questa profonda modulazione della microflora intestinale è stata associata ad un aumento significativo nei livelli di polisaccaridi sierici con conseguente secrezione di citochine proinfiammatorie, ad un incremento del peso corporeo e della massa grassa, all'accumulo di trigliceridi epatici, e all'insorgenza del diabete di tipo 2 (Dumas *et al.*, 2006; Cani *et al.*, 2007). In particolare, in uno studio recente, Martin *et al.* (2007a) hanno evidenziato come il microbiota intestinale sia in grado di modulare il metabolismo lipidico dell'ospite mediante (i) modificazione del pattern metabolico degli acidi biliari; (ii) effetto diretto sull'emulsificazione ed assorbimento lipidico, ed effetto indiretto (iii) sulla conservazione degli acidi grassi nel fegato, e (iv) sui processi di lipoperossidazione.

La modulazione dei livelli sierici di lipidi ad opera del microbiota intestinale, ha suscitato un notevole interesse in relazione alla possibile eziologia di malattie cardiovascolari (Pereira e Gibson,

2002). A ceppi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sono stati attribuiti effetti di diminuzione dei livelli di colesterolo e di protezione contro l'ossidazione di VLDL e LDL (Terahara *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2003).

## Funzioni trofiche

L'effetto trofico esercitato sull'epitelio intestinale rappresenta un ruolo fondamentale degli SCFA nella fisiologia del colon. Tutti e 3 i maggiori SCFA (acetato, propionato e butirrato) stimolano *in vivo* la proliferazione e la differenziazione delle cellule epiteliali a livello di intestino tenue e crasso (Frankel *et al.*, 1994). In particolare, *in vitro*, il butirrato è in grado di inibire la proliferazione cellulare e di stimolare la differenziazione di linee cellulari epiteliali di origine neoplastica (Siavoshian *et al.*, 2000), e promuovere la reversione di cellule neoplastiche ad un fenotipo non tumorale (Gibson *et al.*, 1992). Tan *et al.* (2002) hanno evidenziato, mediante functional proteomics, come il trattamento di HT-29 con butirrato sia associato ad inibizione della crescita ed apoptosi, con alterazioni nei pattern proteomici, quali riduzione nell'espressione di componenti del sistema ubiquitina-proteasoma, ed upregolazione di proteine sia pro- (caspasi 4 e catepsina D) che anti-apoptotiche (hsp27, proteina antiossidante 2 e piruvato deidrogenasi E1).

La microflora esercita un ruolo importante anche sullo sviluppo del sistema immunitario mucosale, sia in termini di componenti fisiche che di funzione. La mucosa intestinale rappresenta la principale superficie di contatto tra il sistema immunitario e l'ambiente esterno; a questo livello, l'interazione tra ospite e batteri promuove lo sviluppo di un sistema immune competente (Guarner e Malagelada, 2003). Infatti, immediatamente dopo l'esposizione a batteri luminali, si osserva un drastico aumento nel numero di linfociti intraepiteliali (Umesaki *et al.*, 1993; Helgeland *et al.*, 1996), lo sviluppo a livello di follicoli e lamina propria, dei centri germinali contenenti le cellule produttrici di immunoglobuline (Cebra *et al.*, 1998), ed un significativo incremento nella concentrazione di immunoglobuline sieriche (Butler *et al.*, 2000).

Nelle prime settimane di vita, l'interazione tra tessuto linfoide associato all'intestino e microbiota sembra essere cruciale nel determinare un appropriato sviluppo dei complessi circuiti immunoregolatori sia a livello mucosale che sistemico. Dopo somministrazione orale di ovoalbumina, topi germ-free mantengono una risposta immune Th2 e producono anticorpi IgE diretti contro l'ovoalbumina stessa. Tali anomalie possono essere corrette mediante ricostituzione di una flora convenzionale anche se questa procedura risulta efficace solo in neonati e non in topi più anziani (Sudo *et al.*, 1997). Negli adulti, l'immunità viene costantemente rimodellata dalla interazione persistente tra ospite e batteri intestinali. La diversificazione degli antigeni di superficie sembra consentire ai microrganismi di eludere l'immunosorveglianza al fine di conservare la propria nicchia ecologica nel tratto intestinale. Ad esempio, *B. fragilis*, specie predominante a livello del colon umano, è in grado di modificare la sua antigenicità di superficie mediante produzione di differenti polisaccaridi capsulari (Krinov *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2007). D'altro canto, le difese dell'ospite si adattano a tali modifiche per riuscire a mantenere un controllo attivo sulla crescita batterica (Guarner e Malagelada, 2003).

La risposta immunitaria nei confronti dei microrganismi si basa su componenti innate ed adattive, come la secrezione di immunoglobuline. La maggior parte dei batteri presenti nelle feci umane risulta, infatti, ricoperta e avvolta da specifiche IgA (Van der Waaij *et al.*, 1996). Le risposte adattative di IgA secretorie nei confronti del microbiota intestinale consentono, presumibilmente,

all'ospite di rispondere a fluttuazioni nei batteri commensali senza l'induzione di una risposta deleteria ma contribuendo all'omeostasi mucosale (Macpherson e Uhr, 2004). Le risposte innate sono mediate non solo da leucociti, quali neutrofilo e macrofagi il cui compito è fagocitare ed eliminare i patogeni, ma anche dalle cellule epiteliali intestinali, che coordinano le risposte dell'ospite mediante sintesi di un'ampia gamma di mediatori infiammatori e trasmissione di segnali alle sottostanti cellule della mucosa (Kagnoff e Eckmann, 1997). L'utilizzo di un ristretto numero di recettori (quali Toll-like receptor), che riconoscono motivi batterici conservati assenti negli eucarioti superiori, rende il sistema di immunità innata in grado di discriminare tra potenziali patogeni e batteri commensali (Aderem e Ulevitch, 2000).

Il microbiota intestinale è implicato anche nei meccanismi di tolleranza orale. La risposta sistemica ad uno specifico antigene può essere soppressa dopo ingestione dello stesso antigene. Questo meccanismo permette di evitare risposte eccessive, come quelle riscontrate in caso di allergie o malattie autoimmuni (Bjorksten *et al.*, 2001; Jewell, 2005).

L'interazione tra microbiota intestinale e cellule immuni è in grado di modificare i processi di rinnovo delle cellule epiteliali. Gli effetti possono variare dalla capacità di riparare una barriera mucosale danneggiata (Pull *et al.*, 2005) ad una maggiore suscettibilità a trasformazioni neoplastiche (Chu *et al.*, 2004).

Mediante interazione con le cellule epiteliali dell'intestino umano, la colonizzazione microbica di superfici mucosali è anche in grado di regolare la sottostante microvascolarizzazione (Stappenbeck *et al.*, 2002).

Studi condotti su animali germ-free hanno evidenziato lo sviluppo di un cuore di dimensioni inferiori a parità di peso corporeo, rispetto alle loro controparti colonizzate (Wostmann *et al.*, 1982). I precisi meccanismi molecolari alla base di questo fenotipo non sono ancora stati definiti, ma tale scoperta enfatizza la necessità di comprendere come e quanto la fisiologia umana risulti modulata dal microbioma.

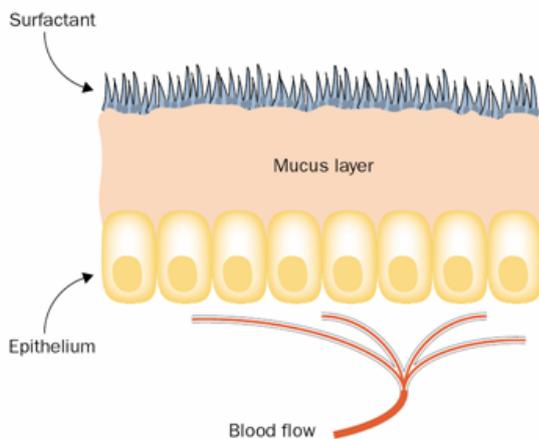
## Funzioni protettive

Oltre alla funzione protettiva svolta dalla barriera mucosale che separa il milieu interno dall'ambiente luminale (Fig. 7), una cruciale linea di resistenza alla colonizzazione da parte di microrganismi esogeni è rappresentata dal microbiota intestinale. Animali germ-free, infatti, risultano più sensibili alle infezioni (Baba *et al.*, 1991; Taguchi *et al.*, 2002). Diversi sono i meccanismi implicati nell'effetto barriera. *In vitro*, i batteri competono per siti d'attacco a livello dell'orlo a spazzola delle cellule dell'epitelio intestinale. Batteri aderenti non patogeni possono, quindi, prevenire l'attacco ed impedire la successiva penetrazione di microrganismi enteroinvasivi (Bernet *et al.*, 1994). Un ulteriore fattore di competizione è costituito dalla disponibilità di nutrienti nelle nicchie ecologiche e dall'affinità per i nutrienti stessi, il che può favorire una maggiore velocità di sviluppo. Infine, i batteri possono inibire la crescita di eventuali competitori mediante produzione di sostanze antimicrobiche, le batteriocine (Brook, 1999; Lievin *et al.*, 2000). L'ospite può controllare la produzione di tali sostanze, poiché la maggior parte di esse sono proteine, degradabili da proteasi digestive.

Il microbiota intestinale è paragonabile, quindi, ad un efficiente e stabile bioreattore naturale (Sonnenburg *et al.*, 2004), che oppone resistenza all'insorgenza di subpopolazioni patologiche che potrebbero danneggiare ma soprattutto ridurre significativamente il fitness dell'ospite (Bäckhed *et*

*al.*, 2005). Nella visione classica di specie enteropatogena, il patogeno è una sorta di “imbrogliatore” che trae beneficio dalle dinamiche del microbiota intestinale imponendo all’ospite ed alla comunità stessa un costo in fitness (Lederberg, 2000). Piuttosto che competere con specie mutualistiche, il patogeno può avvalersi di un’alta dose infettiva, di organelli specializzati per l’attacco e/o l’invasione, e/o di enterotossine per indurre secrezione d’acqua al fine di riuscire a penetrare e creare un habitat che non sia occupato da membri del normale microbiota (Nataro e Kaper, 1998).

Recentemente, Ley *et al.* (2006) hanno evidenziato come, all’interno dell’intestino, esista anche un altro tipo di patogenicità, in cui l’intera comunità microbica risulta patogena, e rappresenta un fattore di rischio ambientale che può contribuire all’insorgenza di disordini. E’, comunque, la concomitante presenza di altri fattori di rischio, quali genotipo dell’ospite, dieta e comportamento che determina o meno la patogenicità di una comunità microbica.



**Fig. 7.** Barriera mucosale.

La barriera mucosale separa il milieu interno dall’ambiente luminale. La funzione barriera dipende dall’integrità della mucosa e dalla reattività di fattori dinamici di difesa, quali flusso sanguigno mucosale, secrezioni epiteliali, e cellule immunocompetenti. Il layer di muco è formato dall’interazione tra varie secrezioni mucosali, comprese glicoproteine della mucina, peptidi trefoil, e fosfolipidi surfattanti.

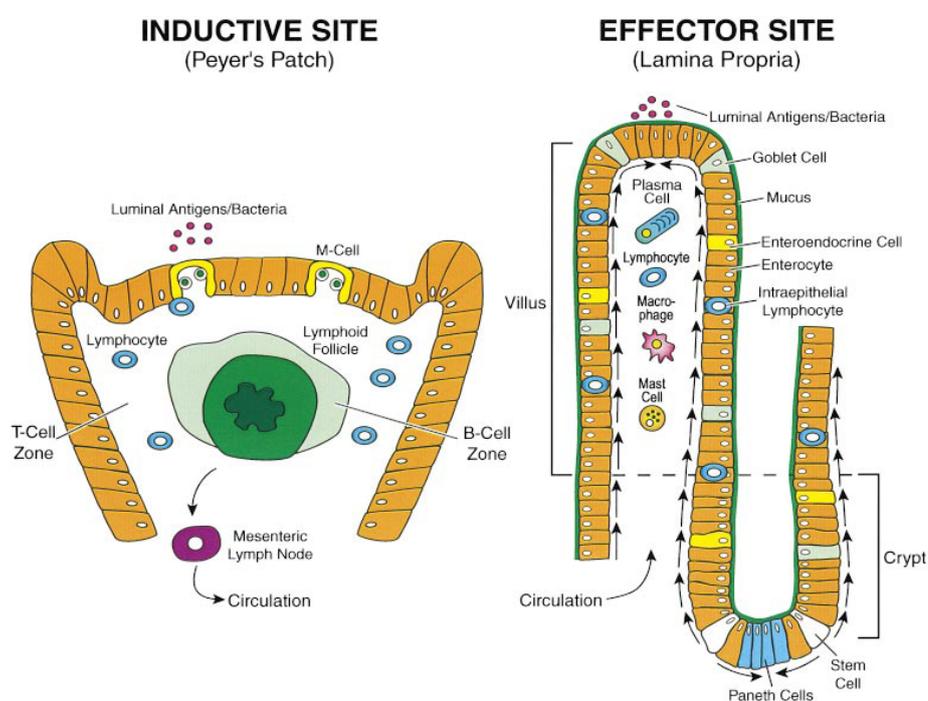
In un recente studio, è stato ipotizzato un ulteriore contributo funzionale del microbiota intestinale nei confronti dell’ospite. Bäckhed *et al.* (2007) hanno, infatti, scoperto come topi germ-free siano dotati di una attività locomotoria maggiore rispetto alle loro controparti colonizzate. Tuttavia, resta ancora da definire se il microbiota intestinale sia effettivamente in grado di influenzare anche il comportamento umano, e se vi sia una alterata produzione di composti attivi a livello neurologico (mediante modificazione diretta da parte del microbiota o indiretta, tramite modulazione dell’espressione di geni coinvolti nella biosintesi e/o metabolismo di questi composti) associata a disordini psichiatrici e/o nello sviluppo del sistema nervoso.

## Interazioni molecolari tra batteri, epitelio e sistema immune mucosale

Subito dopo la nascita, le superfici epiteliali del nostro corpo vengono in contatto con miriadi di microrganismi. A differenza della pelle, protetta meccanicamente da diversi strati epiteliali, le superfici del tratto gastrointestinale, così come quelle del tratto respiratorio ed urogenitale, sono principalmente coperte da un singolo layer epiteliale e necessitano, quindi, di una maggiore protezione, garantita da un complesso di agenti meccanici e chimici responsabili della degradazione e rimozione di sostanze eterogenee. In aggiunta a queste difese, sia la mucosa che l’ambiente interno del nostro organismo sono protetti da un sistema immune altamente specifico ed efficace.

Il sistema immune mucosale del tratto gastrointestinale consiste di siti altamente strutturati per l’inizio della risposta immune, e di cellule effettrici diffuse a livello di lamina propria ed epitelio intestinale (Fig. 8). Gli antigeni vengono sequestrati nel tessuto linfoide associato all’intestino

(GALT, gut-associated lymphatic tissue, il maggior organo linfatico del corpo umano con il più ampio pool di cellule immunocompetenti; cellule M e placche del Peyer), noduli linfoidei e follicoli isolati, a livello dell'intestino tenue e crasso. Questi tessuti linfoidei secondari, altamente organizzati, rappresentano i siti d'induzione del sistema immune mucosale e scatenano le risposte effettrici antigene-specifiche. Popolazioni di cellule B e T attivate migrano dai siti induttori ai linfonodi mesenterici, attraverso il drenaggio linfatico, entrano nel circolo sanguigno e raggiungono i siti mucosali effettrici. I siti effettrici includono linfociti B e T specifici per l'antigene, plasmacellule differenziate, macrofagi, e cellule dendritiche, così come eosinofili, basofili e mast cells. La collaborazione tra siti induttori ed effettrici del sistema immune mucosale determina una risposta anticorpale mucosale e sierica, l'immunità mediata da cellule T, e produce mediatori locali immunostimolatori o soppressivi ed anergia sistemica (Mowat, 2003; Macpherson e Harris, 2004).



**Fig. 8.** Sistema immunitario mucosale.

L'ecosistema gastrointestinale consiste di una popolazione di stem cell epiteliali a rapido rinnovo, capaci di differenziare in diversi tipi cellulari (goblet cell, cellule enteroendocrine, enterociti, Paneth cell e cellule M). Queste cellule epiteliali fungono da barriera tra contenuto luminale (antigeni alimentari e microbiota residente) e sistema immunitario mucosale. Tale sistema può essere suddiviso, funzionalmente e fisicamente, in siti induttori (placche del Peyer) e siti effettrici (lamina propria). Gli antigeni, prelevati dalle cellule M che sovrastano le placche del Peyer, portano all'attivazione di linfociti antigene-specifici. I linfociti attivati migrano verso i linfonodi mesenterici ed eventualmente rientrano in circolo attraverso il dotto toracico. Le cellule effettrici migranti esprimono mucosal-specific homing receptor che consentono il loro homing nei siti effettrici intestinali quali lamina propria.

Le funzioni base del sistema immunitario mucosale comprendono protezione contro microrganismi patogeni e prevenzione della penetrazione di componenti immunogenici dalle superfici mucosali verso l'ambiente interno del nostro organismo (funzione barriera ed anti-infezione). Un'altra funzione fondamentale è costituita dall'induzione di una non responsività dell'immunità sistemica nei confronti di antigeni presenti sulle superfici mucosali (tolleranza orale, mucosale), unitamente al mantenimento dell'omeostasi a livello di queste superfici (funzione immunoregolatoria) (Mestecky *et al.*, 1995; Ogra *et al.*, 1999). Il sistema immunitario mucosale ha, infatti, sviluppato specifici

meccanismi regolatori e anti-infiammatori per poter tollerare antigeni non pericolosi, derivanti dal cibo, introdotti con la respirazione, oppure originati dai microrganismi commensali.

L'esistenza di specifici meccanismi di immunità innata che assicurano un'appropriata funzione della barriera mucosale, la presenza di popolazioni di linfociti che differiscono dalle loro controparti del sangue in origine, fenotipo e prodotti secreti, e la migrazione e l'homing sulle superfici mucosali e ghiandole esocrine di cellule che originano da follicoli linfatici dell'intestino, costituiscono caratteristiche base dell'immunità mucosale e la differenziano da quella sistemica. Un'ulteriore peculiarità è rappresentata dal trasporto attraverso le cellule epiteliale nelle secrezioni, di immunoglobuline polimeriche prodotte da plasmacellule mucosali (immunoglobuline secretorie appartenenti all'isotipo IgA) (Ogra *et al.*, 1999).

Le IgA costituiscono uno dei più importanti fattori umorali di difesa a livello delle superfici mucosali, e sono principalmente dirette contro il microbiota. La quantità totale di cellule che producono IgA nell'intestino ( $7 \times 10^{11}$ ), e la produzione intestinale giornaliera di queste immunoglobuline (2-5 g, fino a 40 mg/kg/giorno), indicano come le IgA siano la classe più rappresentata di immunoglobuline in tutto il corpo umano. La struttura molecolare delle IgA polimeriche permette a queste molecole di penetrare nelle secrezioni, di resistere alle attività enzimatiche e di funzionare come effettori sulle superfici mucosali (Bos *et al.*, 2000; Macpherson *et al.*, 2000; Fagarasan e Honjo, 2003). Le IgA secretorie, in forma di dimeri, resistono alla proteolisi e contribuiscono a prevenire sia l'adesione di batteri alle superfici mucosali che la penetrazione di antigeni all'interno dell'organismo. Inoltre, le IgA sono in grado di reagire con diverse sostanze battericide non specifiche presenti nelle secrezioni (ad esempio lattoperossidasi e lattoferrina), e di trasportarle sulla superficie dei microrganismi (Fagarasan e Honjo, 2003). Le IgA secretorie sono molecole con proprietà relativamente anti-infiammatorie, in quanto non attivano il complemento e prevengono, quindi, un'eccessiva risposta infiammatoria nei confronti di antigeni ubiquitari sia microbici che della dieta. La produzione di IgA dipende da complessi meccanismi che coinvolgono campionamento antigenico da parte delle cellule M (Neutra, 1999), processing ad opera di antigen-presenting cell (Kelsall e Strober, 1997), attivazione delle cellule T (Lycke, 1998), e switch di cellule B nelle placche del Peyer e nell'adiacente lamina propria (Brandtzaeg *et al.*, 1999). Benché non siano ancora stati chiariti i precisi meccanismi molecolari né l'esatta funzione fisiologica, le citochine IL-4, TGF- $\beta$ , IL-5, IL-6, e IL-10 sono richieste per lo switch e produzione di IgA così come per il mantenimento della tolleranza, il che sembra offrire, almeno parzialmente, un razionale alla natura generalmente non infiammatoria delle IgA secretorie nell'ambiente mucosale (Russell *et al.*, 1997).

L'epitelio intestinale costituisce una barriera selettiva tra lumen intestinale e sottostanti cellule immunitarie della lamina propria. Consiste di un singolo layer di cellule epiteliali specializzate nella formazione di complessi giunzionali, e sottoposte ad un rapido e continuo rinnovo a partire da cellule staminali pluripotenti localizzate alla base delle cripte. Le cellule epiteliali sono ricoperte da glicocalice costituito da complesse glicoproteine, ed una membrana basale le separa dal tessuto connettivo sottostante. Il layer epiteliale è rinforzato da giunzioni strette presenti negli spazi paracellulari; si tratta di una sorta di aperture dinamiche e strettamente regolate che si aprono e chiudono in risposta a vari segnali, esempio citochine, che originano a livello del lumen, della lamina propria e dell'epitelio, ma anche neurotrasmettitori prodotti dal sistema nervoso. Le giunzioni strette preservano la polarità cellulare e rappresentano elementi chiave nei meccanismi di diffusione a livello intestinale. Zonulina, occludina e claudina sono le molecole che costituiscono le

tight junctions, e risultano connesse al citoscheletro delle cellule epiteliali (Fasano, 2001; Rossi *et al.*, 2002). Oltre alle giunzioni strette situate lateralmente nella *zonula occludens*, sono presenti anche giunzioni intermedie e desmosomi a livello della *zonula adherens*. Diversi sono i tipi di cellule epiteliali che contribuiscono alla funzione barriera della mucosa intestinale: enterociti convenzionali (90-95%; denominati colonociti a livello dell'intestino crasso), goblet cell secernenti muco (la mucina influenza la colonizzazione batterica mediante impedimento fisico ed attività antimicrobica) e peptidi trefoil necessari per la crescita ed il riparo dell'epitelio, cellule enterocromaffini che producono molecole neuroendocrine con effetto paracrino, e Paneth cell, localizzate alla base delle cripte, responsabili della sintesi di peptidi antimicrobici, quali defensine e criptidine, e caratterizzate, a differenza delle altre cellule epiteliali, da un ciclo vitale maggiore, pari a circa 20 giorni.

Oltre alle loro funzioni assorbenti, digestive e secretorie, le cellule epiteliali sono considerate componenti costitutivi del sistema immune mucosale in quanto partecipano attivamente ai meccanismi di difesa innati e adattativi. Interagiscono, infatti, direttamente con le cellule dendritiche della lamina propria ed i linfociti intraepiteliali (Neutra *et al.*, 2001; Niess *et al.*, 2005), trasportano verso il lumen le immunoglobuline secretorie prodotte dalle plasmacellule nella lamina propria mediante binding al recettore di immunoglobuline polimeriche (pIgR) (Strober *et al.*, 2002), possono presentare antigeni (Bland, 1998), ed esprimono costitutivamente o mediante induzione, molecole costimolatorie e componenti del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Inoltre, stimoli pro-infiammatori (ad esempio TNF e IL-1) e certi patogeni (*Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* ed *Escherichia coli* enteropatogeno) possono indurre l'espressione e la secrezione di un ampio range di citochine infiammatorie e chemioattrattive, quali TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein), IP-10, GRO $\alpha$ , iNOS, COX-2, così come la molecola d'adesione ICAM-1 e defensine (Neish, 2002; Sansonetti, 2004). Insieme alle funzioni barriera non prettamente immunologiche, come motilità intestinale, secrezione di muco e turnover cellulare, la regolazione dell'integrità delle cellule epiteliali costituisce, quindi, un elemento chiave del sistema di difesa mucosale.

Un numero crescente di evidenze mostra come la collaborazione tra batteri enterici ed epitelio intestinale contribuisca allo sviluppo di questo ecosistema mediante modifiche delle cellule epiteliali (Clavel e Haller, 2007). La colonizzazione di topi germ-free con *B. thetaiotaomicron* induce l'espressione di un set di geni coinvolti nella funzione barriera, nell'assorbimento di nutrienti, nel metabolismo di xenobiotici, nella differenziazione, difesa e angiogenesi. Hooper *et al.* (1999) hanno, infatti, osservato, dopo colonizzazione con *B. thetaiotaomicron*, la produzione di specifici glicoconjugati fucosilati dell'ospite, con conseguenti cambiamenti nelle capacità delle diverse specie di colonizzare l'intestino. In un altro studio, la stessa specie ha indotto l'espressione di una metalloproteasi della matrice, responsabile dell'attivazione di peptidi antimicrobici o prodefensine (Lopez-Boado *et al.*, 2000). Interessante sottolineare come la risposta dell'epitelio intestinale alla colonizzazione da parte di *B. thetaiotaomicron* sia risultata differente dalla risposta osservata nei confronti di *E. coli*, *Bifidobacterium infantis* o di un completo microbiota, supportando il concetto di fattori batterio-specifici nel cross-talk con l'epitelio dell'ospite (Hooper *et al.*, 2001, 2003). Recentemente, Cash *et al.* (2006) hanno scoperto come la colonizzazione di topi germ-free con un microbiota proveniente da topi convenzionali, sia in grado di indurre nelle Paneth cell a livello sia di mRNA che di proteine, l'espressione del gene rigenerante RegIII $\gamma$  che codifica una lectina secreta di tipo C con proprietà antibatteriche. Ad ulteriore conferma del significativo

impatto dei microrganismi sullo sviluppo anatomico, fisiologico ed immunologico dell'ospite, in animali germ-free è stato riscontrato: (i) accumulo di muco con ritenzione d'acqua come conseguenza dell'assenza di batteri mucolitici; (ii) incremento fino a 10 volte delle dimensioni dell'intestino cieco; (iii) prolungato ciclo cellulare dell'epitelio intestinale (4 giorni contro 2 per topi convenzionali) (Alam *et al.*, 1994); (iv) riduzione della peristalsi, probabilmente correlata ad un'alterata risposta delle cellule enteroendocrine (Husebye *et al.*, 1994); (v) aberranti morfologie mucosali con villi più corti e sottili, microvilli più lunghi, una diminuita area della superficie mucosale ed un ridotto rapporto cripta:villo (Wostmann, 1996); (vi) calo nel numero e nell'attività citolitica di linfociti intraepiteliali; (vii) riduzione nell'attività fagocitica e nella chemiotassi macrofagica (Nicaise *et al.*, 1998); (viii) minor abbondanza e reattività a mitogeni da parte dei linfociti della lamina propria (Freter e Abrams, 1972); (ix) aggregati linfoidi, quali le placche del Peyer, piccoli e poco sviluppati (Rothkotter e Pabst, 1989); (x) riduzione nella diversificazione di immunoglobuline (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004).

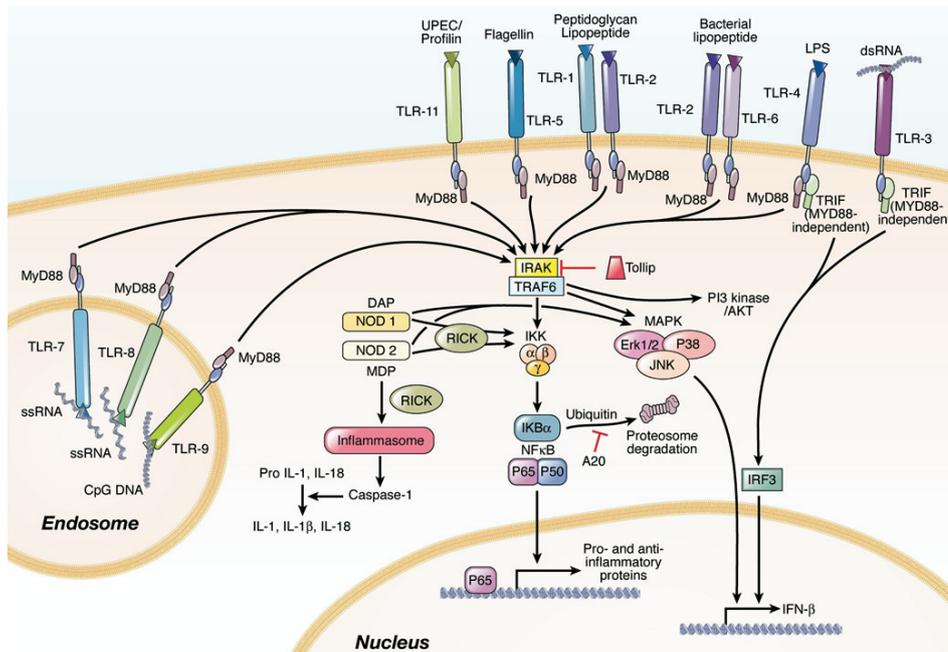
Nei primi giorni successivi alla monocontaminazione di maialini germ-free appena nati con un ceppo non patogeno di *E. coli*, è stata osservata una significativa infiltrazione della mucosa intestinale, la formazione di centri germinali nelle placche del Peyer, una transiente traslocazione di batteri nei linfonodi mesenterici, la produzione di specifici anticorpi e l'attivazione di cellule B policlonali con produzione di immunoglobuline (Cukrowska *et al.*, 2001). Dopo 5-10 giorni di attivazione del sistema immune sia nel maiale che nell'uomo, le risposte locali e sistemiche sono risultate inibite (induzione di tolleranza orale alla microflora?) (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 1981; Cukrowska *et al.*, 2002). Benché l'induzione di tolleranza non sia ancora stata chiarita, due meccanismi sembrano essere coinvolti: delezione ed anergia associate ad una alta dose di antigeni, ed induzione di una attiva soppressione mediata da cellule T regolatorie, associata ad una bassa dose antigenica (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004).

La complessa interazione tra batteri non patogeni, epitelio e cellule immuni della mucosa costituisce, quindi, un prerequisito fondamentale per lo sviluppo di funzioni immuni e meccanismi di difesa maturi a livello intestinale. I batteri enterici, normali componenti della microflora, mediano processi pro-infiammatori strettamente e rigorosamente controllati dall'ospite (infiammazione fisiologica, self-limiting response). Tuttavia, il microbiota intestinale è anche coinvolto nello sviluppo di infiammazione cronica (Sartor, 2006); in individui geneticamente suscettibili, stimoli ambientali, quali infezioni batteriche o trattamenti antibiotici possono compromettere l'interazione omeostatica batteri-ospite e contribuire alla perdita di processi pro-infiammatori controllati con il conseguente sviluppo di infiammazione cronica.

Studi recenti hanno riportato anche il coinvolgimento di funghi nello sviluppo di risposte allergiche ed immuni. In topi, la perturbazione antibiotica delle comunità gastrointestinali accoppiata alla somministrazione di *C. albicans*, risulta nell'incremento dei livelli di eosinofili, mast cell, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$ , e IgE (Noverr *et al.*, 2004). Il potenziale ruolo svolto dai funghi in un ampio range di alterazioni immuni, sembra confermato dalla produzione fungina di una vasta gamma di molecole immunomodulanti (Noverr *et al.*, 2003).

Il sistema immunitario è in grado di discriminare tra componenti microbici potenzialmente patogeni e antigeni innocui per l'ospite mediante "pattern recognition receptor (PRR)" (Fig. 9). In particolare, i Toll-like receptor (TLR) permettono alle cellule umane di riconoscere pattern molecolari conservati tra microrganismi (lipopolisaccaride, peptidoglicano, DNA batterico, heat shock protein, superantigeni) (Ulevitch, 1999; Medzhitov e Janeway, 2000; Akira e Hemmi, 2003).

I TLR, inizialmente descritti in *Drosophila* come recettori transmembrana coinvolti nella risposta immune contro infezioni fungine, sono presenti sulla membrana extracellulare di macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche ed altre cellule appartenenti al sistema di immunità innata dell'ospite, per garantire l'immunosorveglianza (Medzhitov e Janeway, 2000; Akira e Hemmi, 2003). Le cellule dendritiche (DC) della lamina propria possono, ad esempio, estendere i loro dendriti tra le cellule epiteliali e direttamente campionare antigeni batterici dal lumen intestinale mediante interazione con i recettori TLR (Niess *et al.*, 2005). A questi si aggiunge una famiglia di recettori citosolici NOD-like (nucleotide-binding oligomerization domain), espressi intracellularmente in macrofagi, cellule epiteliali e Paneth cell. L'azione combinata di entrambi i set di recettori gioca un ruolo fondamentale nella detection di differenti pattern molecolari microbici, e nella trasmissione della cascata segnale con conseguente induzione di un complesso programma genico. Ad oggi, sono stati identificati più di 10 differenti TLR e più di 20 proteine NOD-like, ma solo ad alcuni di questi recettori sono stati assegnati specifici ligandi. Ad esempio, il lipopolisaccaride viene riconosciuto dal PRR TLR4, mentre i prodotti di batteri Gram-positivi (acido lipoteicoico e peptidoglicano), il dsRNA virale, le flagelline batteriche, e il DNA CpG non metilato sono riconosciuti rispettivamente da TLR2, TLR3, TLR5 e TLR9 (Beutler, 2000; Hemmi *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2001). NOD1 riconosce un altro componente del peptidoglicano, l'acido  $\gamma$ -D-glutamyl-diammino pimelico, mentre NOD2 il muramil dipeptide. I TLR attivano sistemi effettori target down-stream, quali i pathway di MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK (extracellular activated kinase), p38 e JNK (c-jun NH2-terminal kinase), ed il sistema trascrizionale I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B (Zhang e Ghosh, 2001). A sua volta, il fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B svolge un ruolo chiave nell'induzione di numerose citochine, chemochine e molecole d'adesione (Schmid e Adler, 2000); un incremento nella sua attività, così come nell'espressione dei TLR a livello dei macrofagi della lamina propria e nell'epitelio intestinale, causato da una persistente stimolazione e/o dalla perdita di meccanismi immunoregolatori negativi, è stato riportato in condizioni di infiammazione cronica (Schreiber *et al.*, 1998; Hausmann *et al.*, 2002; Andresen *et al.*, 2005). Secondo la teoria dell'immunità innata, pathogen associated molecular pattern (PAMP) si legano ai TLR ed inducono una risposta immune nell'ospite. Anche i commensal associated molecular pattern (CAMP) sono in grado di scatenare una risposta immune mediante la stessa tipologia di recettori ma non inducono istopatologia a livello della mucosa intestinale. Sofisticati meccanismi regolano, infatti, in maniera rigorosamente controllata, il signaling pro-infiammatorio ed aiutano a mantenere l'omeostasi intestinale (Cario *et al.*, 2002; Haller *et al.*, 2003). Tra le differenti proteine responsabili della regolazione dell'espressione genica mediata da TLR, IRAK-M, TOLLIP (Toll-interacting protein), A20 (nota anche come TNF-induced protein 3), PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor), e SIGIRR [single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecole (Wald *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2007)] rappresentano regolatori negativi intrinseci e critici delle risposte immuni; a questi si aggiungono i mediatori immunosoppressivi TGF- $\beta$  e IL-10, che contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi dell'epitelio intestinale pur con differenze nel timing e nei meccanismi molecolari dei loro effetti (Haller, 2006).



**Fig. 9.** Toll- e nod-like receptor (TLR e NLR).

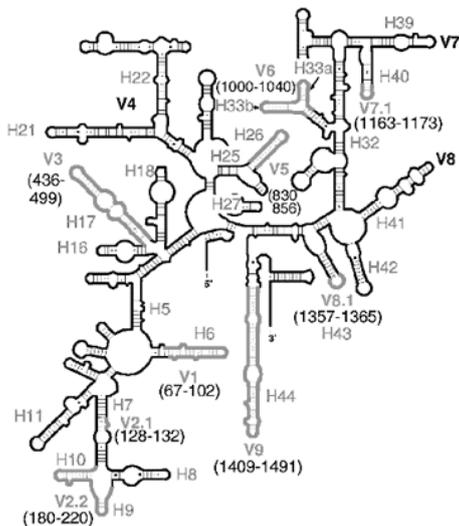
TLR e NLR consentono il riconoscimento di ligandi batterici specifici e determinano l'attivazione di pathway di trasduzione del segnale, che coinvolgono, ad esempio, NF-κB e MAPK.

## Ecologia microbica: nuovi approcci coltura-indipendenti

Le conoscenze relative alla composizione del microbiota intestinale umano derivano da studi coltura-dipendenti (Moore e Holdeman, 1974) e, solo più recentemente, da approcci molecolari filogenetici coltura-indipendenti. *E. coli* è stata la prima specie batterica identificata, isolata nel 1885 dalle feci diarroiche di bambini (Anonymous, 1981). Nel corso del ventesimo secolo, lo studio degli abitanti del tratto gastrointestinale umano è risultato nella completa caratterizzazione di più di 400 specie coltivate (Rajilić-Stojanović, 2007). I metodi classici di identificazione si basano su caratterizzazioni fenotipiche, quali morfologia, richieste nutrizionali e profili fermentativi. La scarsa riproducibilità di questi approcci coltura-dipendenti, il basso potere discriminatorio e l'ambiguità di determinati risultati ne invalidano l'impiego. Recentemente, i costi relativamente bassi e la rapidità crescente del sequenziamento del DNA, unitamente ai progressi compiuti negli approcci computazionali per l'analisi di complessi dataset, hanno fatto sì che l'analisi del gene 16S rRNA sia ormai comunemente impiegata ai fini di classificare e determinare rapporti filogenetici tra microrganismi. L'applicazione di tecniche molecolari ha rivelato come il microbiota intestinale umano sia significativamente più complesso di quanto ipotizzato sino ad ora, poiché solo una frazione dei batteri presenti nell'intestino è coltivabile (Suau *et al.*, 1999). Le proporzioni riportate di batteri coltivabili variano dal 20% in uno studio di campioni mucosali di tre individui sani (Eckburg *et al.*, 2005), al 46% in tre anziani (Hayashi *et al.*, 2003).

Il gene 16S rRNA, presente in tutti i microrganismi dato il ruolo fondamentale svolto dai ribosomi nella biosintesi proteica, consiste di circa 1.5 kb, dimensione ragionevole per poter effettuare analisi di sequenza comparativa, e contiene un numero sufficiente di regioni variabili che consentono l'identificazione e la differenziazione delle specie [come indicato da Ludwig e Klenk (2001), la sequenza della regione V1, tra le 9 identificate, appare comunque la più variabile e, di

conseguenza, la più informativa] (Fig. 10). Inoltre, eventi genetici quali HGT, non sembrano aver mai coinvolto i geni rRNA, il che sottolinea ulteriormente la validità di questo approccio filogenetico. Attualmente, più di 600000 sequenze del gene 16S rRNA sono disponibili in GenBank, un numero di gran lunga superiore a quello di qualsiasi altro gene (Cole *et al.*, 2005). Le sequenze di rRNA possono essere clusterizzate in gruppi correlati tra loro sulla base della percentuale di identità della sequenza stessa. Cutoff del 95 e 98% sono comunemente impiegati per delimitare, rispettivamente, genere e specie, benché in realtà questi termini non siano così precisamente definiti ed i valori stessi siano in qualche modo arbitrari. Una specie batterica è definita come “a category that circumscribes a genomically coherent group of individual isolates/strains sharing many unconnected features, comparatively tested under highly standardized conditions” (Coenye *et al.*, 2005). Recentemente, è stato introdotto il termine filotipo (o tipo filogenetico) per indicare cluster di sequenze del gene 16S rRNA caratterizzate da un'identità di sequenza  $\geq 97\%$  (Ley *et al.*, 2006).



**Fig. 10.** Struttura secondaria del gene 16S rRNA di *E. coli*.

Diversi e spesso complementari sono gli approcci che vengono utilizzati per ottenere informazioni su sequenze di rRNA che consentano, a loro volta, di studiare la diversità microbica intestinale, quali sequenziamento di ampliconi clonati e fingerprinting del gene 16S rRNA, quantitative dot blot e fluorescence in situ hybridization (FISH), e approcci di PCR quantitativa (Tab. 2).

**Tab. 2.** Approcci di ecologia microbica.

	<b>Approach</b>	<b>Target</b>	<b>Result</b>	<b>Main limitation</b>
Evolutionary diversity	16S rRNA gene sequencing	16S rRNA genes	Collection of 16S rRNA gene sequences	Bias in DNA extraction, PCR and cloning
	Diversity arrays	16S rRNA genes	Display of 16S rRNA gene diversity	In early stage of development
	Dot blot hybridization	16S rRNA	Relative abundance of 16S rRNA	Requires 16S rRNA gene sequence data
	Fingerprinting	16S rRNA genes	Diversity profiles	Bias in DNA extraction and PCR
	FISH	16S rRNA	Enumeration of bacterial populations	Requires 16S rRNA gene sequence data
	Non-16S rRNA gene Fingerprinting	Genomic DNA; cellular fatty acids	Diversity profiles	Identification of microbes
	Real-time PCR	16S rRNA genes	Relative abundance of 16S rRNA genes	Bias in DNA extraction
Genomic diversity	DNA microarray	Genomic DNA	Variation between genomes	Cost intensive
	Metagenomics	Genomic DNA	Gene sequences	Bias in DNA extraction and cloning efficiency
	Probe-based cell sorting	Genomic DNA, plasmid DNA	Sorted cells containing gene of interest	Depends on sequence data
	Subtractive hybridization	Genomic DNA	Unique gene sequences	Sensitive for false positives
Activity	DNA microarray	mRNA	Transcriptional fingerprints	Biological explanation of data
	<i>In situ</i> isotope tracking	Labelled biomarkers	Identification of substrate-utilizing microbes	Only suitable for simple pathways
	Real-time PCR (RT-PCR)	mRNA	Specific gene expression	Only applicable to limited number of genes
	(R-)IVET	Promoter regions	Identification of induced promoters	Requires cultivation
	SCOTS	mRNA	Identification of transcribed genes	Depends on selective amplification
	STM	Genome	Insert of transposons in genome	Depends on transformation ability of microbes

### ***Evolutionary diversity***

Il primo studio basato sull'analisi delle sequenze geniche dell'rRNA SSU, e finalizzato alla caratterizzazione della comunità microbica dell'intestino umano, è stato pubblicato nel 1999 (Suau *et al.*, 1999). Prima, solo Zoetendal *et al.* (1998) avevano riportato l'impiego di una analisi in Temperature Gradient Gel Electrophoresis per ottenere un preliminare profiling del microbiota intestinale umano. In questi studi e successivamente, il fingerprinting dei geni 16S rRNA ha mostrato come la composizione della comunità batterica predominante sia specifica per ciascun ospite e stabile nel tempo in individui adulti sani (Zoetendal *et al.*, 1998; Tannock *et al.*, 2000; Seksik *et al.*, 2003; Vanhoute *et al.*, 2004).

Il sequenziamento di librerie di cloni di geni 16S rRNA ottenute dalle feci di adulti sani ha evidenziato una significativa frazione di batteri non descritta precedentemente, di cui la maggior parte Gram-positivi (Zoetendal *et al.*, 1998; Suau *et al.*, 1999; Eckburg *et al.*, 2005). L'impiego della FISH ha permesso di confermare le maggiori scoperte; Harmsen *et al.* (2002) e Lay *et al.* (2005) hanno dimostrato come l'attuale set di sonde oligonucleotidiche disponibili sia in grado di

coprire circa l'80-90% dei batteri fecali in individui adulti sani, con un 54-75% corrispondente a Gram-positivi.

La struttura della comunità batterica è stata determinata per campioni fecali ma anche nel caso di campioni umani provenienti da colon e ileo (Marteau *et al.*, 2001; Hold *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Eckburg *et al.*, 2005). Questi studi hanno suggerito come il campionamento lungo il tratto gastrointestinale umano sia fondamentale ai fini di ottenere una descrizione il più possibile veritiera e rappresentativa della diversità microbica di questo ecosistema, sia per analisi coltura-dipendenti che per profiling molecolari. E' stato infatti dimostrato come il microbiota associato alla mucosa rettale differisca da quello presente nelle feci (Zoetendal *et al.*, 2002), e, più recentemente, due diversi studi hanno indicato come la mucosa delle parti superiori del tratto gastrointestinale contenga specifici filotipi non correlati ad isolati già noti (Eckburg *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Mediante clonaggio e sequenziamento dei geni 16S rRNA, sono stati caratterizzati anche campioni umani provenienti da intestino tenue, esofago e cavità orale (Kroes *et al.*, 1999; Paster *et al.*, 2001; Pei *et al.*, 2004). Le comunità batteriche sono risultate completamente differenti rispetto alle parti più distali del tratto gastrointestinale, benché predominino gli stessi gruppi di batteri, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* ed il gruppo TM7 che non possiede rappresentanti coltivabili. La percentuale di batteri Gram-positivi è risultata del 75 e 40%, rispettivamente per esofago e cavità orale. Recentemente, FISH con impiego di marker filogenetici, citometria a flusso, whole-genome amplification e shotgun sequencing, sono stati impiegati per ottenere un assemblaggio genomico parziale di un membro del phylum TM7 (Podar *et al.*, 2007). Per superare il problema della coltivabilità di determinati microrganismi, sono stati comunque sviluppati nuovi metodi, quali incapsulamento di cellule microbiche in microparticelle gelatinose che permettano una coltura highthroughput in un ambiente naturale simulato (Zengler *et al.*, 2002).

Fino ad ora, il sequenziamento dell'rRNA SSU ha permesso di descrivere il microbiota gastrointestinale di 87 soggetti e gli specifici gruppi di 28 individui (Tab. 3), per un totale di circa 55000 sequenze di rRNA SSU ottenute da campioni del tratto gastrointestinale umano. La maggior parte di tali sequenze deriva da studi in cui ciascun gene 16S rRNA è stato clonato, sequenziato e depositato. Va sottolineato come queste stime riflettano chiaramente solo il copy number dei geni SSU rRNA e non le reali conte cellulari, e come i risultati ottenuti siano soggetti a bias inerenti l'amplificazione in PCR ed il clonaggio. Inoltre, questo tipo di analisi non consente la detection di variazioni nelle capacità funzionali del microbiota, quali virulenza, adesione mucosale e/o invasione, che non influenzano le proporzioni relative delle specie (Swidsinski *et al.*, 2002, 2005; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). I risultati ottenuti mediante questo approccio, offrono, comunque, una valutazione coltura-indipendente internamente coerente del microbiota intestinale. Lo studio di Eckburg *et al.* (2005), con un dataset di 13335 sequenze, rappresenta la prima applicazione di un approccio di highthroughput sequencing a campioni derivanti dal tratto gastrointestinale umano, un approccio che ha consentito l'analisi della diversità e dell'abbondanza di 395 filotipi lungo il tratto gastrointestinale di 3 individui. Le differenze tra individui sono risultate maggiori rispetto alle differenze osservate tra siti di campionamento in uno stesso individuo, e le feci sono risultate rappresentative delle differenze interindividuali. Gli studi successivi hanno solo potuto confermare come l'highthroughput sequencing sia un promettente approccio per l'analisi di complessi ecosistemi microbici, quale per l'appunto il microbiota intestinale umano (Bik *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2007). L'analisi recente di 18348 sequenze del gene 16S rRNA effettuata da Ley *et al.* (2006) sulle feci di 14 adulti nel corso di un anno, ha mostrato, analogamente allo

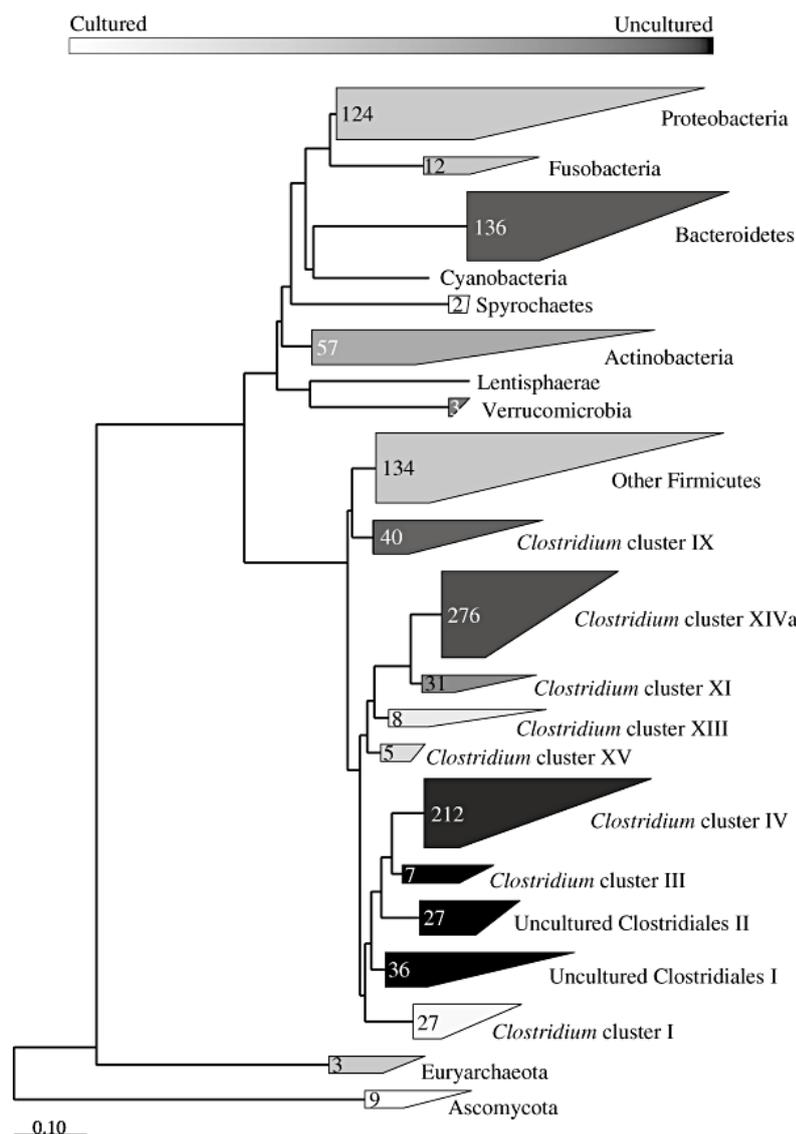
studio di Eckburg *et al.* (2005), enormi differenze tra individui nella struttura della comunità microbica, ma ha evidenziato anche una generale stabilità di questa comunità in ciascun ospite. Le 15172 sequenze dei geni SSU rRNA, ottenute da Frank *et al.* (2007), hanno confermato le abbondanze relative dei 4 maggiori phyla batterici: *Firmicutes* (64% delle sequenze), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%), e *Actinobacteria* (3%). Le divisioni tassonomiche inferiori sono risultate diverse tra loro, e le collector's curve non hanno raggiunto un plateau, indice del fatto che gran parte della diversità non è ancora stata caratterizzata.

**Tab. 3.** Numero di soggetti il cui microbiota gastrointestinale è stato descritto in termini di composizione, mediante sequenziamento dei geni SSU rRNA.

Subject	Fraction of microbiota	No. of subjects	Reference
Healthy adult	Total	50	Zoetendal <i>et al.</i> , 1998; Suau <i>et al.</i> , 1999; Bonnet, 2002; Bonnet <i>et al.</i> , 2002; Hayashi <i>et al.</i> , 2002a,b; Eckburg <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2005; Bik <i>et al.</i> , 2006; Gill <i>et al.</i> , 2006; Ley <i>et al.</i> , 2006
Healthy infant		18	Favier <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2004; Palmer <i>et al.</i> , 2007
Healthy elderly		13	Hold <i>et al.</i> , 2002; Hayashi <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2003
Crohn's disease patient		4	Mangin <i>et al.</i> , 2004; Frank <i>et al.</i> , 2007 (no. of subjects unknown)
Ulcerative colitis patient		2	R. A. Hutson (unpublished); Frank <i>et al.</i> , 2007 (no. of subjects unknown)
Healthy adult	<i>Lactobacilli</i>	12	Heilig <i>et al.</i> (2002)
Healthy infant		1	
Healthy adult	<i>Bifidobacteria</i>	5	Satokari <i>et al.</i> (2001)
Healthy adult	Bacteria enriched on mucin-based medium	6	Derrien <i>et al.</i> (2004)
Healthy adult	Butyrate producing bacteria	3	Barcenilla <i>et al.</i> , 2000; Duncan <i>et al.</i> , 2004
Healthy infant		1	

Una conseguenza indesiderata di un approccio di sequenziamento così massivo è rappresentata dal deposito di tantissime sequenze tra loro identiche, il che è risultato in un'eccessiva ridondanza nei database pubblici ed in una limitata utilità degli stessi.

L'integrazione dei dataset ottenuti tramite studi coltura-dipendenti ed -indipendenti, ha permesso, sino ad ora, l'identificazione di 1139 filotipi batterici unici, 3 filotipi archeobatterici e 9 eucariotici come abitanti del tratto gastrointestinale umano (Fig. 11) (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2007).



**Fig. 11.** Albero filogenetico dei filotipi identificati nel tratto gastrointestinale umano (Rajilic *et al.*, 2007). Un riempimento di color nero indica filotipi identificati in studi coltura-indipendenti, mentre il bianco indica filotipi identificati in studi coltura-dipendenti. Un colore più scuro indica una maggiore percentuale di filotipi corrispondenti a membri non coltivati. La scale bar mostra una divergenza di sequenza pari al 10%. All'interno di ciascun gruppo filogenetico è riportato il numero di filotipi identificati.

### Genomic diversity

Il gene 16S rRNA è stato ed è tuttora largamente impiegato nel campo dell'ecologia microbica per l'identificazione di microrganismi. Tuttavia, il suo utilizzo non fornisce alcuna indicazione sul potenziale metabolico di un ecosistema. Al contrario, approcci basati sulla sequenza di interi genomi consentono di esplorare il potenziale fisiologico dei microrganismi. Il sequenziamento genomico di un piccolo numero di commensali del tratto gastrointestinale umano [*B. thetaiotaomicron* (Xu *et al.*, 2003), diverse specie di *Lactobacillus* (Kleerebezem *et al.*, 2003; Pridmore *et al.*, 2004; Altermann *et al.*, 2005; Chaillou *et al.*, 2005; Claesson *et al.*, 2006; Makarova *et al.*, 2006; van de Guchte *et al.*, 2006; Callanan *et al.*, 2008), *Enterococcus faecalis* (Paulsen *et al.*, 2003) e *B. longum* (Schell *et al.*, 2002)] ha reso la genomica comparativa un tool predittivo relativamente affidabile. Ad esempio, studi *in silico* hanno evidenziato la presenza di sistemi di trasporto fosfotransferasi in *Lactobacillus plantarum*, *E. faecalis* e *Listeria monocytogenes*, particolarmente attivi a livello del piccolo intestino, e la presenza di molti trasportatori ABC, permeasi e geni coinvolti nell'utilizzo di complessi carboidrati nel genoma di batteri predominanti nel colon, quali *B. thetaiotaomicron* e *B. longum* (De Vos *et al.*, 2004). Queste

ed altre variazioni potrebbero riflettere il successo ecologico di specifici gruppi batterici nelle diverse parti del tratto gastrointestinale umano (Bron *et al.*, 2004; Sonnenburg *et al.*, 2005; De Vries, 2006).

Nonostante il valore indubbio della genomica comparativa, questo approccio è applicabile quasi esclusivamente ad isolati ben caratterizzati. Al fine di esplorare la diversità genomica nella sua interezza, si rende necessario l'impiego di cromosomi artificiali batterici (BAC) o vettori correlati per poter costruire librerie metagenomiche, ovvero librerie costituite da grandi frammenti genomici (> 100 kb) provenienti dalla comunità. Studi metagenomici consentono di generare profili dettagliati dei microrganismi che vivono in un determinato habitat, e delineare le potenzialità genetiche e metaboliche dell'intera comunità [il termine metagenomica deriva dalla combinazione del concetto statistico di meta-analisi (combinazione statistica di analisi separate) e genomica (analisi del materiale genetico di un organismo)].

Mediante approccio metagenomico, Breitbart *et al.* (2003) hanno studiato la comunità virale presente nelle feci umane, identificando circa 1200 genotipi virali con alta omologia di sequenza a fagi noti per infettare batteri Gram-positivi. L'analisi metagenomica del microbiota intestinale umano condotta da Gill *et al.* (2006) ha permesso di ottenere circa 78 milioni di bp di sequenze di DNA uniche e 2062 sequenze di 16S rDNA dalle feci di due individui adulti sani. La ricostruzione del potenziale metabolico del microbioma fecale di questi individui ha mostrato un significativo arricchimento di geni coinvolti nei seguenti pathway metabolici: metabolismo di xenobiotici, glicani, amminoacidi, produzione di metano, e biosintesi di vitamine e isoprenoidi attraverso il pathway 2-methyl-D-erythritol 4-phosphate. Il primo approccio di metagenomica comparativa applicata a campioni fecali umani, ha evidenziato come il phylum *Firmicutes* sia ridotto in complessità in pazienti affetti da morbo di Crohn rispetto a soggetti sani (Manichanh *et al.*, 2006). In uno studio più recente, il medesimo approccio ha consentito l'analisi del microbiota intestinale di individui adulti sani, neonati svezzati e non, in termini di complessità, tassonomia, composizione genica, e variazioni inter-individuali (Kurokawa *et al.*, 2007). Nel microbioma intestinale adulto, è stata riscontrata la sovraespressione di COG (Cluster of Orthologous Genes) classificati nelle categorie funzionali "trasporto e metabolismo di carboidrati" (G) e "meccanismi di difesa" (V), e la sottoespressione delle categorie "motilità cellulare" (N), "biosintesi, trasporto e catabolismo di metaboliti secondari" (Q) e "chaperone, turnover proteico e modificazioni post-traduzionali" (O).

Va comunque sottolineato che il numero di geni diversi presenti all'interno di una comunità è solitamente così grande che, per ottenere una copertura ragionevole, il numero di frammenti clonati dovrebbe essere enorme. A questo si aggiunge un ulteriore limite della metagenomica rappresentato dal fatto che il contenuto genico persino di ceppi appartenenti alla stessa specie microbica può differire fino al 20% (Boucher *et al.*, 2001).

DNA microarray e subtractive hybridization (SH) rappresentano approcci mirati al recupero di informazioni genomiche uniche, mediante discriminazione di un microrganismo dall'altro. Dopo i primi tentativi di sviluppo di un DNA microarray specifico per l'analisi dell'ecosistema intestinale (Wang *et al.*, 2002), Palmer *et al.* (2006) hanno sviluppato un diversity microarray, basato sull'impiego di circa 10000 sonde per il gene 16S rRNA, in grado di rivelare e quantificare specie batteriche che costituiscono fino allo 0.1% della popolazione microbica totale. Le tecniche di ibridazione con micro- e macro-array consentono l'identificazione di geni altamente omologhi a sequenze geniche di un ceppo correlato di cui è interamente nota la sequenza (Nesbø *et al.*, 2002). La tecnica SH è in grado, invece, di mostrare le differenze tra 2 organismi più che le loro similarità

(Lisitsyn, 1995), e fornisce il sequenziamento selettivo di specifiche parti del genoma di ceppi batterici senza la necessità di conoscerne a priori l'intera sequenza genomica (Diatchenko *et al.*, 1996; Akopyants *et al.*, 1998). Questo approccio è stato principalmente impiegato al fine di comparare isolati patogeni e commensali appartenenti allo stesso genere o specie. Il suo impiego si è rivelato utile anche nello studio delle differenze genomiche tra 2 ceppi di *Ruminococcus flavefaciens* e 4 di *Lactobacillus sobrius* (Antonopoulos *et al.*, 2004; Konstantinov *et al.*, 2005). Il tentativo di Galbraith *et al.* (2004) di confrontare tra loro ecosistemi ruminali e determinarne l'unicità in termini di potenziale genetico, ha rivelato come sia possibile, mediante SH, recuperare frammenti genomici specifici di un ecosistema.

La presenza di un numero ristretto di operoni rRNA all'interno di un genoma (da uno fino ad una dozzina) e le dimensioni degli inserti delle librerie (circa 50-100 kb), fanno sì che solo pochi cloni di una libreria metagenomica contengano geni rRNA (Beja *et al.*, 2000). Questo ovviamente rende complesso il poter correlare specifiche sequenze geniche ai microrganismi da cui originano. Ai fini di arricchire le librerie dei frammenti metagenomici contenenti i geni rRNA, è stata proposta una selezione basata sul sito di restrizione I-CeuI, unico nel gene 23S rRNA (Nesbø *et al.*, 2005), ed un approccio cell sorting (Zwirgmaier *et al.*, 2004). Quest'ultimo prevede la selezione delle cellule mediante impiego di sonde oligonucleotidiche che ibridano con il gene target, e la loro cattura su una micropiastre ricoperta da frammenti di DNA complementari alle sonde. A causa delle dimensioni e/o della formazione di network, alcune sonde oligonucleotidiche o parti di esse possono, tuttavia, restare al di fuori delle cellule target, compromettendo la validità dell'approccio (Zwirgmaier *et al.*, 2003).

Oltre ad analisi guidate dalla sequenza, i metagenomi offrono grandi possibilità anche per analisi basate sulla funzione (Handelsman, 2004). Williamson *et al.* (2005) hanno sviluppato un approccio intracellulare al fine di screenare librerie metagenomiche alla ricerca di cloni capaci di indurre o inibire il quorum sensing. In questo screening, il DNA dei cloni viene trasferito in cellule contenenti un plasmide biosensore, e successivamente, rivelato ed isolato mediante fluorescence-activated cell sorting (FACS). Un approccio simile è stato impiegato per identificare nel metagenoma delle acque di superficie, i geni indotti da idrocarburi aromatici (Uchiyama *et al.*, 2005).

### ***Viability and metabolic activity***

Il passo successivo all'identificazione dei membri che compongono un ecosistema, è rappresentato dall'analisi della loro vitalità e, conseguentemente, della loro attività metabolica. L'approccio del conteggio in piastra è stato da sempre impiegato come metodo standard per misurare la vitalità cellulare ma, in realtà, fornisce solo una stima delle cellule capaci di replicare nelle condizioni fornite per la crescita. Inoltre, popolazioni cellulari esposte a stress possono entrare in uno stato non coltivabile pur continuando a mantenere attività. Per ovviare a queste difficoltà, sono stati sviluppati approcci alternativi alla coltura, per poter determinare lo stato fisiologico cellulare. Recentemente, è stato mostrato come sia possibile numerare cellule di *Bifidobacterium* in coltura pura, e dividerle in popolazioni di cellule attive, danneggiate e morte mediante flow cytometry (FCM) e l'impiego di sonde live/dead staining (utilizzate per monitorare attività esterasica, potenziale e permeabilità di membrana in bifidobatteri sottoposti ad alte concentrazioni

di sali biliari) (Ben-Amor *et al.*, 2002). Lo stesso approccio ha permesso di stabilire che circa un terzo dei batteri presenti nelle feci umane sono morti (Apajalahti *et al.*, 2003), il 50% è vitale, mentre un 20% è danneggiato (Ben-Amor *et al.*, 2005). Le cellule danneggiate vengono ritenute tali quando sono rivelate da entrambe le sonde (live/dead staining), e probabilmente rappresentano cellule vitali ma difficili da coltivare (Ben-Amor *et al.*, 2002). Nella popolazione attiva sono risultati predominanti batteri produttori di butirrato; nella frazione di cellule morte, invece, batteri correlati a *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Eubacterium* (Ben-Amor *et al.*, 2005).

L'isolamento e la caratterizzazione dei microrganismi del tratto gastrointestinale ha permesso di ottenere maggiori informazioni sulla loro fisiologia e sui potenziali ruoli all'interno dell'intestino umano. Tuttavia, la capacità di svolgere una determinata funzione in coltura non significa necessariamente che questo debba verificarsi anche *in situ*. Questa situazione è stata ben dimostrata nel caso di campioni ambientali incubati con substrati marcati con isotopi stabili o radioattivi. Ad esempio, Manefield *et al.* (2002) hanno mostrato come la degradazione del fenolo in bioreattori sia dominata da un membro non coltivabile appartenente al genere *Thauera* e non dagli isolati degradanti il fenolo che potrebbero essere coltivati nel bioreattore stesso. Alla luce della complessa conversione di substrati che avviene nel colon, l'impiego di sonde ad isotopi stabili potrebbe rappresentare un approccio valido per l'analisi dell'utilizzo *in situ* di prebiotici ed altri carboidrati (Egert *et al.*, 2006).

L'attività microbica può essere determinata utilizzando una varietà di target, quali cellule, RNA costituenti, proteine o metaboliti, o mediante l'impiego di sistemi reporter.

Diversi sono i limiti che ostacolano lo studio dell'espressione genica *in situ* di microrganismi. La maggior parte delle metodologie attualmente disponibili sono, infatti, applicabili a mRNA con la coda di poly A e quindi ad mRNA eucariotici. A queste difficoltà si aggiunge l'instabilità dell'mRNA procariotico e, soprattutto, il fatto che solo una piccola frazione di RNA batterico totale consiste di mRNA. Tuttavia, un numero sempre crescente di studi conferma l'applicabilità di questo approccio anche in campo procariotico (Rokbi *et al.*, 2001; Casula e Cutting, 2002; Fitzsimons *et al.*, 2003). Uno studio recente di profiling trascrizionale, effettuato da Sonnenburg *et al.* (2005) ha dimostrato l'adattabilità di *B. thetaiotaomicron* ad una dieta ricca in polisaccaridi o in zuccheri semplici nel tratto gastrointestinale murino. In presenza di polisaccaridi, *B. thetaiotaomicron* esprime geni codificanti per proteine di binding a polisaccaridi nella membrana esterna e idrolasi glicosidiche, mentre nel caso di una dieta semplice, vengono espressi geni coinvolti nell'utilizzo dei glicani del muco dell'ospite. Da questo studio emerge come il profiling trascrizionale sia in grado di monitorare le capacità modulanti della dieta sui microrganismi del tratto gastrointestinale, e soprattutto come questo approccio rappresenti un tool promettente per lo screening di nuovi functional food.

Una diversa strategia per misurare l'espressione genica in ecosistemi è denominata *in vivo* expression technology (IVET). L'approccio IVET consente l'identificazione di promotori che vengono specificamente indotti in seguito ad esposizione di batteri a determinate condizioni ambientali. Ulteriori strategie comprendono selective capture of transcribed sequences (SCOTS) e signature-tagged mutagenesis (STM). La tecnologia IVET è stata principalmente impiegata per studiare l'espressione genica in patogeni, ma si è rivelata utile anche nello studio della colonizzazione da parte di *Lactobacillus reuteri* del tratto gastrointestinale murino (Walter *et al.*, 2003), e nell'identificazione dei promotori indotti in *L. plantarum* durante il transito nell'intestino murino (Bron *et al.*, 2004).

L'attività specifica di microrganismi può essere analizzata mediante impiego di tecnologie proteomiche. Un promettente approccio metaproteomico è stato recentemente riportato da Klaassens *et al.* (2007). La combinazione di elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) è stata applicata per la prima volta al microbiota fecale di neonati, portando alla prima caratterizzazione del metaproteoma del tratto gastrointestinale umano.

Metabolomica/metabonomica rappresentano un ulteriore e complesso approccio -omico finalizzato al profiling dell'attività (Gomase *et al.*, 2008). Il termine metaboloma indica il complesso set di metaboliti (intermedi metabolici, metaboliti secondari, ormoni ed altre molecole segnale) presenti all'interno di un campione biologico (Oliver *et al.*, 1998). La metabonomica è definita come “the quantitative measurement of the time-related multiparametric metabolic response of living systems to pathophysiological stimuli or genetic modification” (Nicholson *et al.*, 1999). La combinazione di spettroscopia NMR e tecniche di analisi di dati chemiometrici costituisce uno dei metodi più efficienti nel generare profili metabolici di campioni biologici (Nicholson *et al.*, 1999). In recenti review, Nicholson *et al.* (2005), e Goodacre (2007) discutono come la metabolomica possa essere applicata allo studio dell'impatto di farmaci e nutrienti sull'interazione tra ospite e comunità microbica intestinale, e come possa essere particolarmente utile nello studio del quorum sensing o di altri sistemi di comunicazione esistenti all'interno del tratto gastrointestinale. Marchesi *et al.* (2007) hanno impiegato un approccio metabonomico non invasivo per caratterizzare gli estratti fecali di pazienti affetti da IBD. Lo studio illustra le potenzialità della metabonomica come tool diagnostico per la differenziazione di pazienti affetti da UC (ulcerative colitis) e CD (Crohn's disease), e per il monitoraggio nel tempo della patologia. Più recentemente, la combinazione di spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR ad alta risoluzione e tecniche di multivariate pattern recognition, ha consentito una caratterizzazione sistematica della composizione fecale in uomo, topo e ratto (Saric *et al.*, 2008). Benché un discreto numero di metaboliti, tra cui SCFA e amminoacidi ramificati, sia risultato comune alle tre specie, ciascuna di esse ha generato un profilo unico, con glicerolo e malonato presenti solo negli estratti fecali umani.

Li *et al.* (2008) hanno dimostrato la validità di un approccio transgenomico per correlare microbioma intestinale e variazioni in fenotipi metabolici (metabotipi). La combinazione di tool spettroscopici, microbiomici e di analisi statistica multivariata, ha consentito l'analisi di di campioni urinari e fecali ed il successivo modelling delle interazioni metaboliche microbiota-ospite. Variazioni nella popolazione di *F. prausnitzii* (uno dei più significativi produttori di n-butirrato a livello intestinale) sono state, ad esempio, associate alla modulazione di 8 metaboliti urinari di struttura diversa (dimetilammina, taurina, lattato, glicina, 2-idrossiisobutirrato, glicolato, 3,5-idrossibenzoato, 3-amminoisobutirrato), il che indica come questa specie batterica sia un membro del microbioma intestinale estremamente attivo dal punto di vista funzionale e capace di influenzare numerosi pathway dell'ospite. Li *et al.* (2008) hanno, inoltre, introdotto il concetto di metagenomica funzionale, definita come “the characterization of key functional members of the microbiome that most influence host metabolism and hence health”.

## Phylum *Actinobacteria*

### Caratteristiche generali

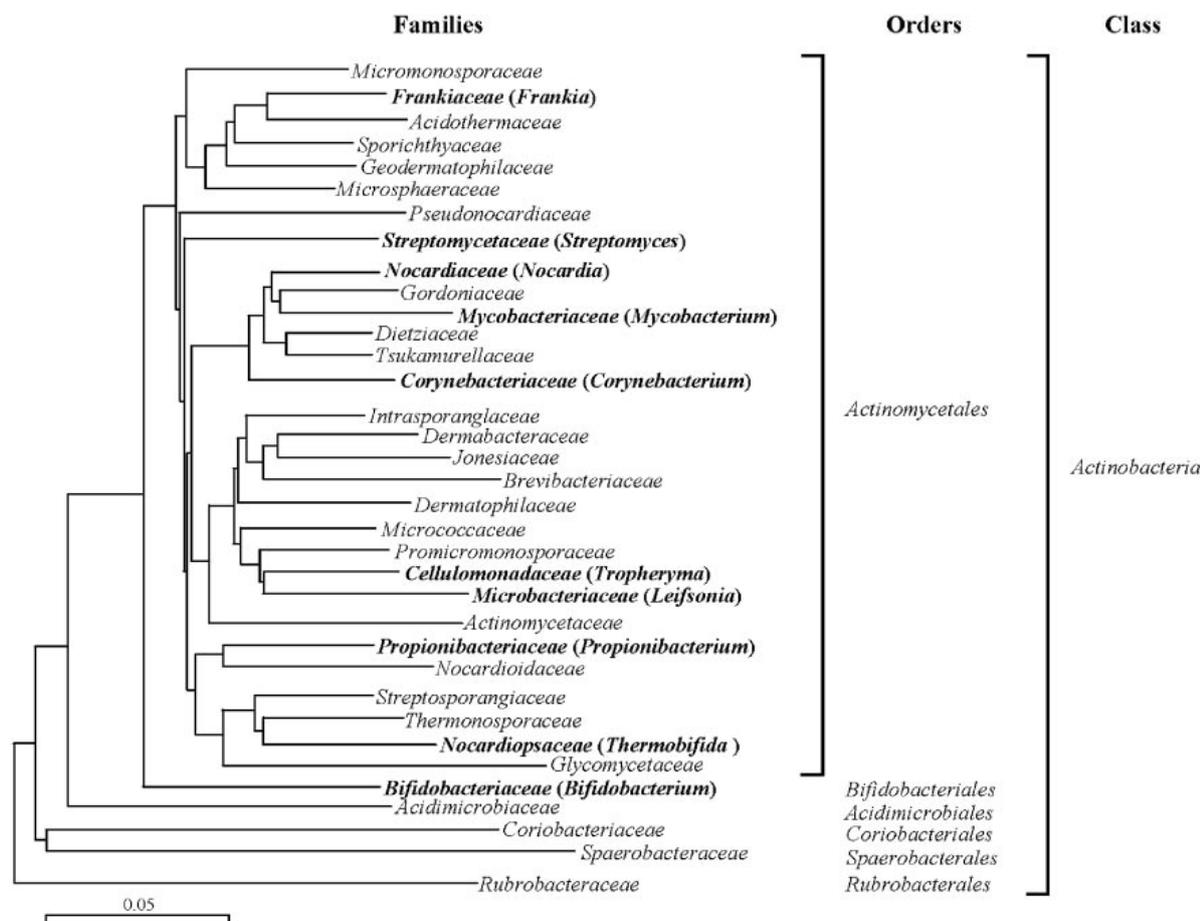
In termini di numero e diversità delle specie identificate, il phylum *Actinobacteria* rappresenta una delle maggiori unità tassonomiche tra i 18 principali lineage attualmente riconosciuti all'interno del dominio *Bacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Le 5 sottoclassi ed i 14 subordini (Stackebrandt, 2000) di *Actinobacteria* comprendono batteri Gram-positivi caratterizzati da un alto contenuto G+C, variabile dal 51% in alcuni corynebacteria fino al 70% in *Streptomyces* e *Frankia*. Un'eccezione è rappresentata dal patogeno obbligato *Tropheryma whipplei*, il cui genoma possiede un contenuto G+C inferiore al 50%.

Una morfologia estremamente varia [coccoide (*Micrococcus*), sia coccoide che a bastoncino (ad es. *Arthrobacter*), a forma di ife frammentate (ad es. *Nocardia* spp.), o micelio permanente altamente differenziato (ad es. *Streptomyces* spp.)] caratterizza il phylum *Actinobacteria* (Atlas, 1997). Differenti sono anche le proprietà fisiologiche e metaboliche di questi microrganismi, quali produzione di un ampio range di enzimi extracellulari e soprattutto formazione di una varietà di metaboliti secondari (Schrempf, 2001), la maggior parte dei quali potenti antibiotici (Lechevalier e Lechevalier, 1967), una caratteristica che ha reso la specie *Streptomyces* la primaria produttrice di antibiotici impiegata nelle industrie farmaceutiche (Berdy, 2005). Relativamente agli stili di vita, il phylum *Actinobacteria* comprende patogeni (ad es. *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp., e *Propionibacterium* spp.), microrganismi del suolo (*Streptomyces* spp.), commensali delle piante (*Leifsonia* spp.), simbionti azoto fissatori (*Frankia*), e abitanti del tratto gastrointestinale (*Bifidobacterium* spp.). Gli *Actinobacteria* risultano ampiamente distribuiti in ecosistemi sia terrestri che acquatici, ma soprattutto nel suolo, dove svolgono un ruolo fondamentale nel riciclo di biomateriale refrattario mediante decomposizione e formazione di humus (Goodfellow e Williams, 1983; Stach e Bull, 2005). In particolare, ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium* sono impiegati come ingredienti attivi in una varietà di functional food. Le loro proprietà health-promoting o probiotiche includono protezione contro patogeni mediata da processi di esclusione competitiva, attività bile salt hydrolase, modulazione del sistema immune, e capacità di aderire al muco o all'epitelio intestinale (Lievin *et al.*, 2000; Ouwehand *et al.*, 2002; Stanton *et al.*, 2005).

### Tassonomia

L'analisi delle sequenze del gene 16S rRNA ha consentito l'identificazione di 39 famiglie e 130 generi nel phylum *Actinobacteria*, inclusi batteri Gram-positivi ad alto contenuto G+C caratterizzati da semplici morfologie, quali bifidobatteri e micrococchi (Fig. 12) (Embley e Stackebrandt, 1994). Nell'albero filogenetico degli *Actinobacteria*, una distinta ramificazione separa i bifidobatteri da tutte le altre famiglie note.

Il phylum *Actinobacteria* appare caratterizzato da una sinapomorfia molecolare unica: un'inserzione omologa di circa 100 nucleotidi tra le eliche 54 e 55 del gene 23S rRNA (Roller *et al.*, 1992).



**Fig. 12.** Albero filogenetico del phylum *Actinobacteria*.

L'albero è stato costruito da Ventura *et al.* (2007a), sulla base delle sequenze del gene 16S rRNA. La scale bar indica 5 nucleotidi. Le famiglie contenenti membri di cui è stato sequenziato l'intero genoma, sono riportate in grassetto.

## Genome sequencing projects

Il genoma di *M. tuberculosis* H37Rv è stato il primo ad essere interamente sequenziato (Cole *et al.*, 1998). Negli ultimi anni, sono state rese disponibili le sequenze genomiche di altri 44 *Actinobacteria* (in alcuni casi si tratta di differenti ceppi appartenenti alla stessa specie) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) (Tab. 5). A differenza della maggior parte dei genomi di Tab. 5, che sono circolari come quasi tutti i genomi batterici, i genomi di *Streptomyces*, così come quelli di altri *Actinobacteria* miceliali non ancora sequenziati, risultano lineari (Redenbach *et al.*, 2000).

**Tab. 4.** Genomi batterici sequenziati nel phylum *Actinobacteria*.

<b>Microrganism</b>	<b>Genome size (bp)</b>	<b>No. of ORFs</b>	<b>% G+C content</b>	<b>No. of rRNA operons</b>	<b>No. of tRNAs</b>	<b>No. of pseudogenes</b>	<b>Reference</b>
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	2,443,540	2,217	66	1	56	4	NCBI source NC_008578
<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	4,597,686	4,208	62	6	73	94	Mongodin <i>et al.</i> , 2006
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	2,089,645	1,701	59	5	70	ND	NCBI source NC_008618
<i>Bifidobacterium longum</i> biotype longum NCC2705	2,266,000	1,730	60	4	66	ND	Schell <i>et al.</i> , 2002
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382	3,297,891	3,068	72	2	60	24	NCBI source NC_009480
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 13129	2,488,635	2,320	54	5	54	48	Cerdeno-Tarraga <i>et al.</i> , 2003
<i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314	3,147,090	2,950	64	5	56	ND	Nishio <i>et al.</i> , 2003
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	3,309,401	2,993	54	5	60	ND	Ikeda and Nakagawa, 2003
<i>Corynebacterium glutamicum</i> R	3,314,179	3,128	54	6	76	ND	Yukawa <i>et al.</i> , 2007
<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	2,462,499	2,104	61	3	50	68	Tauch <i>et al.</i> , 2005
<i>Frankia alni</i> ACN14a	7,497,934	6,786	72	2	63	12	Normand <i>et al.</i> , 2007
<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	8,982,042	7,377	71	3	59	128	NCBI source NC_009921
<i>Frankia</i> sp. strain Cc13	5,433,628	4,618	70	2	61	50	NCBI source NC_007777
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	4,761,183	4,576	74	4	64	32	NCBI source NC_009664
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTCB07	2,584,158	2,351	68	1	49	307	Monteiro-Vitorello <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycobacterium avium</i> 104	5,475,491	5,313	68	1	50	143	NCBI source NC_008595
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	4,829,781	4,350	69	1	47	0	Li <i>et al.</i> , 2005
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	4,345,492	3,953	66	1	49	23	Garnier <i>et al.</i> , 2003
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. <i>Pasteur</i> 1173P2	4,374,522	4,036	65	1	52	32	Brosch <i>et al.</i> , 2007
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	5,619,607	5,327	67	2	55	32	NCBI source NC_009338
<i>Mycobacterium leprae</i> TN	3,268,203	1,605	58	1	49	1116	Cole <i>et al.</i> , 2001
<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155	6,988,209	6,938	67	2	54	168	NCBI source NC_008596
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	4,424,435	3,998	65	1	48	9	NCBI source NC_009565
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	4,419,977	4,084	65	1	50	ND	NCBI source NC_009525
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	4,411,532	3,994	66	1	49	6	Cole <i>et al.</i> , 1998
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	4,403,836	4,250	66	1	49	ND	Fleischmann <i>et al.</i> , 2002
<i>Mycobacterium ulcerans</i> Agy99	5,631,606	4,981	65	1	50	771	Stinear <i>et al.</i> , 2007
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	6,491,865	6,136	67	2	58	99	NCBI source NC_008726

<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	6,048,425	5,845	68	2	57	49	NCBI source NC_009077
<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	5,737,227	5,551	68	2	57	34	NCBI source NC_008705
<i>Mycobacterium</i> sp. strain MCS	5,705,448	5,391	68	2	59	21	NCBI source NC_008146
<i>Nocardia farcinica</i> IFM10152	6,021,225	5,674	71	3	61	0	Ishikawa <i>et al.</i> , 2004
<i>Nocardioides</i> sp. JS614	4,985,871	4,755	71	2	55	55	NCBI source NC_008699
<i>Propionibacterium acnes</i> KPA171202	2,560,265	2,297	60	3	51	17	Bruggemann <i>et al.</i> , 2004
<i>Renibacterium salmoninarum</i> ATCC 33209	3,155,250	3,558	56	2	51	ND	NCBI source NC_010168
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	7,804,765	7,279	67	4	63	5	McLeod <i>et al.</i> , 2006
<i>Rubrobacter xylanophilus</i> DSM 9941	3,225,748	3,281	70	1	63	77	NCBI source NC_008148
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	8,212,805	7,264	71	4	62	1	Oliynyk <i>et al.</i> , 2007
<i>Salinispora arenicola</i> CNS- 205	5,786,361	5,172	69	3	63	192	NCBI source NC_009953
<i>Salinispora tropica</i> CNB-440	5,183,331	4,654	69	3	61	57	NCBI source NC_009380
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	8,667,507	7,769	72	6	80	56	Bentley <i>et al.</i> , 2002
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	9,025,608	7,577	70	6	82	0	Ikeda <i>et al.</i> , 2003
<i>Thermobifida fusca</i> YX	3,642,249	3,110	67	4	63	7	Lykidis <i>et al.</i> , 2007
<i>Tropheryma whipplei</i> TW08/27	925,938	783	46	1	54	1	Bentley <i>et al.</i> , 2003
<i>Tropheryma whipplei</i> Twist	927,303	808	46	1	54	0	Raoult <i>et al.</i> , 2003

ND, not determined.

## Genere *Bifidobacterium*

### Storia e tassonomia

I bifidobatteri sono stati isolati per la prima volta nel 1899 ad opera di Tissier, dalle feci di neonati allattati con latte materno. Questi microrganismi Gram-positivi, anaerobi, non produttori alcun tipo di gas, furono denominati per la loro morfologia bifida *Bacillus bifidus*. In seguito Orla-Jensen, studiando i batteri produttori di acido lattico, osservò come anche *B. bifidus* fosse in grado di produrre tale acido e lo classificò nella famiglia delle *Lactobacteriaceae*, con la denominazione di *Lactobacillus bifidus*. Nonostante già nel 1924 Orla-Jensen avesse proposto il genere *Bifidobacterium* come taxon separato (Orla-Jensen, 1924), la denominazione *L. bifidus*, basata esclusivamente su elementi morfologici e sull'analisi dei prodotti di fermentazione, permase fino agli anni '70. L'attribuzione di una collocazione tassonomica certa per *B. bifidus* era resa complicata soprattutto dall'elevato polimorfismo.

Nel 1957 si conclude quello che Poupard *et al.* (1973) chiamano “primo periodo”, durante il quale non vi fu nessuna rilevante novità nella conoscenza dei bifidobatteri, per via delle difficoltà incontrate nel definire un mezzo di coltura adatto all'isolamento ed al mantenimento dei microrganismi.

Nel “secondo periodo” viene individuato un terreno complesso in grado di consentire la crescita selettiva di *B. bifidus*, permettendo così di basare la classificazione su prove biochimiche oltre che su elementi morfologici. Dehnert per primo propose di suddividere i bifidobatteri in cinque gruppi in base alle loro capacità di fermentare 24 zuccheri (Dehnert, 1957). Questo studio fu approfondito e ampliato da Reuter (1963) che, sulla base delle caratteristiche fermentative e sierologiche, identificò e classificò 7 nuove specie di origine umana: *B. bifidus* var. a e b, *B. infantis*, *B. parvulorum* var. a e b, *B. breve* var. a e b, *B. liberorum*, *B. lactensis*, *B. adolescentis* var. a e b e *B. longum* var. a e b. Nel 1969 Mitsuoka, estendendo gli studi dall'uomo agli animali, definì due sottospecie di *B. longum* (*animalis* a e b) e due nuove specie isolate da feci di maiale, pollo, vitello e ratto: *B. thermophilum* e *B. pseudolongum*. Dal ruminale di buoi e cavalli furono isolate le specie *B. ruminale* e *B. globosum* (Scardovi *et al.*, 1969), mentre nell'intestino di ape furono scoperte tre nuove specie dalla morfologia del tutto peculiare: *B. asteroides*, *B. indicum* e *B. coryneforme* (Scardovi e Trovatelli, 1969). Questi ultimi studi si avvalsero dell'individuazione di una via fermentativa caratteristica dei bifidobatteri (Scardovi e Trovatelli, 1965; De Vries *et al.*, 1967), il cui enzima chiave è rappresentato dalla fruttosio-6-P fosfochetolasi. Tale attività enzimatica, presente negli estratti cellulari, dimostra l'appartenenza delle cellule esaminate al genere *Bifidobacterium*. La presenza di questo pathway metabolico permette di differenziare inoltre il genere *Bifidobacterium* dai lactic acid bacteria (LAB), tra cui è stato, invece, tradizionalmente classificato [sulla base dell'analisi della struttura della mureina (Kandler e Lauer, 1974)], nonostante la scarsa correlazione filogenetica. I LAB comprendono specie batteriche Gram-positive e catalasi-negative, in grado di produrre acido lattico come principale prodotto finale della fermentazione di carboidrati.

Una svolta decisiva si ebbe con i dati riguardanti l'ibridazione DNA-DNA (Scardovi *et al.*, 1970; Scardovi *et al.*, 1971) che stabilirono quantitativamente il grado di omologia tra due specie, fornendo un criterio tassonomico molto più significativo ed indipendente dall'habitat del

microrganismo. Isolati caratterizzati da un valore di ibridazione DNA-DNA maggiore del 70% e/o con una differenza inferiore al 5% nelle temperature di melting, sono considerati appartenenti alla stessa specie. Tali dati furono messi in relazione con i pattern elettroforetici di proteine solubili, anch'essi usati a scopo sistematico (Biavati *et al.*, 1982).

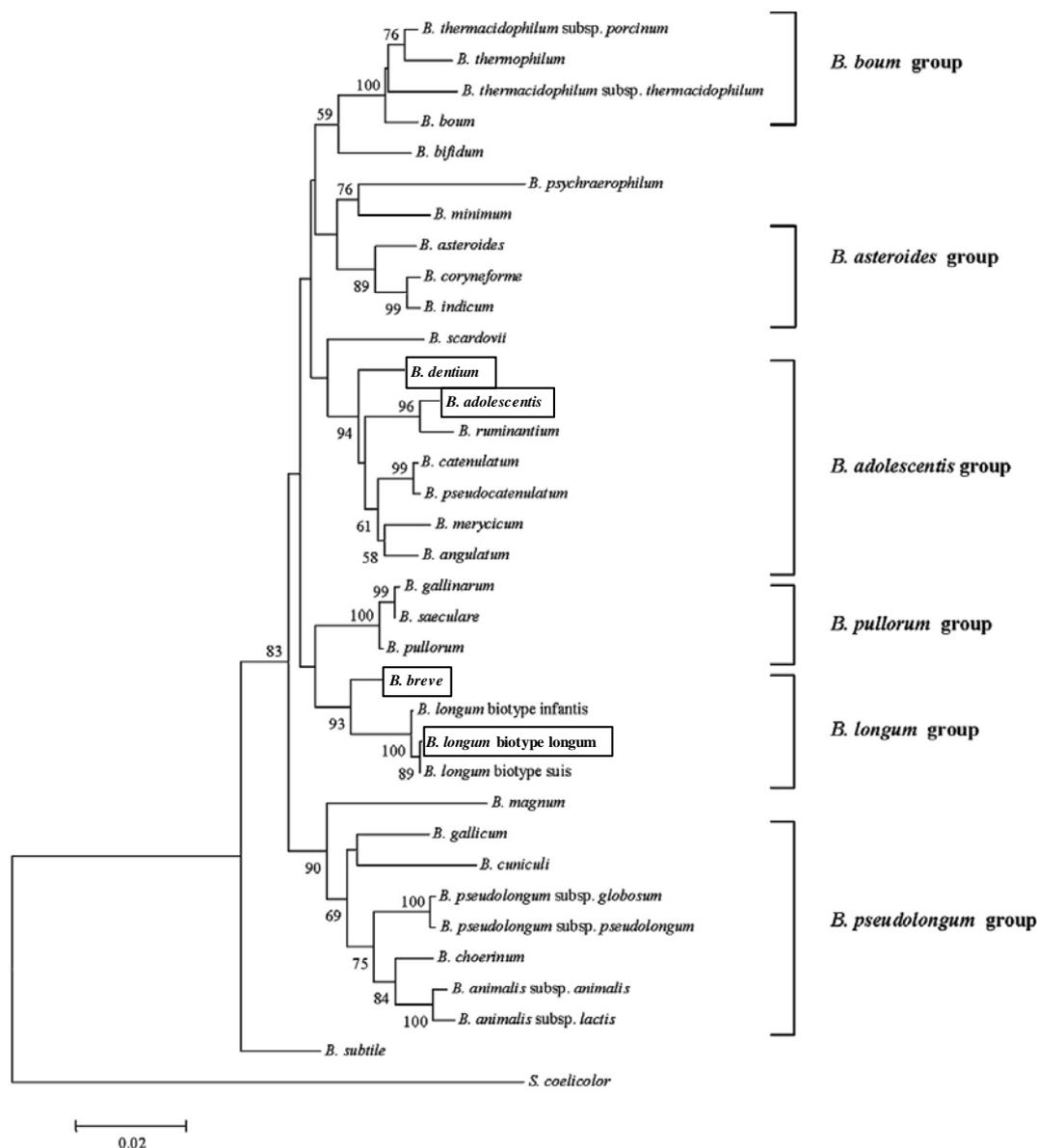
Recentemente, nella tassonomia dei bifidobatteri, è diventata pratica comune l'analisi della sequenza del gene 16S rRNA (Matsuki *et al.*, 1998, 1999; Ventura *et al.*, 2001a, 2001b, 2003a; Ventura e Zink, 2002), o di geni housekeeping, quali *recA* (Kullen *et al.*, 1997; Ventura e Zink, 2003c), *tufA* (Ventura *et al.*, 2003b), *atpD* (Ventura *et al.*, 2004a), *groEL* (Jian *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2004b), *dnaK* (Ventura *et al.*, 2005a), *grpE* (Ventura *et al.*, 2005a), *clpP* (Ventura *et al.*, 2005d), e *hrcA* (Ventura *et al.*, 2005c). Questo tipo di identificazione si basa sull'amplificazione specifica di frammenti di DNA, successiva reazione di sequenziamento e confronto con i database pubblici, procedure che, al contrario dei test di ibridazione a DNA, sono rapide, riproducibili ed economiche (Gevers *et al.*, 2005). Tuttavia, alberi costruiti sulla base di un singolo gene non riflettono in maniera adeguata le relazioni filogenetiche, a causa di possibili eventi di HGT, ricombinazione genica, e frequenze di mutazione incongruenti. Solo la costruzione di un albero filogenetico basato su un set di allineamenti combinati di proteine ortologhe conservate [supertree (Bininda-Emonds, 2004)] è in grado di rappresentare in maniera affidabile le relazioni evolutive tra batteri (Brown *et al.*, 2001). Una recente analisi filogenetica del genere *Bifidobacterium*, effettuata mediante un approccio di concatenazione multigenico, ha mostrato un incremento nella capacità discriminatoria e nella solidità dell'albero filogenetico così ottenuto (Ventura *et al.*, 2006b). Inoltre, tale analisi ha evidenziato come il progenitore di tutti i gruppi di *Bifidobacterium* fino ad ora noti sia strettamente correlato all'attuale specie *B. asteroides*.

La disponibilità di intere sequenze genomiche ha consentito l'identificazione di numerosi altri marker molecolari finalizzati alla detection di questi microrganismi (Gao e Gupta, 2006). In particolare, sono state identificate > 30 proteine specifiche per *B. longum* biotype longum NCC2705, > 90 proteine presenti unicamente in ceppi di *B. longum* biotype longum, e > 70 proteine che sembrano caratteristiche delle diverse specie di *Bifidobacterium* (*B. longum* biotype longum NCC2705, *B. longum* biotype longum DJO10A, e *B. adolescentis*) (Gao e Gupta, unpublished results) ([www.bacterialphylogeny.com](http://www.bacterialphylogeny.com)).

La presenza di inserzioni/delezioni conservate all'interno di sequenze codificanti per subunità I della citocromo c ossidasi, CTP sintetasi e glutamil-tRNA sintetasi, e nel gene 23S rRNA, costituisce una caratteristica molecolare condivisa da bifidobatteri e altri *Actinobacteria* (Gao e Gupta, 2005). Recenti evidenze suggeriscono, in particolare, una forte correlazione tra specie appartenenti all'ordine *Bifidobacteriales* e membri dell'ordine *Micrococccineae* (*Arthrobacter*, *Tropheryma*, *Leifsonia*, *Kinenococcus*, etc.), entrambi "deep-branching lineage" all'interno del phylum *Actinobacteria* (Gao e Gupta, 2006).

In base al Taxonomic Outline of the Prokaryotes (Garrity *et al.*, 2004), la famiglia *Bifidobacteriaceae*, unica all'interno dell'ordine *Bifidobacteriales*, è costituita da 6 generi, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Scardovia*, *Parascardovia*, *Aeriscardovia* e *Falcivibrio* (Stackebrandt, 2000; Felis e Dellaglio, 2007), di cui solo *Bifidobacterium* contiene più di una specie. Gli altri generi comprendono *Aeriscardovia aeriphila*, *Gardnerella vaginalis*, *Parascardovia denticolens* (inizialmente classificata come *B. denticolens*) e *Scardovia inopinata* (inizialmente classificata come *B. inopinum*). Le specie appartenenti al genere *Falcivibrio*, *F. grandis* e *F. vaginalis*, sono state trasferite al genere *Mobiluncus* e, rispettivamente, alle specie *M.*

*mulieris* e *M. curtisii* (Hoyles *et al.*, 2004), che appartengono all'ordine *Actinomycetales*, subordine *Actinomycineae*, famiglia *Actinomycetaceae* (Garrity *et al.*, 2004). Il genere *Bifidobacterium* contiene 6 cluster filogenetici, denominati *B. boum*, *B. asteroides*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. pullorum* e *B. pseudolongum* (Fig. 13) (Ventura *et al.*, 2006b).



**Fig. 13.** Albero filogenetico del genere *Bifidobacterium*.

L'albero è stato costruito da Ventura *et al.* (2007b), sulla base delle sequenze del gene 16S rRNA, utilizzando come radice *S. coelicolor*. La scale bar rappresenta le distanze calcolate. I rettangoli indicano specie di *Bifidobacterium* di cui è disponibile la sequenza genomica intera o parziale.

## Caratteristiche generali

I bifidobatteri sono bastoncelli dalle estremità bifide (a forma di Y), dalle dimensioni comprese tra i 2 ed i 5  $\mu\text{m}$ , visibili come entità singole, ma anche in forma di catene o aggregati. Si tratta di microrganismi saccarolitici, anaerobi, immobili, asporigeni, non filamentosi e non produttori di gas. Sono catalasi-negativi, tranne alcune eccezioni (*B. indicum* e *B. asteroides* quando crescono in

presenza di aria). Il contenuto G+C del loro genoma varia dal 42 al 67 mol% (Biavati e Mattarelli, 2001).

Delle 29 specie di *Bifidobacterium* attualmente riconosciute, fino ad ora è stato sequenziato il genoma di soli 5 ceppi appartenenti ai cluster filogenetici *B. longum* e *B. adolescentis* (Tab. 5). Sequenze genomiche complete sono disponibili per *B. longum* biotype longum NCC2705 (Schell *et al.*, 2002), *B. breve* UCC2003 (Leahy S, O'Connell-Motherway M, Moreno Munoz JA, Higgins D, Fitzgerald GF, van Sinderen D, manuscript in preparation), e *B. adolescentis* ATCC 15703 (NCBI source NC\_008618). Le sequenze genomiche di *B. longum* biotype longum DJO10A (O'Sullivan *et al.*, unpublished results; NCBI source NZ\_AABM00000000) e *B. dentium* Bd1 sono prossime al completamento e, probabilmente, saranno presto disponibili anche le sequenze dei genomi di *B. breve* M-16V, *B. breve* Yacult, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum* biotype longum e *B. longum* biotype infantis (Liu *et al.*, 2005). Tali genomi, di dimensioni comprese tra 1.9 e 2.9 Mb, mostrano caratteristiche strutturali tipiche di un cromosoma batterico, quali (i) co-orientamento di trascrizione genica e replicazione del DNA (McLean *et al.*, 1998); (ii) maggiore preponderanza di G e ridotto numero di C nella composizione nucleotidica del leading strand di DNA (Frank e Lobry, 1999); (iii) presunta origine di replicazione (Qin *et al.*, 1999), caratterizzata da una costellazione di geni attorno all'origine stessa (ad es. *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, e *recF*), da una particolare asimmetria dei nucleotidi GC ( $[G-C]/[G+C]$ ), e dalla presenza, immediatamente a monte del gene *dnaA*, di box multipli DnaA e sequenze ricche in AT (Christensen *et al.*, 1999).

In *Bifidobacterium*, il numero di operoni rRNA può variare da 1 a 5 (Candela *et al.*, 2004), il che probabilmente riflette le differenti strategie ecologiche (Klappenbach *et al.*, 2000). Anche il numero di geni tRNA, nei genomi di *Bifidobacterium* sequenziati fino ad ora, è variabile (54 in *B. breve* UCC2003, 56 in *B. longum* biotype longum NCC2705, 70 in *B. adolescentis*). I tRNA sono risultati rappresentativi di tutti e 20 gli amminoacidi e ridondanti per tutti, tranne che per cisteina, istidina, isoleucina, fenilalanina e triptofano.

**Tab. 5.** Caratteristiche generali dei genomi di *Bifidobacterium*.

General features	<i>B. longum</i> biotype longum NCC2705	<i>B. longum</i> biotype longum DJO10A	<i>B. breve</i> UCC2003	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	<i>B. dentium</i> Bd1
Status	F	UF	F	F	UF
Genome size (bp)	2,256,646	2,375,800	2,422,668	2,089,645	~ 2,600,000
No. of ORFs	1732	1811	1868	1,701	~ 2270
% G+C content	60	60	58.73	59	59.2
No. of rRNA operons	4	4	2	5	-
No. of tRNAs	57	58	54	70	54
Intact insertion sequence elements	16	-	26	-	-
Prophage-like sequences	1 (BI-1)	1 (Blj-1)	1 (Bbr-1)	-	2
Reference	Schell <i>et al.</i> , 2002	GenBank NZ_AABM00000000	UCC Unpublished	Gifu University, GenBank AP009256	UniPR&UCC, Unpublished

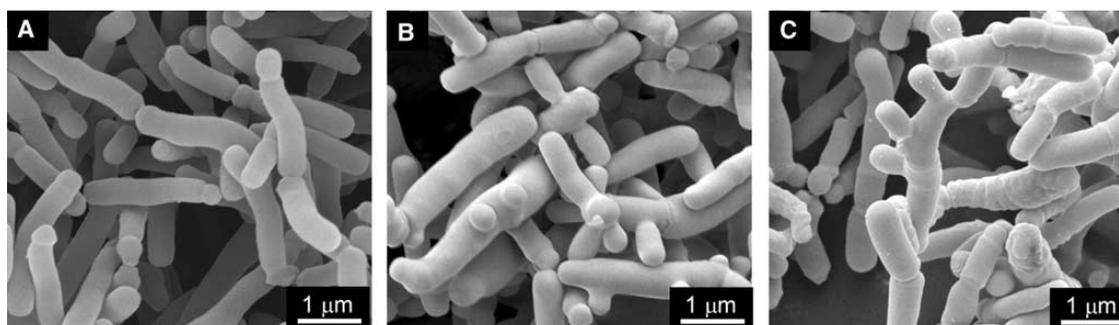
F, finished; UF, unfinished.

UCC, National University of Ireland, Cork, Ireland; UniPr, University of Parma, Italy.

-, not available.

## Morfologia

La forma a bastoncello che caratterizza il genere *Bifidobacterium* viene mantenuta solamente in condizioni nutrizionali ottimali, quali quelle che caratterizzano l'habitat naturale, mentre in colture di laboratorio vengono osservate forme irregolari con rigonfiamenti, protuberanze e ramificazioni. Tale pleomorfismo è stato attribuito a particolari richieste nutrizionali probabilmente determinate da una composizione della parete cellulare più complessa rispetto ad altri generi. L'ipotesi è avvalorata dall'osservazione che lo sviluppo in mezzi di coltura privi di N-acetil-ammino-zuccheri, precursori nella sintesi della parete cellulare, induce la comparsa di forme irregolari (Glick *et al.*, 1960). Lo stesso effetto è stato riscontrato in presenza di NaCl, mentre un'azione contraria sembra essere associata agli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  (Kojima *et al.*, 1970a, 1970b). Una reversione dalla forma irregolare alla forma bastoncellare è stata osservata in bifidobatteri cresciuti in terreno minimo, in seguito all'aggiunta nel terreno colturale degli amminoacidi alanina, acido aspartico, acido glutammico e serina (Husain *et al.*, 1972). Oltre alle condizioni colturali (Biavati e Mattarelli, 2001), il morfotipo del genere *Bifidobacterium* può variare in relazione anche a specie e fase di crescita (Fig. 14) (Klijn *et al.*, 2005).



**Fig. 14.** *B. longum* NCC2705 al microscopio elettronico.

Le cellule sono state cresciute in MRS in anaerobiosi. In fase esponenziale (A) si può osservare la tipica forma bastoncellare, mentre in fase di transizione (B) e stazionaria (C) prevale la forma ramificata.

## Fisiologia

Le condizioni ottimali per la crescita di *Bifidobacterium* sono rappresentate da una temperatura compresa tra 36° e 38°C, e da un valore di pH tra 6 e 7 (a pH inferiori a 5.5 non viene generalmente osservata crescita). Benché sia richiesta anaerobiosi stretta, i diversi ceppi possono presentare variabilità nella tolleranza all'O<sub>2</sub> sia in termini quantitativi che per i meccanismi biochimici alla base di tale sensibilità (De Vries e Stouthamer, 1968). Discriminanti sono la presenza ed il livello dell'attività catalasica, responsabile della rimozione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ed il potenziale redox del terreno di coltura, che deve essere basso. L'assenza di catalasi provoca un accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che inibisce la fruttosio-6-P fosfochetolasi, enzima chiave dei processi fermentativi in *Bifidobacterium*, con conseguente inibizione della crescita. Tuttavia, in alcuni ceppi anaerobi stretti è presente una debole attività catalasica e l'assenza di sviluppo si giustifica con l'accumulo di O<sub>2</sub> nel mezzo di coltura, che porta ad un aumento del potenziale redox.

## Habitat

I bifidobatteri sono stati isolati da nicchie ecologiche differenti ma connesse tra di loro: intestino di mammiferi [nel microbiota umano di neonati predominano *B. breve* e *B. longum* biotype infantis; in quello adulto *B. adolescentis*, *B. longum* biotype longum e *B. catenulatum* (Satokari *et al.*, 2001)], cavità orale umana (*B. dentium*), cibo (*B. animalis* subsp. *lactis*), intestino di insetti (*B. asteroides*, *B. indicum*, e *B. coryneforme*), acque di scolo e liquami di fogna (*B. minimum* e *B. subtile*) (Tab. 6).

**Tab. 6.** Specie appartenenti al genere *Bifidobacterium* ed origine ecologica.

<b>Species</b>	<b>Origin</b>
<i>B. breve</i>	Infant feces
<i>B. bifidum</i>	Infant feces
<i>B. subtile</i>	Sewage
<i>B. asteroides</i>	Hindgut of honeybee
<i>B. magnum</i>	Rabbit feces
<i>B. adolescentis</i>	Intestine of adult
<i>B. catenulatum</i>	Intestine of adult
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Infant feces
<i>B. indicum</i>	Hindgut of honeybee
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Swine feces
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Bovine rumen
<i>B. gallicum</i>	Human feces
<i>B. cuniculi</i>	Rabbit feces
<i>B. psychraerophilum</i>	Porcine feces
<i>B. angulatum</i>	Human feces
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Yoghurt
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Animal feces
<i>B. dentium</i>	Dental caries
<i>B. thermophilum</i>	Swine feces
<i>B. longum</i> biotype longum	Intestine of adult
<i>B. longum</i> biotype infantis	Intestine of infant
<i>B. longum</i> biotype suis	Swine feces
<i>B. choerinum</i>	Swine feces
<i>B. merycicum</i>	Bovine rumen
<i>B. minimum</i>	Sewage
<i>B. saeculare</i>	Rabbit feces
<i>B. gallinarum</i>	Chicken cecum
<i>B. pullorum</i>	Chicken feces
<i>B. thermoacidophilum</i> subsp. <i>thermoacidophilum</i>	Waste water
<i>B. ruminantium</i>	Bovine rumen
<i>B. thermoacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Piglet feces
<i>B. boum</i>	Rumen cattle
<i>B. coryneforme</i>	Hindgut of honeybee
<i>B. scardovii</i>	Human blood

L'intestino dei mammiferi rappresenta, sicuramente, l'habitat più naturale per la sopravvivenza e la moltiplicazione di *Bifidobacterium*. I bifidobatteri sono, infatti, presenti nelle feci animali ed umane, e soprattutto nei neonati allattati con colostro, grazie alla presenza di N-acetilglucosammina e altri saccaridi in quantità maggiori rispetto al latte vaccino. I bifidobatteri costituiscono circa il 3-5% dell'intero microbiota intestinale, anche se il loro reale contributo può variare tra individui e in relazione all'età e alla dieta (Favier *et al.*, 2002; Lay *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2005; Zoetendal *et al.*, 2006). A livello del tratto gastrointestinale, i bifidobatteri possono essere presenti sia come autoctoni che alloctoni (Tannock, 1999). Diversamente dai lattobacilli, i

bifidobatteri non sono componenti naturali degli alimenti, ma vengono intenzionalmente addizionati a questi per via dei potenziali effetti benefici sulla salute dell'ospite. Dopo ingestione di tali preparazioni, i bifidobatteri alloctoni persistono nel tratto gastrointestinale ma solo per brevi periodi di tempo (Ouwehand *et al.*, 2004; Bartosch *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005). I ceppi che fino ad ora hanno mostrato proprietà probiotiche, appartengono alle specie *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* biotype infantis e *B. longum* biotype longum; si tratta di specie non correlate dal punto di vista filogenetico, il che sottolinea la ceppo-specificità di tali caratteristiche. All'interno dell'intestino umano, i bifidobatteri sono in grado di fermentare una grande varietà di oligosaccaridi, alcuni dei quali non digeriti dall'ospite e commercialmente impiegati al fine di incrementare *in situ* il numero di bifidobatteri così come di altri batteri probiotici [prebiotic concept (Gibson e Roberfroid, 1995)].

Altre nicchie colonizzate dai bifidobatteri sono costituite dalla cavità orale, che ospita *B. adolescentis* e *B. dentium*, probabilmente coinvolto nella formazione della carie (Scardovi e Crociani, 1974), e dalla vagina, in cui sono presenti *B. breve*, *B. longum* e *B. adolescentis*.

I bifidobatteri sono stati ampiamente studiati e caratterizzati negli animali, soprattutto erbivori ruminanti. Alcune specie sembrano avere specificità d'ospite: *B. magnum* e *B. cuniculi* (Scardovi *et al.*, 1979) sono presenti solo nelle feci di coniglio; *B. pullorum* (Trovatelli *et al.*, 1974) e *B. gallinarum* (Watabe *et al.*, 1983) solo in feci di pollo; *B. suis* (Matteuzzi *et al.*, 1971) nelle feci di suino.

## Nutrizione, metabolismo e capacità biosintetiche

Richieste nutrizionali piuttosto eterogenee caratterizzano il genere *Bifidobacterium*. Molte specie utilizzano sali di ammonio come unica fonte azotata (Hassinen *et al.*, 1951), mentre altre richiedono l'aggiunta nel mezzo di coltura di composti azotati organici (Matteuzzi *et al.*, 1978). L'azoto assunto dal terreno viene utilizzato per la biosintesi di vari amminoacidi, soprattutto alanina, valina e acido aspartico. Anche la richiesta di vitamine è variabile all'interno del genere (Trovatelli e Biavati, 1978). Possono essere sintetizzate diverse vitamine idrosolubili come tiamina, acido folico, acido nicotinico, piridossina e vitamina B12 (Deguchi *et al.*, 1985), mentre la riboflavina deve essere aggiunta al terreno di coltura per consentire la crescita dei bifidobatteri. Studi riguardanti la richiesta di elementi metallici sono stati condotti su *B. bifidum* da Bezkorovainy e Toupuzian (Bezkorovainy e Topouzian, 1983; Topouzian *et al.*, 1984). In particolare, sono stati chiariti gli aspetti riguardanti il metabolismo ed i meccanismi di uptake di  $Fe^{2+}$ ; i risultati indicano come pompe elettrogeniche dipendenti da gradienti protonici possano essere coinvolte nella cattura di questo ione.

Le informazioni relative alle capacità biosintetiche di *Bifidobacterium* sono piuttosto limitate e, fino ad ora, basate sull'analisi della sequenza genomica solo di *B. longum* biotype longum NCC2705 (Schell *et al.*, 2002). Nel suo genoma, sono presenti i geni responsabili della sintesi di almeno 19 amminoacidi a partire da ammonio o da altri precursori biosintetici quali fosfoenolpiruvato, oxaloacetato, oxoglutarato e fumarato (quest'ultimo fornito da un parziale ciclo di Krebs, in cui mancano gli enzimi fumarasi, oxoglutarato deidrogenasi e malato deidrogenasi). L'assenza, invece, dei geni coinvolti nel pathway di assimilazione solfato/solfito non ha ancora permesso di chiarire se *Bifidobacterium* sia in grado o meno di biosintetizzare la cisteina.

Probabilmente, il pathway biosintetico è integro ma richiede una fonte di zolfo ridotto (Grundy e Henkin, 1998), che potrebbe essere fornito, come idrogeno solfuro, da batteri del colon solfato-riduttori, suggerendo una relazione sinergica tra questi gruppi all'interno del microbiota intestinale. *B. longum* biotype longum NCC2705 possiede tutti gli enzimi necessari per la biosintesi di pirimidine e purine a partire da glutammina, così come quelli richiesti per la sintesi di acido folico, tiamina, e acido nicotinico. Al contrario, i pathway per la biosintesi *de novo* di riboflavina, biotina, cobalammina, pantotenato, lipoato e piridossina, appaiono parziali se non completamente assenti. Nel complesso, le capacità biosintetiche di *B. longum* biotype longum NCC2705 sembrano indicare l'adattamento di *Bifidobacterium* ad un ambiente in cui non sono disponibili fonti esterne di amminoacidi, nucleotidi e determinate vitamine. Studi preliminari di analisi genomica comparativa, supportati dallo sviluppo di medium sintetici a composizione definita, hanno confermato la maggior parte di queste caratteristiche prototrofiche e auxotrofiche (O'Connell-Motherway, Forde, Fitzgerald and van Sinderen, unpublished results).

In *Bifidobacterium* risultano sovraespressi COG implicati nel controllo del ciclo e della divisione cellulare. Si tratta principalmente di proteine responsabili della divisione cellulare (Fic, FtsE, FtsK, FtsX, FtsZ) e della partizione cromosomica (ParA e Smc). Inoltre, quasi il 7% del genoma di *B. longum* biotype longum NCC2705 è dedicato alla sintesi di regolatori trascrizionali, per la maggior parte molecole repressore (Tab. 7). I repressori garantiscono una risposta più rapida e stringente a modifiche ambientali, quali variabile disponibilità di substrato a livello dell'intestino umano.

**Tab. 7.** COG in *Bifidobacterium* ed altri batteri dell'intestino umano.

COG description	% in <i>Bifidobacterium</i>	% in <i>Bacteroides</i>	% in <i>Actinobacteria</i>	% in <i>Bacteria</i>
Translation	6.61	3.35	4.13	3.65
RNA processing and modification	0.05	0.00	0.02	0.01
Transcription	6.81	3.31	7.06	4.94
Replication, recombination and repair	5.58	4.09	4.63	4.42
Chromatin structure and dynamics	0.00	0.00	0.01	0.01
Cell cycle control, mitosis and meiosis	1.32	0.72	0.83	0.69
Defense mechanisms	2.30	1.70	1.40	1.15
Signal transduction mechanisms	3.62	3.27	3.48	3.44
Cell wall/membrane biogenesis	3.62	6.35	3.13	4.10
Cell motility	0.78	0.28	0.43	1.37
Cytoskeleton	0.05	0.00	0.01	0.01
Extracellular structures	0.19	0.00	0.02	0.02
Intracellular trafficking and secretion	1.37	1.48	0.93	1.72
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2.94	2.14	2.48	2.61
Energy production and conversion	2.64	3.99	4.53	4.37
Carbohydrate transport and metabolism	9.79	5.65	4.23	3.48
Amino acid transport and metabolism	9.79	4.39	7.14	5.90
Nucleotide transport and metabolism	3.28	1.63	1.89	1.63
Coenzyme transport and metabolism	2.59	3.04	3.13	2.65
Lipid transport and metabolism	2.01	1.69	4.07	2.66
Inorganic ion transport and metabolism	4.85	4.06	4.74	3.62
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	0.54	0.89	3.64	1.79
General function prediction only	11.56	7.58	11.13	8.19
Function unknown	4.80	3.60	5.06	4.81
Not in COGs	12.88	38.61	20.41	32.68

I dati sono stati recuperati da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La categoria "Not in COGs" include molte proteine ipotetiche.

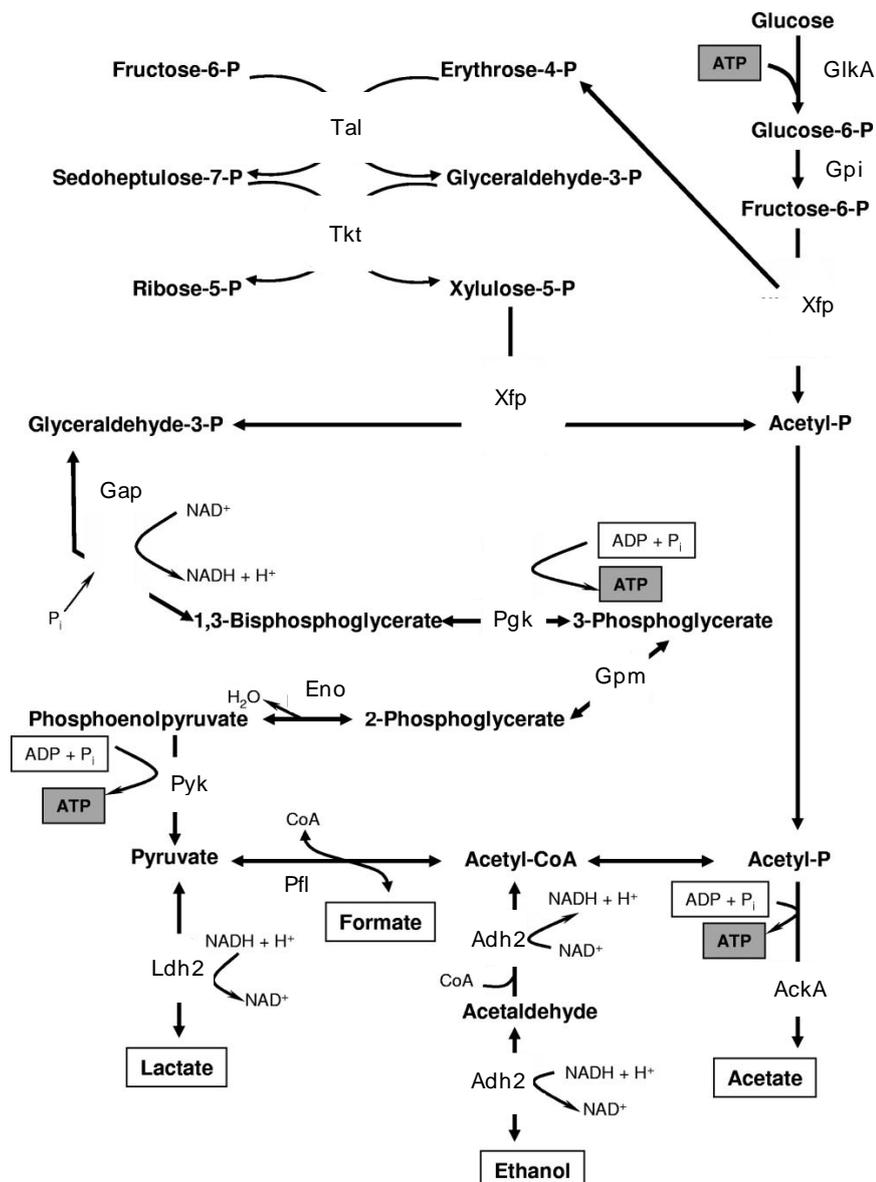
Relativamente alle capacità fermentative, *B. longum* biotype longum NCC2705 possiede tutti gli enzimi richiesti per il metabolismo, tramite lo shunt del fruttosio-6-P, di glucosio, gluconato, fruttosio, galattosio, N-acetil-glucosammina, N-acetil-galattosammina, arabinosio, xilosio, ribosio, saccarosio, lattosio, raffiniosio, cellobiosio, melibiosio, gentobiosio, maltosio, isomaltosio e mannosio. Alcune di queste sostanze, quali glucosio, lattosio, saccarosio e fruttosio, sono fermentate universalmente, mentre altri carboidrati ed alcuni alcoli come mannitolo e sorbitolo, possono essere utilizzati come substrato per processi fermentativi solo da alcune specie. E' stato calcolato che circa il 10% del suo genoma sia coinvolto nel metabolismo e nel trasporto di carboidrati (Tab. 7), una percentuale di gran lunga maggiore se confrontata con quella di altri microrganismi del tratto gastrointestinale umano, quali *E. coli*, *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis*. Un adattamento genico di simile portata risulta, invece, condiviso da batteri intestinali appartenenti al phylum *Bacteroidetes*, e probabilmente, rappresenta una specifica risposta di adattamento alla nicchia ecologica del tratto gastrointestinale, conferendo a *Bifidobacterium* un vantaggio competitivo e consentendo di minimizzare il cross-feeding. Il genoma di *B. longum* biotype longum NCC2705 contiene più di 40 glicosil idrolasi, molte delle quali esercitano la loro attività come enzimi secreti. I geni codificanti per questi enzimi, sono per lo più associati tra loro in unità genetiche caratterizzate da un'organizzazione modulare, che prevede la presenza di uno specifico repressore LacI-type, un trasportatore oligosaccaridico MalEFG-type, e da 1 a 6 geni codificanti differenti classi di glicosil idrolasi.

I bifidobatteri sono in grado di degradare anche un ampio range di glicoconiugati dell'ospite, compresi complessi carboidrati contenenti acido sialico presenti nella mucina, glicosfingolipidi e latte umano, il che sottolinea la relazione sinergica instauratasi tra l'ospite e questo gruppo microbico intestinale (Hoskins *et al.*, 1985; Corfield *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2001).

Limitate sono le informazioni relative alla degradazione dell'amido da parte di *Bifidobacterium*. Da un isolato umano di *B. adolescentis*, è stata purificata un' $\alpha$ -amilasi extracellulare, capace di idrolizzare l'amido a maltosio e maltotriosio (Lee *et al.*, 1997). In uno studio più recente, finalizzato a valutare l'utilizzo di amido, amilopectina e pullulano da parte di specie differenti di *Bifidobacterium*, è stato mostrato come tutti i ceppi di *B. breve* testati abbiano attività amilopullulanasi (Ryan *et al.*, 2006). Poiché *B. breve* rappresenta una delle specie batteriche dominanti a livello del microbiota neonatale (Scardovi *et al.*, 1971; Ventura *et al.*, 2004c), la presenza di questa attività enzimatica potrebbe svolgere un ruolo fondamentale durante lo svezzamento infantile, momento in cui il bambino si trova esposto, per la prima volta, a carboidrati complessi di natura diversa rispetto a quelli presenti nel latte materno.

Lo shunt del fruttosio-6-P (Fig. 15) inizia con la conversione di glucosio-6-P in fruttosio-6-P tramite esochinasi e glucosio-6-P isomerasi. Il fruttosio-6-P è scisso in acetil-P ed eritrosio-4-P ad opera della fruttosio-6-P fosfochetolasi (EC 4.1.2.2), enzima principale di questo processo fermentativo. Dall'acetil-P si ottiene acetato grazie all'enzima acetato chinasi. L'eritrosio-4-P e il fruttosio-6-P sono convertiti in pentosi-P attraverso l'azione successiva di transaldolasi e transchetolasi. In seguito alla scissione fosforolitica di xilulosio-5-P si formano gliceraldeide-3-P ed acetil-P. Dalla gliceraldeide-3-P si ottiene acido piruvico che è poi ridotto ad acido L(+)-lattico. La fermentazione del glucosio produce principalmente acido acetico ed acido L(+)-lattico, nel rapporto teorico 1.5:1.0. Sono state riportate deviazioni da questo rapporto fermentativo dovute alla scissione fosforoclastica di parte dell'acido piruvico in acido formico ed acido acetico, ed alla riduzione di quest'ultimo in etanolo (De Vries e Stouthamer, 1968). I differenti rapporti molarli osservati

sembrano variare in relazione anche a substrato e condizioni di crescita (Rasic e Kurman, 1983; Palframan *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004). Generalmente, i bifidobatteri non producono CO<sub>2</sub>, acido propionico, butirrico ed indolo; è possibile, invece, osservare la formazione di piccole quantità di acido formico, etanolo ed acido succinico (Rasic e Kurman, 1983). Alcuni ceppi mostrano alti livelli d'attività ureasica costitutiva (Crociani e Matteuzzi, 1982), mentre altri possiedono una debole attività proteolitica (Borisova e Slivko, 1973). Nei bifidobatteri, non sembrano essere presenti i pathway della via glicolitica e dell'esoso monofosfato. In *B. longum* biotype longum, è presente, invece, un parziale pathway di Embden-Meyerhoff ed un parziale ciclo di Krebs, in cui sono assenti i geni codificanti per fumarasi, oxoglutarato deidrogenasi e malato deidrogenasi.



**Fig. 15.** Shunt del fruttosio-6-P.

AckA, acetato chinasi; Adh2, aldeide-alcol deidrogenasi 2; Eno, enolasi; Gap, gliceraldeide-3-P deidrogenasi C; GlkA, glucochinasi; Gpi, glucosio-6-P isomerasi; Gpm, fosfoglicerato mutasi; Ldh2, lattato deidrogenasi; Pgk, fosfoglicerato chinasi; Pfl, formiato acetiltrasferasi; Pyk, piruvato chinasi; Tal, transaldolasi; Tkt, transchetolasi; Xfp, fruttosio-6-P fosfochetolasi.

Trasportatori ABC, permeasi, simporti protonici [uno specifico per il lattosio è stato identificato in *B. bifidum* (Krzewinski *et al.*, 1996)], simporti cationici [quello specifico per il glucosio in *B. bifidum* DSM20082 è dipendente da ioni K<sup>+</sup> (Krzewinski *et al.*, 1997)] e sistemi fosfoenolpiruvato-fosfotrasferasi (PEP-PTS, Schell *et al.*, 2002) garantiscono il trasporto di carboidrati e sono codificati da circa il 10% del contenuto genico totale di *Bifidobacterium*. In particolare, i sistemi PEP-PTS, responsabili del trasporto di glucosio e arabinosio in *B. breve* (Degnan e Macfarlane, 1993), comportano la concomitante internalizzazione e fosforilazione del carboidrato. Il trasferimento del fosfato dal PEP allo zucchero è mediato da una catena enzimatica composta da EI (Enzyme I), HPr (proteina contenente istidina), e EII (Enzyme II). Nel genoma di *B. longum* biotype longum NCC2705, è stato identificato un solo gene omologo codificante per EII, a differenza di *B. breve* UCC2003, che contiene 4 loci EII (Maze *et al.*, 2006). Benché il preciso significato biologico di questa differenza nel sistema PEP-PTS non sia ancora noto, è ipotizzabile che le diverse capacità di trasporto riflettano le differenti origini ecologiche dei microrganismi.

## Strutture extracellulari ed interazione con l'ospite

Nell'interazione tra bifidobatteri e cellule epiteliali dell'ospite, un fattore chiave è rappresentato dalle proteine extracellulari. MacConaill *et al.* (2003) hanno mostrato come i sistemi di export delle proteine in *B. breve* siano comparabili a quelli già noti ed attivi in altri batteri Gram-positivi, in cui è la presenza di un peptide segnale o di regioni transmembrana che destina le proteine alla superficie cellulare. Nei genomi di *B. longum* biotype longum NCC2705 e *B. longum* biotype longum DJO10A, sono stati identificati geni putativi codificanti per strutture simili a fimbrie capaci di legare glicoproteine e, presumibilmente, coinvolte nell'interazione diretta con le strutture dell'ospite (rispettivamente BL0675 e gi|23335911). Queste proteine putative, probabilmente ancorate alla parete cellulare, sono infatti caratterizzate da un'alta percentuale di identità nei confronti di FimA e FimP, che rappresentano le 2 maggiori subunità fimbriali di *Actinomyces* (Li *et al.*, 1999). Inoltre, in entrambi i microrganismi, così come in *B. breve*, è stato caratterizzato un inibitore di proteasi simile alla serpina (Ivanov *et al.*, 2006). La serpina è un efficiente inibitore dell'elastasi umana neutrofila e pancreatica, il cui rilascio nei siti di infiammazione intestinale ad opera di neutrofili, costituisce un interessante meccanismo di immunità innata. La presenza di tale inibitore potrebbe fornire protezione nei confronti di proteolisi esogena e svolgere un ruolo essenziale nell'interazione diretta di *Bifidobacterium* con l'ospite.

Un'ulteriore possibilità di interazione è rappresentata dalla capacità di *Bifidobacterium* di produrre esopolisaccaridi (EPS) o polisaccaridi capsulari (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006). In batteri patogeni, queste strutture extracellulari potrebbero contribuire ad aggirare il sistema immune dell'ospite e svolgere, quindi, un ruolo in infezioni batteriche croniche (Vuong *et al.*, 2004) mentre, in microrganismi non patogeni, potrebbero facilitare l'adesione batterica alle cellule epiteliali dell'ospite e contribuire alla resistenza nei confronti di acidi gastrici e sali biliari (Perez *et al.*, 1998). Nagaoka *et al.* (1994) hanno riportato la produzione di EPS ricco in ramnosio legato alla parete cellulare in *B. breve* e *B. bifidum*, mentre la produzione di un polisaccaride costituito da glucosio, ribosio, galattosio, ramnosio e chiroinositolo, associato alla cellula, è stata dimostrata da You *et al.* (2004) in ceppi di *B. bifidum*. L'analisi della sequenza genomica di *B. longum* biotype longum NCC2705 ha rivelato la presenza di 2 regioni correlate alla biosintesi di polisaccaridi,

caratterizzate dalla vicinanza di elementi IS e da una forte divergenza nel contenuto G+C, indice di come tali loci siano stati presumibilmente acquisiti mediante HGT. Analogamente, regioni geniche codificanti per EPS e ceppo specifiche sono state individuate anche nei genomi di *B. breve* UCC2003 e *B. adolescentis* ATCC 15703.

Recentemente, Candela *et al.* (2007) hanno dimostrato una significativa attività di binding al plasminogeno umano da parte di proteine di *Bifidobacterium* localizzate sulla superficie cellulare. Come riportato per altri batteri Gram-positivi (Lahteenmaki *et al.*, 2001), anche i recettori del plasminogeno identificati in *Bifidobacterium* sono risultati, per la maggior parte, proteine citoplasmatiche altamente conservate che, quando vengono espresse sulla parete cellulare del microrganismo, acquisiscono probabilmente una funzione “moonlighting” differente dall’attività svolta nel citoplasma. Il binding del plasminogeno alla superficie cellulare e la successiva conversione a plasmina, operata da attivatori dell’ospite, consentono a *Bifidobacterium* di acquisire un’attività plasminica associata alla superficie, efficace nella degradazione di substrati fisiologici, quali matrice extracellulare, fibronectina e fibrinogeno (Candela *et al.*, in preparation). La stessa modalità di interazione con il sistema plasminogeno/plasmina dell’ospite è stata descritta anche per batteri enteropatogeni, quali *Salmonella enterica*, *L. monocytogenes*, *H. pylori*, *E. coli* and *B. fragilis* (Lahteenmaki *et al.*, 2005; Bergmann e Hammerschmidt, 2007). Poiché in letteratura non sono mai stati riportati casi di sepsi o endocardite correlati all’uso probiotico di *Bifidobacterium*, presumibilmente i batteri patogeni devono avvalersi di altri fattori, oltre alla presenza sulla superficie cellulare di recettori del plasminogeno, per poter migrare attraverso le barriere tissutali dell’ospite ed invadere gli organi [“bacterial metastasis”, Lahteenmaki *et al.* (2005)]. Nel caso di *Bifidobacterium*, la capacità di interagire con il sistema plasminogeno/plasmina dell’ospite potrebbe, invece, facilitare la colonizzazione del tratto gastrointestinale umano e rendere possibile uno stretto contatto con le cellule epiteliali. Il cross-talk molecolare tra *Bifidobacterium* ed ospite rappresenta uno step essenziale, da cui dipendono le attività health-promoting attribuite a questo genere batterico, quali modulazione del sistema immune intestinale, mantenimento dell’integrità della barriera mucosale, ed incremento nella secrezione di mucina (Otte e Podolsky, 2004; Ismail e Hooper, 2005).

## Produzione di batteriocine

Le batteriocine sono state inizialmente definite come composti proteinacei prodotti sia da batteri Gram-positivi che negativi, capaci di esercitare attività battericida o batteriostatica contro specie strettamente correlate tra loro (Tagg *et al.*, 1976). Esistono, comunque, esempi di batteriocine ad ampio spettro (Klaenhammer, 1993), e con attività sia antimicrobica che di signalling (Kleerebezem *et al.*, 1997). I bifidobatteri sono in grado di produrre batteriocine (Bevilacqua *et al.*, 2003; Toure *et al.*, 2003; Servin, 2004), come bifidocin B, batteriocina ad ampio spettro di classe IIa, prodotta da *B. bifidum* (Yildirim *et al.*, 1999). In *B. longum* biotype longum DJO10A, sono state identificate 2 coding sequence correlate a lantibiotici, ovvero batteriocine di piccole dimensioni che tipicamente contengono lantionina e residui di  $\beta$ -metil lantionina derivanti dalla deidratazione di serina e treonina (Jack *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 1999).

## Risposta a stress

I geni codificanti per proteine coinvolte nella risposta a stress costituiscono un ulteriore esempio di come il contenuto genomico di *Bifidobacterium* rifletta l'adattamento al tratto gastrointestinale (Ventura *et al.*, 2006a). In particolare, geni codificanti per i principali chaperoni molecolari e famiglie proteasiche, quali *groEL-groES*, *dnaK*, *grpE*, *dnaJ*, *clpB*, *clpC*, e *clpP*, sono stati isolati da quasi tutti i taxa di *Bifidobacterium*. Comunque, diversamente dagli altri batteri appartenenti al phylum *Actinobacteria*, i bifidobatteri non possiedono copie multiple o paraloghi dei suddetti geni, fatta eccezione per *dnaJ* e *clpP* (Ventura *et al.*, 2006a). In *Bifidobacterium* è stato, inoltre, osservato il set più piccolo di geni codificanti per heat shock protein (Hsp), rispetto ad altri batteri Gram-positivi ad alto contenuto G+C. La nicchia pressoché isoterma fornita da ospiti mammiferi rende, infatti, obsoleto lo sviluppo di un elaborato sistema di risposta a fluttuazioni della temperatura (Ventura *et al.*, 2006a). Le significative variazioni nelle condizioni osmotiche hanno, invece, reso necessario, in *Bifidobacterium*, lo sviluppo di un adeguato sistema di protezione contro sali biliari e/o stress osmotici (Sánchez *et al.*, 2005, 2007b; Ventura *et al.*, 2005a, 2006a; Ruiz *et al.*, 2007).

Recentemente, mediante approccio proteomico, mirato all'identificazione e caratterizzazione delle proteine espresse da *B. longum* biotype longum NCC2705, è stata evidenziata la presenza degli enzimi alchil idroperossido reduttasi, presumibilmente coinvolta nel riparo del danno ossidativo a proteine e lipidi, e coloilglicin idrolasi, che probabilmente conferisce resistenza a livelli tossici di sali biliari in quanto catalizza l'idrolisi di sali biliari glicina- e/o taurina-coniugati in residui amminoacidici e acidi biliari (Yuan *et al.*, 2006). Nel medesimo studio, sono state identificate come abbondantemente espresse anche heat shock protein corrispondenti a DnaK, GroEL e GroES.

L'analisi della sequenza genomica di *B. longum* biotype longum NCC2705, ha rivelato l'esistenza di differenti meccanismi regolatori che consentono la protezione cellulare di fronte a stress di varia natura: (i) risposta stringente, evocata da qualsiasi stress di sufficiente impatto fisiologico tale da impedire il caricamento di tRNA con amminoacidi (la coding sequence *BL1439* è omologa a *relA*, codificante per una proteina responsabile della repressione della trascrizione); (ii) sigma factor, capaci di determinare la selettività del promotore e di attivare geni altrimenti silenti (CDS *BL1357* e *BL1358*); (iii) regolatori negativi HspR e HrcA (Klijn *et al.*, 2005).

## Analisi genomica comparativa

I confronti dot plot (a livello nucleotidico) delle sequenze genomiche complete di *Bifidobacterium*, unitamente ad un'analisi preliminare del draft della sequenza genomica di *B. dentium* Bd1, hanno mostrato un alto grado di conservazione e sintenia (termine che indica la conservazione dell'ordine genico) tra genomi. L'analisi ha evidenziato, comunque, anche la presenza di diverse regioni breakpoint, che probabilmente rappresentano punti di inversione o inserzione/delezione di DNA (Leahy S e van Sinderen D, unpublished data).

In un recente studio, Klijn *et al.* (2005) hanno impiegato un microarray a DNA basato su *B. longum* biotype longum NCC2705, al fine di confrontare tra loro i genomi di 10 ceppi di *Bifidobacterium*, tra cui altri ceppi di *B. longum* biotype longum così come i taxa *B. longum* biotype infantis e *B. longum* biotype suis, strettamente correlati da un punto di vista filogenetico. I risultati

hanno mostrato l'esistenza di 7 regioni genomiche altamente variabili, caratterizzate da un contenuto G+C alterato. Queste regioni comprendono un residuo profagico, un cluster di geni codificanti per enzimi coinvolti nel metabolismo di zuccheri, quali un  $\alpha$ -mannosidasi, ed un cluster genico coinvolto nella biosintesi di polisaccaridi capsulari che potrebbero svolgere un ruolo fondamentale nell'interazione con l'ospite. Benché estremamente utile ed informativa, l'analisi genomica comparativa mediante microarray non consente, tuttavia, l'identificazione di regioni presenti nei ceppi test ma assenti nel ceppo utilizzato per costruire l'array, e non rende generalmente possibile effettuare studi di sintenia.

## Genome evolution

In *B. longum* biotype longum NCC2705, è stato ipotizzato che meccanismi di HGT siano responsabili dell'acquisizione di determinati geni coinvolti nel metabolismo di zuccheri, così come nella produzione di esopolisaccaridi, e che tale acquisizione rappresenti una risposta di adattamento del microrganismo alla specifica nicchia ecologica del tratto gastrointestinale umano. Le regioni probabilmente acquisite mediante HGT includono, ad esempio, geni codificanti per ramnosil trasferasi (presumibilmente acquisiti da streptococchi), e 2 cluster genici codificanti per sistemi di restrizione/modificazione. Meccanismi di HGT sembrano essere responsabili dell'acquisizione di circa il 5% del contenuto genomico di questo microrganismo (Schell *et al.*, 2002).

L'analisi del genoma di *B. longum* biotype longum NCC2705 ha rivelato l'esistenza di 16 sequenze di inserzione (IS), delle quali 8 costituiscono un nuovo membro di 5 famiglie già note, comprendente un raro IS607-type (Schell *et al.*, 2002). Questi elementi, presenti spesso in copie multiple identiche, potrebbero facilmente dar luogo a ricombinazione omologa e, quindi, essere coinvolti in riarrangiamenti cromosomici all'interno del genere *Bifidobacterium*, similmente a quanto già riportato per *L. lactis*. In questa specie modello di LAB, un'inversione cromosomica, che copre circa metà del cromosoma batterico, è stata descritta in 2 ceppi strettamente correlati tra loro che derivano, molto probabilmente, dalla ricombinazione tra questi 2 elementi IS (Daveran-Mingot *et al.*, 1998).

## Elementi prophage-like

Prima del sequenziamento genomico completo di ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium*, questi microrganismi non erano mai stati considerati come potenziali target di infezione profagica. Elementi prophage-like, denominati Bbr-1, Bl-1 e Blj-1, sono stati, invece, individuati nei genomi di *B. breve* UCC2003, *B. longum* biotype longum NCC2705, e *B. longum* biotype longum DJO10A (Ventura *et al.*, 2005b). Tali elementi mostrano omologia nei confronti di fagi dsDNA, capaci di infettare un ampio range filogenetico di batteri. In particolare, mediante impiego del metodo proteomic tree, finalizzato ad investigare l'evoluzione fagica (Rohwer e Edwards, 2002), è risultata evidente la stretta correlazione filogenetica di questi elementi con fagi responsabili dell'infezione di batteri a basso contenuto G+C (ad esempio lactococchi e stafilococchi) (Ventura *et al.*, 2005b). La condivisione, durante l'evoluzione, della stessa nicchia ecologica (il tratto gastrointestinale), ha rappresentato, probabilmente, il fattore chiave che ha permesso lo scambio di materiale genetico tra batteri e fagi.

Tutti e 3 gli elementi prophage-like identificati, risultano integrati in un gene tRNA<sup>Met</sup>, il che costituisce il primo caso di gene tRNA come target di integrazione fagica (Campbell, 1992). L'analisi della distribuzione di questo sito di integrazione ha mostrato come siti *attB* siano ampiamente conservati in diverse specie di bifidobatteri e nel microrganismo filogeneticamente non correlato, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Nakamura *et al.*, 2002), ma non in altri membri del phylum *Actinobacteria*.

Il profago Blj-1 da 36.9 kb viene exciso dal cromosoma di *B. longum* biotype longum DJO10A in seguito ad esposizione a mitomicina C o perossido d'idrogeno, e rappresenta, quindi, il primo profago inducibile di *Bifidobacterium* ad essere stato caratterizzato a livello molecolare (Ventura *et al.*, 2005b). Questo elemento possiede un gene codificante per una putativa trascrittasi inversa, un cui omologo è stato descritto come retroelemento capace di generare diversità (Ventura *et al.*, 2005b). Al contrario, Bbr-1 e Bl-1, benché in grado di costituire fagi satelliti funzionanti, sono elementi profagici difettivi, la cui mobilità è legata alla presenza di fagi helper, così come già riportato per i microfagi criptici Rv1 e Rv2 (Hendrix *et al.*, 1999).

L'elemento prophage-like Bbr-1 consiste di un frammento di DNA chimerico di 28.5 kb, composto da un elemento mobile inserito all'interno di sequenze prophage-like, non ampiamente distribuite tra ceppi di *B. breve* e codificanti per enzimi coinvolti nel metabolismo degli zuccheri (Ventura *et al.*, 2005b).

## Elementi di DNA extracromosomici

In *Bifidobacterium*, i plasmidi non sono, generalmente, ubiquitari (Sgorbati *et al.*, 1982; Park *et al.*, 1997) e, anche quando presenti, sono caratterizzati da dimensioni ristrette, variabili da 1.5 a 15 kb. I plasmidi completamente sequenziati, isolati da ceppi di *B. longum* biotype longum, comprendono pMB1 (Rossi *et al.*, 1996), pKJ36 e pKJ50 (Park *et al.*, 1997, 1999), pBLO1 (Schell *et al.*, 2002), pNAC1, pNAC2 e pNAC3 (Corneau *et al.*, 2004), pDOJH10S e pDOJH10L (Lee e O'Sullivan, 2006), pTB6 (Tanaka *et al.*, 2005), pB44 (GenBank accession number NC004443), e pNAL8 (Guglielmetti *et al.*, 2007). In aggiunta a questi, sono stati sequenziati 6 ulteriori plasmidi isolati da altre specie di bifidobatteri: pVS809 di *B. globosum* (Mattarelli *et al.*, 1994), pCIBb1 e pNBb1 di *B. breve* (rispettivamente, O'Riordan e Fitzgerald, 1999 e GenBank accession number E17316), pAP1 di *B. asteroides* (GenBank accession number Y11549), pBC1 di *B. catenulatum* (Alvarez-Martin *et al.*, 2006), e p4M di *B. pseudocatenulatum* (GenBank accession number NC003527). La maggior parte dei plasmidi identificati in *Bifidobacterium* è criptica e non codifica per nessun tratto fenotipico, fatta eccezione per il plasmide isolato da *B. bifidum* NCFB 1454, codificante per la batteriocina bifidocin B (Yildirim *et al.*, 1999).

I plasmidi pCIBb1 e p4M contengono gli elementi genici necessari per la mobilizzazione e per la replicazione del plasmide stesso, attraverso il sistema di replicazione rolling-circle (*repB*, *traA* e *mob*). Questi plasmidi codificano per una proteina septal DNA translocator, appartenente alla famiglia FtsK/SpoIIIE, e omologa alle proteine Tra identificate in *Streptomyces* (Park *et al.*, 1997). Diversamente, tutti gli altri plasmidi caratterizzati fino ad ora in *Bifidobacterium*, codificano rilassasi putative (Grohmann *et al.*, 2003). Presumibilmente, nei bifidobatteri esistono due diverse modalità di segregazione plasmidica: un sistema di trasferimento classico, che implica il coinvolgimento di una rilassasi e di un intermedio plasmidico a single-strand, ed un sistema di

trasferimento simile a quello già noto in *Streptomyces*, che coinvolge una proteina septal DNA translocator (Grohmann *et al.*, 2003).

Il plasmide pMB1 è stato utilizzato per costruire plasmidi ricombinanti (Rossi *et al.*, 1998), e la prima generazione di vettori di clonaggio per questo genere batterico (Missich *et al.*, 1994; Rossi *et al.*, 1998).

Il plasmide pDOJH10S, isolato da *B. longum* biotype longum DJO10A e recentemente sequenziato (Lee e O'Sullivan, 2006), e pBC1 di *B. catenulatum*, non presentano elementi genici coinvolti nella replicazione rolling-circle, ma contengono sequenze omologhe a plasmidi theta-type replicating (Alvarez-Martin *et al.*, 2006; Lee e O'Sullivan, 2006). In particolare, pDOJH10S è stato utilizzato come base per la costruzione di un vettore di clonaggio shuttle, ed è stato trasformato con successo sia in *E. coli* che in *B. longum*, ma non in LAB, quali *L. lactis* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, confermando il ristretto spettro d'ospite già evidenziato in studi precedenti condotti sui plasmidi criptici in *Bifidobacterium* (Matsumura *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1998).

Le proteine Rep dei plasmidi isolati da *Bifidobacterium* non risultano tra loro filogeneticamente correlate (Del Solar *et al.*, 1998), ma clusterizzano con proteine di replicazione appartenenti ad ospiti differenti, quali *E. coli* ed altri batteri Gram-negativi (Alvarez-Martin *et al.*, 2006; Lee e O'Sullivan, 2006). Per pDOJH10S, è stato ipotizzato un meccanismo di HGT che ne ha consentito l'acquisizione da un altro membro del phylum *Actinobacteria*, *Rhodococcus rhodochrous* (Lee e O'Sullivan, 2006).

In *Bifidobacterium*, sono stati definiti protocolli di elettrotrasformazione. Mediante ottimizzazione delle condizioni di shock elettrico, medium di crescita e soluzione di elettroporazione, e mediante introduzione di uno shock a bassa temperatura per incrementare la permeabilità della parete cellulare, sono state ottenute efficienze di trasformazione variabili da  $10^2$  a  $10^6$  cellule trasformate/ $\mu$ g di DNA plasmidico (Missich *et al.*, 1994; Argnani *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 1996). Fino ad ora, non sono stati riportati casi di ricombinazione omologa, mentre è stata tentata l'integrazione cromosomica di frammenti di DNA in diversi ceppi di *Bifidobacterium* ma con limitato successo (Delley M, personal communication). Gli scarsi risultati sono probabilmente attribuibili al fatto che la frequenza di ricombinazione è inferiore rispetto alla frequenza di trasformazione.

# Probiotici

## Definizione e caratteristiche generali

Nel corso dei millenni, la specie umana si è evoluta per contrastare o eventualmente trarre beneficio dal consumo di microrganismi presenti nei cibi. E' stato ipotizzato che l'ingestione di specie microbiche legate agli alimenti fosse già comune nel Pleistocene quando veniva praticata la conservazione sotterranea del cibo (Bengmark, 1998; Bengmark e Martindale, 2005). Nell'ultimo secolo, i progressi compiuti in campo tecnologico, quali refrigerazione e pastorizzazione, hanno determinato un drammatico calo nel consumo di specie microbiche associate agli alimenti ma, parallelamente, hanno portato ad un'incrementata incidenza di numerosi disordini sia a livello del tratto gastrointestinale che all'esterno di questo, quali IBD e stati atopici come asma e allergie. Benché solo recentemente sia stato preso in considerazione un'eventuale correlazione tra disordini e diminuita esposizione a microrganismi ["hygiene hypothesis" (Bach, 2002)], gli effetti positivi sulla salute dell'ospite determinati dal consumo di cibi fermentati, sono in realtà noti già da più di 100 anni.

La prima significativa introduzione del concetto di probiotico risale, infatti, agli inizi del 1900. Lo scienziato russo Elie Metchnikoff credeva che la complessa popolazione microbica esistente a livello di colon fosse responsabile di una reazione avversa sull'ospite mediante un effetto di "autointossicazione", e attribuiva la maggiore longevità dei contadini bulgari agli effetti health-promoting dei microrganismi vivi presenti nei lattici fermentati che essi consumavano in grande quantità (Metchnikoff, 1907). L'abbassamento del pH determinato dal latte fermentato con batteri produttori di acido lattico era, infatti, in grado di inibire la crescita di batteri proteolitici responsabili della generazione di prodotti tossici, e ritardare, quindi, i processi fisiologici legati all'invecchiamento. Lo stesso Abramo, secondo la tradizione persiana, deve la sua fertilità e longevità ad una regolare ingestione di yogurt.

Il termine "probiotico" fu coniato solo nel 1965 da Lilly e Stillwell, con accezione opposta a quella di antibiotico, per indicare l'effetto stimolante sulla crescita batterica da parte di sostanze rilasciate da microrganismi ("living organisms, which upon ingestion in certain numbers, exert health benefits beyond inherent basic nutrition"). Nel tempo esso ha assunto valenze diverse: (i) "live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance" (Fuller, 1989); (ii) "live microbial food ingredient that is beneficial to health" (Salminen, 1998); (iii) "live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host" (Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization, 2002); (iv) "live microbial food supplements that change either the composition or metabolic activities of the microbiota, or modulate immune system reactivity in a way that benefits health" (Macfarlane e Cummings, 2002).

Fino ad ora, attività probiotica è stata associata a lattobacilli, bifidobatteri, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *E. coli* Nissle 1917, ceppo non patogeno, al lievito *Saccharomyces boulardii* e *Clostridium butyricum* (Shanahan, 2001a, 2001b). Il primo batterio utilizzato come probiotico è stato *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, impiegato dalla popolazione bulgara per la produzione di yogurt. Altri lattobacilli attualmente usati nella produzione di preparati probiotici includono *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. lactis*,

*L. reuteri*, *L. brevis*, e *L. cellobiosus*. Tra i bifidobatteri vengono impiegati come probiotici *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, e *B. longum*. Le specie *B. thermophilum* e *B. pseudolongum*, che tipicamente fanno parte del microbiota animale, sono largamente utilizzate come probiotici veterinari. A queste si aggiungono altre specie microbiche appartenenti ai generi batterici *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. lactis* riclassificato come *L. lactis*) (Roberfroid e Gibson, 1994), *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*), *Propionibacterium* e *Bacillus*, ma il loro utilizzo è limitato dalla presenza di molte specie patogene appartenenti a questi generi, il che mette in dubbio la reale sicurezza della loro somministrazione (FAO/WHO, 2002). Inoltre, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, e specie appartenenti ai generi *Leuconostoc* e *Lactococcus*, impiegati come starter nei processi di produzione di lattici fermentati, non sono normalmente isolati dal tratto gastrointestinale, per cui presumibilmente incapaci di colonizzare ed influenzare l'omeostasi del microbiota intestinale (Alm, 1991). Il ceppo *E. coli* Nissle 1917 è stato isolato da feci umane e, nonostante il sierotipo (O6:K5:H1) caratteristico di batteri associati ad infezioni del tratto urinario, si è rivelato, fino ad ora, completamente non patogeno, consentendo quindi il suo impiego come probiotico (Gunzer *et al.*, 2002; Grozdanov *et al.*, 2004; Westendorf *et al.*, 2005). La biosicurezza è confermata dall'utilizzo in Europa centrale di Mutaflor<sup>®</sup> come rimedio microbico dal 1917, nella prevenzione di diarrea, indotta dai patogeni *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, e nel trattamento di disordini funzionali dell'intestino (Möllenbrink e Bruckschen, 1994) e IBD (Isolauri *et al.*, 2002; Podolsky, 2002; Kruis *et al.*, 2004; Grabig *et al.*, 2006). *E. coli* Nissle 1917 è stato anche impiegato per la colonizzazione intestinale di neonati al fine di sopprimere l'acquisizione di microrganismi patogeni e multiresistenti (Westendorf *et al.*, 2005). Recentemente, Lata *et al.* (2007) hanno riportato come la somministrazione di Mutaflor<sup>®</sup> in pazienti affetti da cirrosi epatica, sia efficace nel ripristino di una normale colonizzazione microbica e determini un decremento nei livelli di endotossine.

Esistono probiotici destinati ad impiego veterinario ed altri ad impiego umano. Nell'alimentazione animale, l'uso di probiotici ha scopi essenzialmente produttivi, in quanto la loro assunzione determina un incremento nella velocità di crescita dell'animale, una riduzione dell'incidenza di infezioni subcliniche, un miglioramento della capacità di utilizzo del cibo a causa della presenza di nuovi enzimi digestivi rilasciati dai probiotici (Kumprekt *et al.*, 1984), ed un incremento nei quantitativi di uova e latte prodotti (Williams e Newbold, 1990). I probiotici destinati all'impiego umano possono essere suddivisi in probiotici alimentari e farmaceutici. I primi, oltre all'effetto positivo esercitato direttamente sulla microflora intestinale dell'ospite, contribuiscono alle proprietà organolettiche, reologiche e nutrizionali dei cibi. I prodotti fermentati contengono, infatti, vitamine e sali minerali in maggiore quantità (MacDonought *et al.*, 1983), ed i carboidrati e le proteine si trovano in forma più digeribile rispetto alle controparti non fermentate. I probiotici farmaceutici trovano, invece, impiego nel trattamento di diarrea, stipsi, flatulenza, acidità gastrica, colonizzazione da patogeni, gastroenterite e ipercolesterolemia. Recenti trial clinici hanno dimostrato la loro efficacia anche nel trattamento di malattie infiammatorie intestinali quali colite ulcerosa, morbo di Crohn, paucite (Gionchetti *et al.*, 2000, 2003a, 2003b; Sartor, 2004a, 2004b) e sindrome del colon irritabile (Limdi *et al.*, 2006). La loro azione terapeutica può essere correlata ad alcune attività accertate per i suddetti batteri, quali competizione con microrganismi patogeni, neutralizzazione di cataboliti "tossici" mediante produzione di enzimi detossificanti, e modulazione del sistema immune dell'ospite (Tannock, 1999; Madsen *et al.*, 2001; Ulisse *et al.*, 2001; Lammers *et al.*, 2003).

I prodotti fermentati arricchiti con batteri probiotici rappresentano una categoria di functional food di estremo successo. Le piccole bottiglie contenenti bevande ad uso giornaliero, producono un mercato annuale di più di 1000 milioni di kg e 1.2 miliardi di euro nella sola Europa (Buss, 2004). In Finlandia, ad esempio, si è assistito ad un significativo incremento nell'utilizzo del probiotico *L. rhamnosus* GG a partire dalla sua introduzione negli anni novanta (isolato nel 1985 da Gorbach e Goldin). Nel 1992,  $3 \times 10^6$  kg di prodotto contenente LGG sono stati venduti in questa nazione (Saxelin *et al.*, 1996). Nonostante proprietà probiotiche siano state attribuite a numerosi ceppi microbici spesso correlati tra loro, solo poche specie batteriche dominano il mercato o sono state impiegate in trial clinici (Tab. 8).

**Tab. 8.** Specie probiotiche comunemente utilizzate, designazione dei ceppi e prodotti commerciali.

Species	Strain	Commercial brand name(s)
<i>L. casei</i>	DN114001	Actimel <sup>®</sup>
<i>L. casei</i>	Shirota	Yakult <sup>®</sup>
<i>L. plantarum</i>	299v	ProViva <sup>®</sup>
<i>L. rhamnosus</i>	GG	Actifit <sup>Plus</sup> <sup>®</sup> , Gefilus <sup>®</sup> , LGG <sup>®</sup> , Onaka He GG! <sup>®</sup> , Vifit <sup>®</sup> etc.
<i>L. johnsonii</i>	La1	LC1 <sup>®</sup>
<i>B. lactis</i>	Bb-12	Various brand names

Il maggiore impiego dei probiotici come supplementi alimentari più che come prodotti farmaceutici non ha reso strettamente necessario dimostrare la loro sicurezza, purezza e potenza prima dell'immissione sul mercato. Tuttavia, in Europa, i supplementi alimentari destinati a bambini e ragazzi devono possedere specifici requisiti da un punto di vista legislativo (commission of the european communities, 1996). Negli Stati Uniti, i prodotti probiotici per il trattamento o la prevenzione di disordini, sono classificati come prodotti biologici e necessitano della revisione e approvazione da parte della Food and Drug Administration. La revisione da parte della Therapeutic Goods Administration e del ministero della salute è richiesta, rispettivamente in Australia ed in Giappone, prima dell'immissione sul mercato di prodotti probiotici con specifici effetti benefici sulla salute dell'ospite (FAO/WHO, 2001).

## Prerequisiti e criteri di selezione

I prerequisiti necessari per l'impiego di probiotici sono efficacia e sicurezza.

Fondamentale è che i probiotici siano GRAS [generally recognized as safe (Salminen *et al.*, 1998a)] e, dunque, non patogeni né associabili a potenziali rischi per la salute dell'ospite.

Per quanto concerne, invece, la loro efficacia a livello intestinale, le caratteristiche ottimali includono tolleranza alle condizioni presenti nel tratto gastrointestinale (resistenza ai succhi gastrici, alla bile, e alla digestione ad opera di enzimi enterici o pancreatici), capacità di adesione alle superfici intestinali, antagonismo nei confronti di batteri patogeni, produzione di sostanze antimicrobiche e capacità di modulare la risposta immune dell'ospite (Dunne *et al.*, 2001).

## Sicurezza

L'impiego su larga scala di prodotti probiotici ha reso necessario definire i potenziali rischi associati al loro consumo. Nonostante siano microrganismi generalmente non patogeni, la

somministrazione dovrebbe essere effettuata con prudenza e cautela soprattutto in determinati gruppi di pazienti, quali bambini nati prematuramente o con problemi di immunodeficienza.

Casi di sepsi batterica e fungina, la cui insorgenza costituisce il rischio principale, sono stati, infatti, già riportati e correlati all'ingestione di supplementi probiotici in pazienti debilitati, con sistema immunitario compromesso o affetti da malattie croniche (Tab. 9 e 10). Nella maggior parte dei casi, una terapia antimicrobica adeguata è stata sufficiente a risolvere batteriemia e fungemia, mentre in alcuni pazienti si è sviluppato shock settico, e in altri casi l'esito è stato addirittura fatale.

**Tab. 9.** Casi di sepsi batterica nell'uomo correlata alla somministrazione di probiotici.

Study	Age	Risk factors	Probiotic	Method of identification	Form of sepsis
Rautio <i>et al.</i> (1999)	74 y	Diabetes mellitus	LGG	API 50 CH, PFGE of DNA restriction fragments	Liver abscess
Mackay <i>et al.</i> (1999)	67 y	Mitral regurgitation, dental extraction	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , 3 x10 <sup>9</sup> CFU/d	API 50 CH, pyrolysis mass spectrometry	Endocarditis
Kunz <i>et al.</i> (2004)	3 mo	Prematurity, short-gut syndrome	LGG	No confirmatory typing	Bacteremia
	10 wk	Prematurity, inflamed intestine, short-gut syndrome	LGG	PFGE of DNA restriction fragments	Bacteremia
De Groote <i>et al.</i> (2005)	11 mo	Prematurity, gastrostomy, short-gut syndrome, CVC, parenteral nutrition, rotavirus diarrhea	LGG, 1/4 capsule/d	rRNA sequencing	Bacteremia
Land <i>et al.</i> (2005)	4 mo	Cardiac	LGG, 10 <sup>10</sup> CFU/d	Repetitive element sequence-based PCR DNA fingerprinting	Endocarditis
	6 y	Cerebral palsy, jejunostomy feeding, CVC, antibiotic-associated diarrhea	LGG, 10 <sup>10</sup> CFU/d	Repetitive element sequence-based PCR DNA fingerprinting	Bacteremia
Richard <i>et al.</i> (1988)	47 y	Not stated	<i>Bacillus subtilis</i> , 8 x10 <sup>9</sup> spores/d	Antibiotic susceptibility	Bacteremia
	25 y	Not stated	<i>Bacillus subtilis</i> , 8 x10 <sup>9</sup> spores/d	Antibiotic susceptibility	Bacteremia
	63 y	Neoplastic disease	<i>Bacillus subtilis</i> , 8 x10 <sup>9</sup> spores/d	Antibiotic susceptibility	Bacteremia
	79 y	Not stated	<i>Bacillus subtilis</i> , 8 x10 <sup>9</sup> spores/d	Antibiotic susceptibility	Bacteremia
Oggioni <i>et al.</i> (1998); Spinosa <i>et al.</i> (2000)*	73 y	Chronic lymphocytic leukemia	<i>B. subtilis</i> , 10 <sup>9</sup> spores/d	16S rRNA sequencing	Bacteremia

CVC, central venous catheter.

\* Outcome fatale non chiaramente correlato a sepsi probiotica.

**Tab. 10.** Casi di sepsi fungina nell'uomo correlata alla somministrazione di probiotici.

Study	Age	Risk factors	Probiotic	Method of identification	Form of sepsis
Hennequin <i>et al.</i> (2000)	30 mo	Cystic fibrosis, CVC, poor nutritional state, intestinal surgery	<i>Saccharomyces boulardii</i> , 750 mg/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
	36 y	HIV infection, CVC, diarrhea	<i>S. boulardii</i> , 1.5 g/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
	47 y	Antibiotic-associated diarrhea, upper GI surgery for malignancy	<i>S. boulardii</i> , 2 g/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Septic shock
	78 y	Peptic ulcer, chronic renal failure, pneumonia, COPD	<i>S. boulardii</i> , 1.5 g/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
Cassone <i>et al.</i> (2003)	34 y	CVC, intensive care unit	No direct treatment	PFGE of undigested chromosomal DNA	Fungemia
	48 y	CVC, intensive care unit	No direct treatment	PFGE of undigested chromosomal DNA	Fungemia
	75 y	CVC, intensive care unit	No direct treatment	PFGE of undigested chromosomal DNA	CVC colonization
	35 y	Intensive care unit	Unclear	PFGE of undigested chromosomal DNA	Fungemia
Perapoch <i>et al.</i> (2000)	3 mo	CVC, diarrhea, parenteral nutrition	<i>S. boulardii</i> , 100 mg/d	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
	Infant	Short-bowel syndrome, CVC, parenteral nutrition	Not received directly (no direct treatment)	PFGE of mitochondrial DNA restriction fragments; PFGE of undigested chromosomal DNA	Fungemia
Lherm <i>et al.</i> (2002)	50–82 y	Acutely unwell on intensive care unit with respiratory failure, CVC	<i>S. boulardii</i> , 1.5–3.0 g/d	PFGE of nuclear and mitochondrial DNA restriction fragments	Fungemia
Bassetti <i>et al.</i> (1998)	51 y	Immunosuppression, <i>Clostridium difficile</i> -associated diarrhea, CVC	<i>S. boulardii</i> , 1 g/d	PFGE of DNA restriction fragments	Fungemia
Riquelme <i>et al.</i> (2003)	42 y	Kidney and pancreas transplant, immunosuppression, <i>C. difficile</i> -associated diarrhea	<i>S. boulardii</i> , 1 g/d	PFGE of DNA restriction fragments	Fungemia
Fredenucci <i>et al.</i> (1998)	49 y	Antibiotic-associated diarrhea, immunosuppression	<i>S. boulardii</i> , 200 mg/d	PFGE of undigested chromosomal DNA API 32C	Fungemia
Cesaro <i>et al.</i> (2000)	8 mo	Acute myeloid leukemia, CVC, neutropenia	<i>S. boulardii</i>	API 32C	Fungemia
Cherifi <i>et al.</i> (2004)	89 y	<i>C. difficile</i> -associated, colitis, gastrostomy	<i>S. boulardii</i> , 300 mg/d	No formal identification described	Fungemia
Henry <i>et al.</i> (2004)	65 y	Malignancy, immunecompromise, mucositis, diarrhea, parenteral nutrition	<i>S. boulardii</i>	No formal identification described	Fungemia
Niault <i>et al.</i> (1999)	78 y	Antibiotic-associated diarrhea, intensive care unit, intragastric feeding	<i>S. boulardii</i> , 1.5 g/d	No formal identification described	Fungemia
Viggiano <i>et al.</i> (1995)	14 mo	Burns, diarrhea, gastrostomy	<i>S. boulardii</i> , 200 mg/d	No formal identification described	Fungemic shock
Zunic <i>et al.</i>	33 y	Inflammatory bowel	<i>S. boulardii</i> , 1.5	No formal	Fungemia

(1991)		disease, intensive care unit, parenteral nutrition	g/d	identification described	
Pletinckx <i>et al.</i> (1995)	1 y	Parenteral nutrition, antibiotic-associated diarrhea, CVC	<i>S. boulardii</i> , 600 mg/d	No formal identification described	Septicemia
Rijnders <i>et al.</i> (2000)*	74 y	Colitis, nasogastric feeding	<i>S. boulardii</i> , 600 mg/d	No formal identification described	Fungemia
Lestin <i>et al.</i> (2003)#	48 y	Diabetes, <i>C. difficile</i> -associated diarrhea	<i>S. boulardii</i> , 150 mg/d	API 32C	Fatal fungemia

CVC, central venous catheter; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GI, gastrointestinal.

250 mg *S. boulardii* =  $5.425 \times 10^{13}$  cellule vitali.

\*Outcome fatale (n = 3) non chiaramente correlato a sepsi probiotica.

#Fungemia fatale associata a megacolon tossico; morte correlata a sepsi probiotica.

Recentemente, proprio sulla base dei casi di sepsi riportati fino ad ora, Boyle *et al.* (2006) hanno proposto una lista di fattori di rischio associati all'impiego di prodotti probiotici (Tab. 11). La presenza di un singolo fattore di rischio "maggiore" o di più fattori di rischio di minore entità, dovrebbe comportare una certa cautela nel loro utilizzo. Benché non esistano chiare evidenze, la capacità dei probiotici di modulare le risposte immuni dell'ospite fa sì che anche la gravidanza costituisca un ulteriore fattore di rischio. Specie probiotiche appartenenti al genere *Lactobacillus* si sono rivelate, infatti, in grado di inibire il fenotipo Th2 e determinare un incremento nella concentrazione di IFN- $\gamma$  [citochina pro-infiammatoria, secreta da cellule T attivate e natural killer (NK), capace di sostenere reazioni citotossiche], effetti che potrebbero mettere in serio pericolo la vitalità del feto (Wegmann *et al.*, 1993; Pochard *et al.*, 2002; Pohjavuori *et al.*, 2004).

**Tab. 11.** Fattori di rischio proposti da Boyle *et al.* (2006) per lo sviluppo di sepsi probiotica.

<b>Major risk factors</b>
1) Immune compromise, including a debilitated state or malignancy
2) Premature infants
<b>Minor risk factors</b>
1) CVC
2) Impaired intestinal epithelial barrier, eg, diarrheal illness, intestinal inflammation
3) Administration of probiotic by jejunostomy
4) Concomitant administration of broad spectrum antibiotics to which probiotic is resistant
5) Probiotics with properties of high mucosal adhesion or known pathogenicity
6) Cardiac valvular disease ( <i>Lactobacillus</i> probiotics only)

Alcuni ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium*, e membri comuni del microbiota intestinale umano, sono stati correlati a casi di infezioni dentali, polmonari, a batteriemia, ascessi ed infezioni sanguigne (Green, 1978; Gasser, 1994; Saarela *et al.*, 2002; Borriello *et al.*, 2003). Nella maggior parte dei casi, è stato dimostrato il coinvolgimento specifico di *B. dentium* (originariamente denominato *B. eriksonii*), l'unica specie di *Bifidobacterium* classificata nel gruppo di rischio 2 e ritenuta un patogeno dentale. La presenza di *B. adolescentis* è stata riportata, invece, solo in un numero limitato di casi di otite (Brook, 1996).

Benché LAB e bifidobatteri siano in grado di invadere l'ospite mediante meccanismi di traslocazione batterica con conseguente batteriemia (Berg, 1992; Dietch *et al.*, 1992),

probabilmente sono comunque necessari altri fattori, sia batterici che dell'ospite, perché tali microrganismi possano determinare l'insorgenza di infezioni sistemiche, da endocarditi a setticemia (Ishibashi e Yamazaki, 2001). La traslocazione batterica è un fenomeno determinato da una compromessa barriera intestinale che consente, quindi, il passaggio di batteri (o di componenti e prodotti batterici) attraverso la membrana mucosale e l'epitelio intestinale. Successivamente, i batteri traslocati sono trasportati, attraverso la tunica propria, ai linfonodi mesenterici ed altri organi con conseguente batteriemia che può aggravarsi fino all'insorgenza di setticemia (Berg, 1985, 1992; Van Leeuwen *et al.*, 1994). Yamazaki *et al.* (1991) hanno riportato un caso di traslocazione batterica in topi gnotobiotici monoassociati con *B. longum* BB536, ma la traslocazione non ha, comunque, prodotto infezioni o effetti dannosi sulla salute dell'ospite; al contrario, la monoassociazione con *B. longum* ha portato ad un'incremento generale nelle risposte immuni.

Al fine di selezionare batteri probiotici "safe", un fattore di rilievo è costituito dall'incapacità di produrre sostanze pericolose per l'ospite. I bifidobatteri possiedono, ad esempio, bassa attività deaminasica, responsabile della produzione di ammonio (Ishibashi e Yamazaki, 2001), e mancano dell'attività 7 $\alpha$ -deidrossilasica correlata alla produzione di acidi biliari secondari che agiscono come promotori nei processi di carcinogenesi (Takahashi e Morotomi, 1994).

Ulteriori test necessari per la valutazione della sicurezza di probiotici sono la determinazione dell'attività di aggregazione piastrinica, che sembra contribuire alla progressione di endocardite infettiva (Douglas *et al.*, 1990), e la valutazione di attività enzimatiche responsabili della degradazione del muco intestinale e della conseguente compromissione della barriera mucosale (Zhou *et al.*, 2001). L'intestino umano è, infatti, ricoperto da uno strato di muco protettivo, coinvolto nella funzione barriera e cruciale nel prevenire adesione e binding di patogeni, tossine ed altri agenti pericolosi presenti nel lumen intestinale (Florey, 1955; Macfarlane *et al.*, 2005). Lo strato di muco consiste principalmente di acqua (circa 95%) e glicoproteine (1-10%), ma anche di elettroliti, anticorpi, e acidi nucleici (Macfarlane *et al.*, 2005), e costituisce una riserva di nutrienti per la crescita di batteri capaci di sopravvivere, moltiplicarsi e colonizzare questo strato (Derrien *et al.*, 2004a). Non è ancora ben chiaro se proteine di superficie, glicoproteine e lectine presenti sulla parete cellulare dei probiotici possano essere realmente correlate all'infettività, e se glicosidasi e proteasi (arilamidasi), responsabili del breakdown delle glicoproteine umane, giochino un ruolo fondamentale nei processi di infezione. La dimostrazione del reale coinvolgimento dei probiotici nei processi di traslocazione e infezione batterica, metterebbe subito in discussione uno dei principali criteri di selezione, ovvero la capacità di aderire alle cellule epiteliali dell'intestino umano. Recentemente, Ruas-Madiedo *et al.* (2008) hanno dimostrato, mediante studi *in vitro*, la degradazione della mucina intestinale ad opera di ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium*, riaprendo così il dibattito sui criteri relativi alla sicurezza dei probiotici. La capacità degradativa sembra essere correlata alla presenza di 2 geni, *afcA* e *engBF*, codificanti per glicosidasi extracellulari.

Il possibile trasferimento di geni conferenti resistenza ad agenti antimicrobici costituisce un ulteriore fattore di rischio associato al trattamento probiotico. Molti ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus*, ad esempio, sono naturalmente resistenti all'antibiotico vancomicina (per la presenza di D-Ala-D-Lattato anziché D-Ala-D-Ala a livello di peptidoglicano), ma i geni conferenti la resistenza sono cromosomici e, quindi, non facilmente trasferibili ad altre specie (Tynkkynen *et al.*, 1998). Tuttavia, Mater *et al.* (2008) hanno dimostrato per la prima volta il trasferimento della resistenza a vancomicina (cluster vanA) da enterococchi ad un ceppo commerciale di *L.*

*acidophilus*, suggerendo una certa cautela nell'impiego di probiotici in pazienti immunocompromessi o durante terapia antibiotica. Il trasferimento è avvenuto, in assenza di pressione selettiva, sia *in vitro* che *in vivo* nell'intestino murino, e sono state misurate alte frequenze di transconiuganti, capaci di persistere a livello del tratto gastrointestinale. Studi *in vitro* hanno dimostrato l'alto potenziale di trasferimento di geni antibiotico-resistenti anche da enterococchi probiotici a batteri patogeni (Lund e Edlund, 2001). Nel 2003, lo SCAN, EU's Scientific Committee on Animal Nutrition, ha introdotto linee guida che potrebbero essere estese anche agli alimenti destinati all'uso umano ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf)). Recentemente, sono stati riportati i pattern fenotipici di suscettibilità antimicrobica per diversi bifidobatteri (Delgado *et al.*, 2005; Moubareck *et al.*, 2005), ed è stata evidenziata la presenza del gene *tet(W)* conferente resistenza all'antibiotico tetraciclina, e ampiamente distribuito in diversi batteri intestinali (Salysers *et al.*, 2004; Roberts, 2005). Mediante impiego di un approccio microchip-hybridization, è stata dimostrata la presenza di una copia cromosomica del gene *tet(W)* nel genoma di *B. lactis* DSM10140, il che suggerisce la necessità di rimuovere questo microorganismo come probiotico oppure inattivare irreversibilmente il gene che conferisce resistenza antimicrobica (Kastner *et al.*, 2005).

Ceppi probiotici differenti possono, inoltre, determinare effetti molto specifici e variabili tra loro persino all'interno della stessa specie. In diversi studi sono state, infatti, riscontrate significative differenze nell'efficacia e negli outcome microbiologici e clinici correlati all'impiego di diversi probiotici (Wagner *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2004). I loro effetti possono inoltre subire variazioni in condizioni di salute o malattia, e/o in relazione all'età dei pazienti. L'ampio range di effetti sembra essere correlato alle capacità dei probiotici di esprimere uniche e particolari molecole di superficie (glicolipidi e microbe-associated molecular patterns), e di secernere prodotti in grado di interagire con vari componenti delle cellule epiteliali (Marco *et al.*, 2006). In assenza di ulteriori e precise conferme in studi separati, non è quindi possibile trarre conclusioni generalizzate sugli effetti mostrati da un singolo ceppo né sui rischi associati al suo consumo.

Molte evidenze supportano l'importanza della vitalità di ceppi probiotici. In studi condotti sull'uomo, batteri vitali hanno determinato effetti immunologici maggiori rispetto alle loro controparti non vitali, e batteri inattivati sono stati persino associati ad effetti negativi sulla salute dell'ospite (Kaila *et al.*, 1995; Kirjavainen *et al.*, 2003).

Attualmente, non esistono informazioni chiare sugli appropriati regimi di dosaggio dei probiotici. In studi condotti con metodi coltura-dipendenti, una dose giornaliera  $\geq 10^{10}$  CFU si è rivelata necessaria per ottenere un recupero fecale affidabile di LGG (Saxelin *et al.*, 1991). Tuttavia, la detection a livello di feci potrebbe non riflettere in alcun modo l'outcome clinico. Inoltre, il numero di batteri che raggiungono vitali l'intestino dipende da altri fattori in aggiunta alla dose, quali formulazione probiotica, somministrazione contemporanea di cibo o latte (che potrebbe fornire protezione contro i succhi gastrici), pH gastrico dell'ospite, motilità intestinale e composizione del microbiota. Le formulazioni probiotiche commercialmente disponibili contengono generalmente  $\geq 10^6$  CFU/g di microrganismi vitali, ma le dosi richieste per l'ottenimento di specifici effetti clinici non sono ancora state determinate.

## Tolleranza a pH, osmolarità e sali biliari

Al fine di raggiungere il tratto gastrointestinale dell'ospite con un numero di cellule batteriche sufficienti per l'ottenimento di effetti terapeutici, i probiotici devono essere in grado di resistere ai bassi valori di pH presenti a livello gastrico (pH 2), alla ridotta attività dell'acqua ( $a_w$  equivalente a 0.3 M NaCl) e alla presenza di sali biliari nell'intestino tenue (5 mM). Gli acidi biliari inibiscono la crescita di diversi organismi probiotici Gram-positivi, quali ceppi appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, mentre hanno un effetto decisamente inferiore se non addirittura nullo su organismi Gram-negativi come *E. coli*. La resistenza a pH acidi risulta critica anche in campo alimentare, in quanto uno dei principali fattori responsabili della mortalità di bifidobatteri in cibi fermentati, è proprio l'acidità (Moreno *et al.*, 2006).

Il clonaggio del sistema di uptake della betaina, BetL, di *L. monocytogenes* in *L. salivarius* UCC118 (Sheehan *et al.*, 2006) e *B. breve* UCC2003 (Sheehan *et al.*, 2007), ha determinato un significativo miglioramento nella tolleranza dei probiotici a succhi gastrici e a condizioni di elevata osmolarità, che mimano l'ambiente intestinale. Tuttavia, la naturale selezione di probiotici caratterizzati da un'espressione elevata di omologhi BetL appare necessaria per poter ottenere effetti protettivi simili ma senza impiego delle tecnologie del DNA ricombinante.

L'induzione di acido-resistenza in ceppi di *B. longum* e *B. catenulatum* ha determinato un incremento nella tolleranza anche ad altre condizioni di stress (sali, bile ed alte temperature), suggerendo lo sviluppo di meccanismi di protezione crociata (Collado e Sanz, 2007). Inoltre, i ceppi acido-resistenti hanno mostrato una maggiore capacità fermentativa ed un aumento in attività enzimatiche presumibilmente coinvolte nell'utilizzo di glicoproteine umane e di prebiotici, il che incrementa ulteriormente le loro possibilità di sopravvivenza e colonizzazione transiente dell'epitelio intestinale. L'esposizione a condizioni di stress acido può indurre variazioni anche a livello di componenti strutturali, quali acidi grassi della membrana cellulare, con conseguenti modifiche nella permeabilità di membrana e nei pattern di resistenza/sensibilità ad antibiotici (Fozo *et al.*, 2004).

Tecniche di microincapsulazione sono state sviluppate al fine di migliorare la stabilità di organismi probiotici in functional food (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Ding e Shah, 2007). Come materiale incapsulante è stato largamente impiegato l'alginato, additivo alimentare non tossico (Prevost e Divies, 1992). Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla solubilità di questo materiale che garantisce la reversibilità della microincapsulazione ed il rilascio delle cellule intrappolate.

Recentemente, Sánchez *et al.* (2007a) hanno analizzato i meccanismi di risposta e adattamento a stress acido in *B. longum*. Mediante analisi dei profili proteomici, quantificazione di prodotti metabolici, e determinazione dello stato redox cellulare, è stato evidenziato il coinvolgimento di variazioni nel flusso glicolitico e nella capacità di regolare il pH interno, come dimostrato dalla sovrapproduzione di due subunità intracellulari di  $F_1F_0$ -ATPasi. L'adattamento e la risposta a pH acidi in *B. longum* si accompagnano, inoltre, ad un incremento nella concentrazione di ammonio citoplasmatico, probabilmente derivante dalla deamminazione amminoacidica, e ad una ridotta attività dell'enzima bile salt hydrolase (BSH), che catalizza il rilascio di glicina e taurina dai sali biliari coniugati. La maggiore tossicità dei sali biliari deconiugati rispetto alle loro controparti coniugate (Grill *et al.*, 2000; Noriega *et al.*, 2006), suggerisce come il calo dell'attività BSH possa rappresentare un meccanismo di difesa di *Bifidobacterium* nei confronti della bile.

I sali biliari sono detergenti naturali, sintetizzati nel fegato a partire da colesterolo e conservati come coniugati amminoacidici a livello della vescica biliare, che facilitano digestione e assorbimento di componenti della dieta idrofobici. La natura anfipatica è responsabile della forte attività antimicrobica, che determina danno alle membrane e stress ossidativo (Bernstein *et al.*, 1999).

La superficie cellulare dei microrganismi rappresenta il primo target fisico d'azione della bile. I sali biliari sono in grado di modulare l'espressione di proteine di membrana in batteri enterici (Bron *et al.*, 2004b; Sánchez *et al.*, 2006), di influenzare la composizione lipidica in *Bifidobacterium* (Gómez-Zavaglia *et al.*, 2002) e di compromettere la funzionalità della membrana cellulare in *Lactobacillus* (Taranto *et al.*, 2003, 2006). I meccanismi di inibizione della crescita sono probabilmente correlati alla dissipazione del potenziale di membrana (Kurdi *et al.*, 2006). Ai fini di contrastare la tossicità della bile, in *Bifidobacterium* è stato riportato il coinvolgimento di diversi meccanismi cellulari, quali espulsione dei sali biliari attraverso proteine multidrug resistance (Price *et al.*, 2006) e incrementata attività BSH (Begley *et al.*, 2006; Noriega *et al.*, 2006). In particolare, l'adattamento alla bile in *B. animalis* subsp. *lactis* ha determinato un calo della fluidità di membrana, una riduzione del rapporto proteine:fosfolipidi, ed uno shift nella composizione in acidi grassi della membrana cellulare (Ruiz *et al.*, 2007).

Sánchez *et al.* (2005) hanno mostrato come i sali biliari, a cui i bifidobatteri sono naturalmente esposti, inducano una complessa risposta fisiologica in *B. longum*, che coinvolge chaperone molecolari, diversi enzimi della glicolisi e del catabolismo del piruvato, proteine coinvolte nei processi di trascrizione e traduzione, e nel metabolismo di amminoacidi e nucleotidi.

Successivamente, mediante approccio proteomico e fisiologico, sono stati determinati in *B. animalis* subsp. *lactis* i meccanismi coinvolti nella risposta e resistenza ai sali biliari (Sánchez *et al.*, 2007b). Analogamente a quanto già verificato in *B. longum*, in presenza della bile sono risultati incrementati i livelli d'espressione di proteine del metabolismo dei carboidrati, chaperone molecolari, fattori trascrizionali e traduzionali. E' stato inoltre confermato il link tra resistenza ai sali biliari ed incremento dell'attività BSH, che permette di contrastare la tossicità dei sali biliari coniugati (De Smet *et al.*, 1995; Grill *et al.*, 2000).

Whitehead *et al.* (2008) hanno determinato, mediante microarray, le variazioni nell'espressione genica associate all'esposizione di *L. reuteri* ATCC 55730 a concentrazioni fisiologiche di bile (0.2-2% nel piccolo intestino). In particolare, sono stati identificati geni coinvolti nello stress a livello di membrana e/o parete cellulare, stress ossidativo, danno al DNA e denaturazione di proteine. Mutazioni in una molecola chaperone, in una putativa esterasi ed in un trasportatore multidrug resistance hanno ridotto la capacità del microrganismo di rispondere ed adattarsi allo shock determinato dall'esposizione ad acidi biliari.

I microrganismi probiotici vengono, però, sottoposti ad una serie di stress non solo a livello del tratto gastrointestinale dell'ospite, ma anche durante il processing industriale. Ad esempio, le alte temperature raggiunte durante lo spray drying (Simpson *et al.*, 2005), così come durante la conservazione del prodotto possono limitare la produzione su larga scala e la stabilità del prodotto finale. Mediante approccio proteomico, sono state identificate in *B. longum* differenti proteine indotte da alte temperature, quali chaperone molecolari, proteine coinvolte nei processi di trascrizione e traduzione, ed enzimi di diversi pathway metabolici (Savijoki *et al.*, 2005). Recentemente, Rezzonico *et al.* (2007) hanno impiegato un whole-genome DNA microarray per l'analisi delle variazioni nei livelli di espressione genica in seguito a heat shock subletale.

L'incubazione a 50°C anche solo per pochi minuti è risultata nella down-regolazione di complessi macchinari cellulari coinvolti nei processi di traduzione, divisione cellulare e partizione cromosomica, e nell'induzione dell'espressione di geni con funzione sconosciuta ma ampiamente conservati in altre specie batteriche e presumibilmente coinvolti nella risposta a stress termici. Più recentemente, Suokko *et al.* (2008) hanno valutato come la proteasi ClpL sia essenziale per l'induzione di termotolleranza in *L. gasseri* e faccia parte del regulone HrcA.

## Adesione alla mucosa intestinale

La capacità di aderire alla mucosa intestinale è considerata uno dei principali criteri di selezione nell'individuazione di potenziali probiotici (Ouwehand *et al.*, 1999), in quanto consente ai ceppi di persistere a livello intestinale (Morelli *et al.*, 1997) ed esercitare effetti benefici sulla salute dell'ospite più a lungo, e permette all'ospite di ridurre il quantitativo di cellule da assumere quotidianamente. Tuttavia, l'adesione gioca un ruolo chiave anche nei meccanismi di traslocazione batterica e virulenza (Finlay e Falkow, 1997). La maggiore capacità di adesione al muco intestinale mostrata, ad esempio, da ceppi di *Lactobacillus* spp. isolati da sangue rispetto ad isolati da feci o da prodotti giornalieri, suggerisce l'esistenza di una stretta relazione tra adesione mucosale e patogenicità di *Lactobacillus* in ospiti compromessi a livello immunitario o affetti da gravi disordini (Apostolou *et al.*, 2001). La presenza, tra gli isolati clinici, anche di ceppi caratterizzati da una bassa capacità adesiva, sottolinea, comunque, come altri fattori, quali adesione alle proteine della matrice extracellulare, attività emolitica, aggregazione piastrinica e resistenza al siero, siano coinvolti nei processi di traslocazione dei lattobacilli dall'intestino al circolo sanguigno (Apostolou *et al.*, 2001).

Al fine di quantificare l'adesione di *Bifidobacterium* alle cellule dell'epitelio intestinale, Candela *et al.* (2005) hanno sviluppato un approccio analitico basato sulla tecnica della real-time PCR, che consente, in modo rapido, accurato e con elevata sensibilità, di rivelare e quantificare simultaneamente differenti generi e specie batteriche aderenti ad un monolayer epiteliale. Mediante tale analisi, è stato dimostrato come l'adesione a Caco-2 cell sia un fenotipo variabile all'interno del genere *Bifidobacterium*. Sono stati, infatti, identificati 3 diversi caratteri adesivi: alta adesività (> 40 cellule batteriche/Caco-2 cell), adesività (5–40 cellule batteriche/Caco-2 cell), e nessuna capacità adesiva (< 5 cellule batteriche/Caco-2 cell). La metodologia molecolare sviluppata è stata impiegata anche in studi di competizione con enteropatogeni; tutti i ceppi di *Bifidobacterium* esaminati hanno mostrato attività di spiazzamento nei confronti di *S. enterica* serovar. *typhimurium*, *Y. enterocolitica* and *E. coli* EPEC.

In assenza di adesione alla mucosa intestinale, la concentrazione dei probiotici viene diluita fino a raggiungere un livello insignificante dopo il consumo di un pasto o di una bevanda. Benché non sia ancora stato chiarito se tutti i probiotici normalmente impiegati possano crescere nell'ambiente intestinale, nessun probiotico commerciale è in grado di stabilirsi in maniera permanente nell'intestino umano, il che suggerisce come, anche in presenza di divisione cellulare, le specifiche velocità di crescita non siano sufficienti a rimpiazzare i microrganismi che continuamente si distaccano dalla superficie intestinale (Salminen *et al.*, 1998b; Rastall, 2004; Klingberg e Budde, 2006). Questa colonizzazione transiente sembra garantire, comunque, la protezione della mucosa intestinale da microrganismi patogeni, la stimolazione delle risposte immuni locali e sistemiche, e

l'integrità della funzione della barriera mucosale. Resta ancora da definire se la colonizzazione intestinale sia necessaria perché i probiotici possano esercitare specifici effetti.

Va comunque sottolineato che le conoscenze relative all'adesione di probiotici derivano per lo più da studi *in vitro*, che mimano in maniera davvero parziale la complessità dell'ecosistema intestinale. Il fissaggio convenzionale dei tessuti intestinali, che comporta distacco e perdita di muco superficiale, e l'impiego di linee cellulari incapaci di produrre muco, costituiscono un grosso limite sperimentale e pongono notevoli dubbi sull'importanza e sul significato fisiologico dell'adesione epiteliale (Corthésy *et al.*, 2007).

## **Attività antimicrobica**

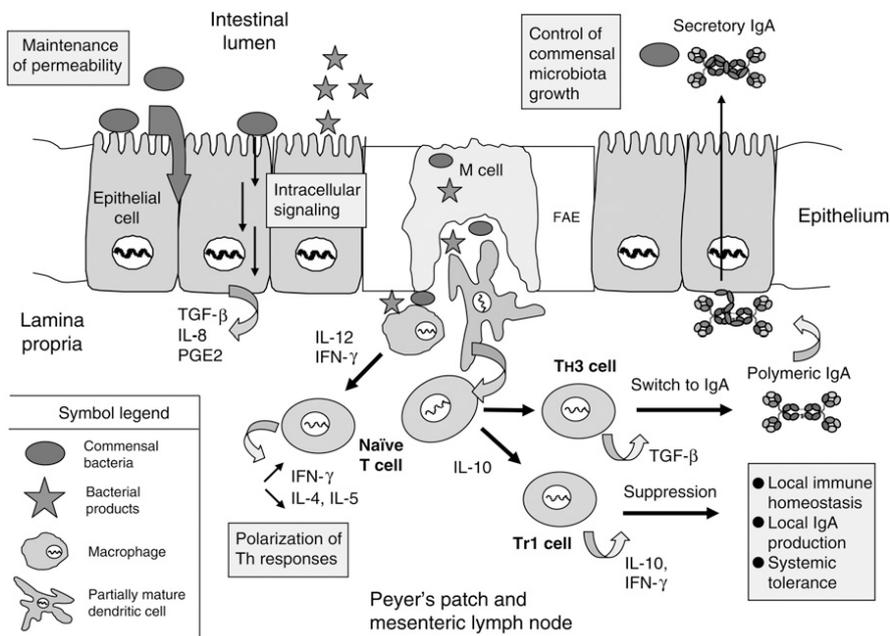
La produzione di agenti antibatterici, quali batteriocine e composti simili (Vincent *et al.*, 1959), consente ai probiotici di controllare la crescita di membri del microbiota intestinale e di modulare, quindi, microflora e metabolismo. A questi meccanismi si aggiunge la produzione, durante il metabolismo degli zuccheri, di acidi organici (acido lattico, acetico e formico), che determinano una riduzione del pH intestinale, con conseguente inibizione della crescita di specie batteriche acidosensibili (Rasic, 1989), e stimolano la peristalsi intestinale favorendo l'eliminazione di microrganismi patogeni eventualmente presenti (Savage, 1977). La sopravvivenza nel tratto gastrointestinale e l'inibizione competitiva dell'adesione all'epitelio intestinale di batteri patogeni è garantita anche dalla produzione di perossido d'idrogeno, ammonio e biosurfattanti (Boyle *et al.*, 2006). *Salmonella*, *C. albicans*, *Shigella*, *Clostridium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, e *Campylobacter jejuni* sono tra i patogeni maggiormente sensibili all'azione inibitoria di *Bifidobacterium* (Berirtzoglou e Romond, 1990; Ibrahim e Bezkorovainy, 1993). All'attività antimicrobica concorre anche l'incremento, indotto da molte specie probiotiche, nella produzione di mucina e defensina- $\beta$ 2 da parte delle cellule dell'epitelio intestinale (Mack *et al.*, 2003).

## **Interazione con il sistema immune dell'ospite**

Per poter modulare l'immunità dell'ospite, fondamentale è il cross-talk tra probiotici e cellule immuni. La capacità dei probiotici di persistere e moltiplicarsi a livello intestinale non sembra costituire un prerequisito necessario per l'interazione con le cellule immunitarie, in quanto la semplice associazione con cellule epiteliali e/o il rilascio di prodotti, quali metaboliti, componenti della parete cellulare e DNA, sembrano sufficienti per scatenare cascate di signaling capaci di attivare le sottostanti cellule immuni della lamina propria (Fig. 16).

L'impatto di un'eventuale adesione batterica sui processi di traslocazione attraverso l'epitelio continua a rappresentare una questione aperta. Diversi studi hanno già riportato eventi di traslocazione di batteri commensali verso i linfonodi mesenterici, il che probabilmente svolge un ruolo centrale nello sviluppo e nell'attivazione del sistema immune intestinale (Gautreaux *et al.*, 1994; Berg, 1999). Pathway alternativi per l'attraversamento dell'epitelio sono rappresentati da cellule dendritiche, che con le loro protusioni possono attraversare le giunzioni e catturare batteri luminali (Rescigno *et al.*, 2001; Niess *et al.*, 2005), e da cellule M specializzate delle placche del Peyer (Macpherson e Uhr, 2004). Il binding al lato luminale delle cellule M consente un trasporto antigenico capace di stimolare il tessuto linfoide sottostante.

Gli effetti dei batteri probiotici sul sistema immunitario dell'ospite possono essere mediati anche da fattori solubili, rilasciati da tali microrganismi, capaci di alterare la permeabilità epiteliale (Madsen *et al.*, 2001), inibire la cascata infiammatoria (Ménard *et al.*, 2004), e mediare attivazione/maturazione/sopravvivenza di cellule dendritiche (Hoarau *et al.*, 2006). Ad esempio, il DNA isolato dalla miscela probiotica VSL#3 è stato capace di generare una risposta non infiammatoria a livello di cellule epiteliali ed immuni, e determinare inibizione della secrezione di IL-8 da parte delle cellule epiteliali, attenuazione dell'IFN- $\gamma$  indotto da *B. vulgatus*, inibizione della produzione di TNF- $\alpha$ , e miglioramento nello score istologico dell'infiammazione in topi knockout per IL-10 (Jijon *et al.*, 2004; Rachmilewitz *et al.*, 2004).



**Fig. 16.** Cross-talk tra batteri probiotici e mucosa intestinale.

A livello di epitelio intestinale, gli effetti benefici dei probiotici potrebbero essere mediati da processi di colonizzazione transiente e/o rilascio di composti bioattivi, con rinforzo della barriera intestinale e modulazione diretta delle funzioni delle cellule epiteliali quali rilascio di citochine e chemochine.

Benché rappresenti un evento limitato, la traslocazione di batteri verso la lamina propria influenza l'immunità innata e adattativa mediante attivazione della produzione di citochine da parte di monociti e macrofagi. Il campionamento operato dalle cellule M delle placche del Peyer ed il successivo coinvolgimento delle cellule dendritiche contribuisce alla presentazione di antigeni microbici a cellule T naive a livello di placche del Peyer e linfonodi mesenterici. Questo consente una risposta mucosale mediata da IgA al fine di prevenire overgrowth e diffusione batterica.

Lo stesso pathway di processing svolge un ruolo critico nel modellare il sistema immunitario mucosale verso un pattern non infiammatorio e tollerogenico mediante induzione di cellule T regolatorie.

Diversi studi hanno esplorato il potenziale ruolo dei probiotici nell'induzione, o ripristino, di risposte immuni di tipo regolatorio a livello intestinale. Studi *in vitro* hanno evidenziato come componenti non definiti di lattobacilli possano avere effetti anti-proliferativi su cellule T ed effetti soppressivi sulla secrezione di citochine (Pessi *et al.*, 1999). Mediante l'impiego di modelli animali, è stato dimostrato un incremento nella porzione di cellule T CD25<sup>+</sup> (subset delle cellule CD4<sup>+</sup> con un ruolo fondamentale nell'omeostasi intestinale), ed una riduzione nella reattività delle cellule T in seguito a somministrazione di diversi ceppi di *Lactobacillus* (Herias *et al.*, 1999; Kirjavainen *et al.*, 1999; Mike *et al.*, 1999). In trial clinici, l'ingestione di *L. rhamnosus* GG è stata associata ad

elevate concentrazioni sieriche di IL-10 (Pessi *et al.*, 2000), ma a nessun effetto protettivo in pazienti affetti da IBD (Prantera *et al.*, 2002).

Microrganismi probiotici e commensali non patogeni sono capaci di indurre risposte anticorpali di IgA secretorie e scatenare, quindi, fenomeni di esclusione immune e successiva eliminazione intestinale (Fang *et al.*, 2000; Cukrowska *et al.*, 2002).

L'IL-8, chemochina C-X-C regolata a livello trascrizionale da NF-kB, mostra una potente attività chemiotattica per neutrofili e proprietà stimolatorie. La sua produzione viene indotta in monociti, neutrofili, eosinofili e cellule tissutali da vari stimoli infiammatori, quali IL-1, TNF e batteri. *E. coli* Nissle 1917 ma non *L. reuteri* e LGG o VSL#3, induce la secrezione di IL-8 dalle cellule dell'epitelio intestinale, il che suggerisce come probiotici Gram-positivi e negativi possano esercitare i loro effetti benefici mediante differenti meccanismi d'azione (Lammers *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2004; Otte e Podolsky, 2004).

Ruiz *et al.* (2005) hanno identificato meccanismi di immunità innata che consentono a *B. lactis* Bb-12 di attivare una transiente risposta pro-infiammatoria a livello dell'epitelio intestinale dell'ospite. Nonostante l'induzione dell'espressione genica di IL-6, la fosforilazione/attivazione della subunità RelA di NF-kB e di MAPK p38, non sono comunque stati osservati segni istologici di infiammazione in topi monoassociati con il probiotico, il che suggerisce come l'ospite sia in grado di sviluppare meccanismi feedback per il controllo delle risposte immuni mucosali.

O'Hara *et al.* (2006) hanno riportato come i batteri probiotici *B. infantis* e *L. salivarius* non inducano risposte pro-infiammatorie, bensì siano in grado di attenuare l'attivazione di NF-kB e la secrezione di IL-8 da parte delle cellule dell'epitelio intestinale e stimolare, invece, la secrezione delle citochine regolatorie IL-10 e TNF- $\alpha$  da cellule dendritiche mieloidi.

Medina *et al.* (2007) hanno riportato il primo studio comparativo delle immunoproprietà di diversi ceppi appartenenti alla stessa specie di *B. longum*. Benché capaci di indurre specifici profili di citochine, tutti i ceppi esaminati hanno stimolato fortemente la molecola regolatoria IL-10 e la citochina pro-infiammatoria TNF- $\alpha$ . In particolare, l'IL-10 esercita un forte effetto soppressivo su linfociti Th1 e antigen presenting cell (APC), e sulla produzione di mediatori infiammatori (Feng *et al.*, 2002). È stato ipotizzato che sia l'alta percentuale G+C caratteristica del genere *Bifidobacterium* (58-61%), il fattore responsabile dell'induzione della produzione di IL-10, e che differenze nella presenza o ridondanza di motivi CpG possano giustificare la diversità degli effetti osservati per i ceppi analizzati.

In un recente studio, Ménard *et al.* (2008) hanno valutato per la prima volta in un modello *in vivo*, l'impatto sull'immunità di vari ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium*. In topi germ-free inoculati con *B. longum* NCC2705 ed altri 9 ceppi di *Bifidobacterium* isolati dalla flora fecale di neonati, è stata evidenziata una capacità specie-specifica di stimolazione dell'immunità, ed un'influenza ceppo-specifica sull'orientamento del sistema immune.

Ceppi probiotici e frazioni del surnatante digerito o non con proteasi, hanno inibito fortemente la tras migrazione neutrofila causata da *E. coli* enterotossigenico (Roselli *et al.*, 2006). Benché i neutrofili rappresentino la primaria linea di difesa contro microrganismi patogeni, una massiva e prolungata infiltrazione potrebbe perpetuare l'infiammazione e determinare danno cellulare e disfunzione della barriera epiteliale (Gewirtz *et al.*, 2002). *B. animalis* e LGG sono stati capaci di contrastare l'upregolazione di IL-8, growth-related oncogene- $\alpha$  ed epithelial neutrophil-activating peptide-78, chemochine essenziali per la migrazione neutrofila. Inoltre, i probiotici hanno

influenzato i livelli di espressione di regolatori delle chemochine, quali IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\alpha$  (Roselli *et al.*, 2006).

Mediante studi *in vitro* con Caco-2 cell, Reilly *et al.* (2007) hanno mostrato come batteri probiotici siano capaci di incrementare la produzione di IL-6 in enterociti sottoposti a stimoli infiammatori, e come questo effetto possa essere in parte determinato dagli aumentati livelli cellulari delle heat shock protein hsp70 e hsp27. L'IL-6 rappresenta una citochina pleiotropica, a cui sono state attribuite proprietà pro-infiammatorie (Papanicolaou *et al.*, 1998) ma anche effetti anti-infiammatori e protettivi nei confronti di enterociti e mucosa intestinale (Xing *et al.*, 1998). L'induzione di una risposta heat shock è già stata riportata per batteri probiotici ed è stato suggerito, come meccanismo, il potenziale coinvolgimento dell'inibizione del proteasoma. Fattori solubili prodotti dal VSL#3 sono, infatti, in grado di inibire l'attività chymotrypsin-like del proteasoma, garantendo la funzionalità delle restanti parti del proteasoma stesso, e di indurre l'espressione di heat shock protein citoprotettive, hsp72 e hsp25. Hsp72 lega e stabilizza proteine cellulari, prevenendo la loro denaturazione, mentre hsp25 stabilizza l'actina e preserva tight junction e citoscheletro (Petrof *et al.*, 2004).

Ceppi batterici appartenenti al genere *Lactobacillus* così come la miscela probiotica VSL#3 sono capaci, similmente a *E. coli* Nissle 1917 (Wehkamp *et al.*, 2004), di rinforzare le funzioni della barriera intestinale mediante upregolazione della  $\beta$ -defensina 2 enterocitaria. L'induzione di MAPK e di pathway pro-infiammatori, quali NF-kB e AP-1 (activator protein-1) in grado di regolare l'espressione di citochine pro-infiammatorie, recettori immuni e molecole d'adesione superficiali, costituisce un potenziale meccanismo d'azione (Schlee *et al.*, 2008).

Recentemente, Fink *et al.* (2007) hanno valutato gli effetti immunomodulatori di *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *B. longum* e *E. coli* Nissle 1917, mediante confronto delle risposte in 3 tipi di APC, DC mieloidi del sangue, DC derivate da monociti e monociti. E' stata dimostrata un'induzione differenziale di marker di maturazione e citochine pro-infiammatorie ma un comparabile priming, batterio-dipendente e APC-indipendente, delle funzioni effettrici di NK e cellule T.

Negli ultimi decenni, è stata presa in considerazione la possibilità di impiegare LAB come sistemi di delivery mucosale (Thole *et al.*, 2000; Seegers, 2002; Wells e Mercenier, 2003; Hanniffy *et al.*, 2004). Nonostante la dimostrazione di proprietà immunoadiuvanti ceppo-specifiche (Maassen *et al.*, 2000), la bassa antigenicità intrinseca di batteri appartenenti al genere *Lactobacillus*, ha consentito il loro utilizzo come carrier di antigeni protettivi. Gli studi più completi sono stati ottenuti con la subunità C della tossina del tetano (TTFC); i LAB impiegati come veicoli e in grado di produrre sufficienti concentrazioni antigeniche, hanno determinato, dopo somministrazione nasale o intragastrica, l'induzione di alte concentrazioni sieriche di IgG e locali di IgA (Grangette *et al.*, 2002). Parallelamente, Steidler *et al.* (1998) hanno dimostrato come le risposte immuni dell'ospite possano essere incrementate dal co-delivery di IL-2 o IL-6 e TTFC. L'approccio di delivery di citochine con proprietà immunomodulatorie note ha portato successivamente alla costruzione di ceppi ricombinanti di *L. lactis* capaci di secernere IL-10 murina (Steidler *et al.*, 2000). In questi ceppi ingegnerizzati è stato deletato il gene *thyA* codificante per la timidilato sintetasi così che, in assenza di timidina o timina, i microrganismi non possano crescere. Essi sono stati in grado di prevenire o trattare processi infiammatori in due modelli di colite murina, e gli effetti sono stati ottenuti con dosi di IL-10 decisamente inferiori rispetto all'impiego della citochina come polipeptide libero. Successivamente, Steidler *et al.* (2003) hanno costruito un ceppo capace di secernere IL-10 umana senza marker di antibiotico resistenza e con il transgene integrato a livello

cromosomico. In Olanda, è stata ottenuta l'autorizzazione ad utilizzare questo microrganismo ricombinante in un piccolo trial, recentemente concluso, su pazienti affetti da IBD (Braat *et al.*, 2006). Sono stati, inoltre, costruiti e valutati *in vivo*, ceppi di *L. lactis* capaci di secernere trefoil factor murini bioattivi (TFF). I TFF rappresentano eccellenti candidati per il ripristino dell'integrità della barriera dell'epitelio intestinale ma sono risultati per lo più inefficaci se somministrati oralmente. Vandenbroucke *et al.* (2004) hanno dimostrato come la somministrazione intragastrica di *L. lactis* secernente TFF, contrariamente a TFF purificati, sia capace di garantire un'efficace prevenzione ed il trattamento di colite murina acuta indotta da DSS (dextran sulfate sodium), e di ridurre significativamente casi di colite cronica in topi IL-10<sup>-/-</sup>.

I LAB sono stati impiegati anche per produzione e delivery mucosale di ulteriori molecole bioattive, quali anticorpi single-chain Fv, allergeni o enzimi digestivi, per il trattamento di candidosi vaginale (Beninati *et al.*, 2000), carie dentale (Krüger *et al.*, 2002), allergie (Daniel *et al.*, 2006), malattie autoimmuni (Maassen *et al.*, 1999), tumori indotti da HPV (Bermudez-Humaran *et al.*, 2005), e difetti metabolici come insufficienza pancreatica (Drouault *et al.*, 2002). Al fine di migliorare l'efficacia di lattococchi o lattobacilli come sistemi di delivery, sono stati, ad esempio, generati mutanti capaci di rilasciare più efficientemente i composti (Walker e Klaenhammer, 2001), e mutanti di *L. plantarum* e *L. lactis* defettivi nel gene codificante per l'alanina racemasi (Grangette *et al.*, 2004; Steen *et al.*, 2005).

Più recentemente, Foligne *et al.* (2007) hanno dimostrato l'efficacia, nella prevenzione e trattamento di colite acuta, di *L. lactis* secernente la proteina LcrV di *Yersinia*. Han *et al.* (2006) e Carroll *et al.* (2007) hanno dimostrato le proprietà anti-infiammatorie, con riduzione dell'infiltrazione di neutrofili e macrofagi, di LAB ingegnerizzati per la produzione dell'enzima superossido dismutasi. Benché ceppi ricombinanti non siano chiaramente accettati in functional food, una volta dimostrato un rapporto beneficio/rischio positivo a favore del consumatore se ne potrà prevedere l'uso in preparazioni farmaceutiche prescritte dal medico (Corthésy *et al.*, 2007).

## **Attività anti-infiammatoria**

Il trattamento probiotico è in grado di contrastare processi di infiammazione. Gli effetti sono presumibilmente esercitati mediante stabilizzazione del microbiota, rinforzo della barriera intestinale, degradazione di antigeni enterici ed alterazione della loro immunogenicità. Il controllo della produzione di citochine pro- e anti-infiammatorie contribuisce a giustificare l'attività anti-infiammatoria (Salminen *et al.*, 1998b; Hemmi *et al.*, 2000).

Recentemente, in uno studio condotto su animali, è stata osservato un significativo incremento nelle capacità anti-infiammatorie di un ceppo di *L. plantarum*, che produce acido lipoteicoico modificato in seguito a semplice inattivazione genica (Mercenier A, personal communication).

## **Effetti nutritivi e terapeutici**

### **Miglioramento della tolleranza al lattosio**

Una insufficiente produzione di  $\beta$ -galattosidasi è all'origine di una intolleranza alimentare verso sostanze contenenti lattosio. L'assunzione di lattici fermentati o yogurt comporta un'attenuazione dei disturbi in soggetti carenti di tale enzima, rispetto all'ingestione di un equivalente quantitativo di latte (De Wit *et al.*, 1988). Questo risultato si deve alla fermentazione del lattosio da parte di batteri lattici e bifidobatteri presenti in tali alimenti e al contemporaneo rilascio delle lattasi da essi prodotte. Il rilascio di  $\beta$ -galattosidasi a livello intestinale migliora la digestione e la soglia di intolleranza nei soggetti lattasi-deficienti, supplendo alla carenza dell'ospite (Kilara e Shahani, 1976). I bifidobatteri sono ancora più efficaci dei lattobacilli in quanto più resistenti alla bile e, quindi, in grado di raggiungere più facilmente l'intestino dove liberano il proprio enzima (Rao *et al.*, 1989).

### **Riduzione del contenuto plasmatico di colesterolo**

Sebbene non siano chiare le modalità con cui i bifidobatteri agiscono sul colesterolo ematico, la loro somministrazione mediante yogurt arricchiti è stata correlata ad una riduzione della colesterolemia e ad un possibile effetto in disordini cardiaci (Homma, 1988; Rasic *et al.*, 1992).

I presunti effetti ipocolesterolemici esercitati dai LAB potrebbero essere mediati da un'incrementata escrezione fecale di colesterolo assimilato con la dieta (Bottazzi *et al.*, 1986), o di acidi biliari, in seguito a deconiugazione (De Smet *et al.*, 1998) o assimilazione (Gilliland *et al.*, 1985). La maggiore escrezione di acidi biliari comporterebbe una ridotta quantità di acidi che ritornano al fegato, una ridotta inibizione feedback della loro sintesi e, in ultima analisi, un'incrementata conversione del colesterolo. D'altro canto, l'assimilazione di colesterolo ridurrebbe il colesterolo assorbibile, influenzando direttamente i livelli ematici (Park *et al.*, 2008).

### **Sintesi di vitamine**

Diverse sono le vitamine sintetizzate dai bifidobatteri e tra queste vi sono tiamina, riboflavina, vitamina B6, e vitamina K. Il loro assorbimento risulta, comunque, lento e scarso, così che è difficile stabilire il reale contributo all'alimentazione dell'ospite (Rasic e Kurmann, 1983).

### **Sintesi di amminoacidi**

Alcuni ceppi appartenenti al genere *Bifidobacterium*, se cresciuti in carenza di azoto organico, producono alanina, valina, acido aspartico e treonina (Matteuzzi *et al.*, 1978).

### **Inibizione della riduzione del nitrato**

Gli acidi organici prodotti da bifidobatteri e lattobacilli inibiscono la crescita di microrganismi nitrato-riduttori presenti nel tratto gastrointestinale. Tale effetto è positivo soprattutto nei neonati, nei quali l'assunzione di acqua ricca di nitrati e la loro successiva riduzione a nitriti potrebbe

provocare fenomeni di ipossia (Dolezalec, 1979). Gli ioni nitrito sono, infatti, specie chimiche fortemente ossidanti in grado di determinare l'ossidazione dell'emoglobina.

### **Effetti su assorbimento minerale, contenuto minerale osseo e struttura ossea**

La produzione di metaboliti ed enzimi microbici, ma soprattutto di vitamine sembra offrire un razionale agli effetti bone health-supporting dei probiotici (Scholz-Ahrens et al., 2007). Vitamine quali D, C, K (Weber, 1999) ed acido folico (Villa *et al.*, 1995) sono, infatti, coinvolte nel metabolismo del calcio e richieste per la formazione e concrezione della matrice ossea. Ulteriori meccanismi includono: (i) rilascio dei minerali complessati all'acido fitico ad opera di batteri produttori dell'enzima fitasi (Lan *et al.*, 2002); (ii) stimolazione dell'uptake di calcio da parte degli enterociti (Gilman e Cashman, 2006); (iii) effetto antiartritico (presumibilmente attribuibile agli effetti anti-infiammatori dei probiotici) (Rovensky *et al.*, 2004). Gli effetti positivi osservati a livello della struttura ossea potrebbero essere mediati anche da peptidi bioattivi rilasciati dalle proteine del latte durante i processi fermentativi (Narva *et al.*, 2004).

### **Rinforzo della barriera intestinale**

Diversi ceppi probiotici sono capaci di prevenire e riparare eventuali danni alla barriera mucosale determinati da antigeni alimentari (Rosenfeldt *et al.*, 2004) o farmaci (Montalto *et al.*, 2004). In particolare, sono stati dimostrati i seguenti effetti: (i) inibizione del danno alle proteine delle tight junction (Montalto *et al.*, 2004); (ii) incremento della resistenza transepiteliale (Otte e Poolsky, 2004); (iii) proliferazione cellulare a livello dei villi in topi gnotobiotici e convenzionali (Banasaz *et al.*, 2002); (iv) aumento ceppo-specifico della sintesi e della secrezione di mucina (Mack *et al.*, 2003; Otte e Podolsky, 2004).

Le tight junction rappresentano la principale connessione basolaterale tra enterociti adiacenti e sono componenti fondamentali della barriera intestinale in quanto responsabili del passaggio di fluidi, ioni, lipidi ed alte sostanze mediante pathway paracellulare (Mitic *et al.*, 2000; Schneeberger e Lynch, 2004). Sono costituite da proteine transmembrana, occludine, claudine e molecole di adesione giunzionale, i cui domini citosolici interagiscono con le proteine giunzionali periferiche della famiglia zonula occludens (ZO-1, -2 e -3). L'assemblaggio e la permeabilità paracellulare delle tight junction sono regolate da un network di pathway di signaling che coinvolgono diverse isoforme della proteina kinasi C (Schneeberger e Lynch, 2004). Zyrek *et al.* (2007) hanno dimostrato come *E. coli* Nissle 1917 sia in grado di contrastare gli effetti distruttivi sulla barriera epiteliale di un ceppo enteropatogeno di *E. coli*, e di ripristinare l'integrità e la funzionalità della barriera stessa. Mediante DNA-microarray, è stato evidenziato un incremento nell'espressione della proteina ZO-2 e nella sua redistribuzione alla superficie cellulare. Gli effetti benefici di *E. coli* Nissle 1917 sulla funzione della barriera epiteliale sembrano essere associati al blocco o ad una parziale riduzione della fosforilazione della proteina kinasi C  $\zeta$  con conseguente inattivazione parziale dell'enzima. Nella sua forma attiva, la proteina kinasi C  $\zeta$  è, infatti, in grado di fosforilare ZO-2 e promuovere la sua rimozione dalle tight junction portando ad una profonda destabilizzazione delle stesse (Baldwin *et al.*, 1990).

I probiotici *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* sono stati capaci, in monolayer di cellule epiteliali polarizzate T84, di ridurre adesione batterica e riarrangamenti citoscheletrici indotti da ceppi di *E.*

*coli* enteroemorragici (O157:H7) ed enteropatogeni (EPEC). La presenza di batteri vitali si è rivelata necessaria per ridurre il numero di foci di riarrangiamento dell'alfa-actinina, e per determinare l'incremento nella resistenza transepiteliale (TER) (Sherman *et al.*, 2005). Il TER rappresenta un marker di integrità delle tight junction, in quanto fornisce una misura elettrica inversamente correlata alla permeabilità dell'epitelio polarizzato a macromolecole quali mannitolo e EDTA-Cr (Berkes *et al.*, 2003). Simili risultati di mantenimento della funzione barriera in cellule T84 infettate con *E. coli* EPEC o O157:H7 sono stati ottenuti anche con il lievito *S. boulardii* (Czerucka *et al.*, 2000; Dahan *et al.*, 2003).

Il trattamento della colite in topi deficienti per il gene codificante IL-10 (che sviluppano una forma irregolare di colite cronica simile al morbo umano di Crohn), con la miscela probiotica VSL#3, è risultato nella normalizzazione delle funzioni fisiologiche del colon e dell'integrità della barriera, ed ha comportato una riduzione nei livelli mucosali di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), ed il miglioramento dei parametri istologici (Madsen *et al.*, 2001).

*L. rhamnosus* GG è in grado di prevenire l'apoptosi indotta da citochine in cellule umane e murine dell'epitelio intestinale, mediante attivazione di Akt ed inibizione del pathway p38 MAPK (Yan e Polk, 2002). La serina/treonina kinasi Akt svolge un ruolo fondamentale nella promozione della sopravvivenza e della proliferazione cellulare in quanto capace di inattivare diversi pathway pro-apoptotici (Bad, caspasi 9 e caspasi 3) e attivare, invece, regolatori del ciclo cellulare (cyclin/cyclin-dependent kinase, CDK) (Hanada *et al.*, 2004; Amaravadi e Thompson, 2005). Recentemente, Yan *et al.* (2007) hanno purificato e caratterizzato 2 proteine (p75 e p40) secrete da LGG responsabili di tali effetti anti-apoptotici e proliferativi su cellule dell'epitelio intestinale. La possibilità di impiegare proteine derivanti da probiotici anziché i batteri vivi come agenti terapeutici per il trattamento dell'IBD o di altri disordini infiammatori, permetterebbe di eliminare il rischio di insorgenza di batteriemia ed evitare quindi, almeno parzialmente, i problemi correlati all'effettiva sicurezza della somministrazione probiotica. Esempi di regolazione batterica delle risposte dell'ospite mediante produzione di composti biologicamente attivi, sono stati già riportati anche nel caso di batteri non probiotici. L'acido lipoteicoico prodotto da *S. aureus* è in grado, ad esempio, di prevenire reazioni delayed-type hypersensitivity attraverso l'attivazione del recettore di un fattore attivato da piastrine (Zhang *et al.*, 2005), mentre la proteina SopB di *Salmonella* consente l'attivazione di Akt e la protezione delle cellule epiteliali da morte apoptotica (Knodler *et al.*, 2005).

Studi funzionali hanno mostrato come il trattamento di cellule epiteliali con medium condizionato dalla crescita di *L. rhamnosus* GG, le protegga da stress ossidativo, presumibilmente preservando l'integrità del citoscheletro. Fattori proteici solubili, secreti da LGG, sono stati identificati come responsabili dell'attivazione di pathway di trasduzione del segnale e dell'induzione dell'espressione di heat shock protein citoprotettive, quali hsp72 e hsp25 (Tao *et al.*, 2006). E' stato, infatti, riportato come queste hsp siano in grado di fortificare la barriera epiteliale e di preservare struttura e funzione delle tight junction (Urayama *et al.*, 1998; Musch *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003; Ropeleski *et al.*, 2003).

Otte e Podolsky (2004) hanno evidenziato le differenze nella modulazione funzionale degli enterociti tra probiotici Gram-negativi e Gram-positivi. *E. coli* Nissle 1917, la miscela VSL#3 e le proteine rilasciate da questi microrganismi, hanno mostrato diversi meccanismi d'azione, quali competizione per il contatto con le superfici epiteliali, stabilizzazione del citoscheletro e della funzione barriera, ed induzione nell'espressione di mucina. In particolare, a differenza del VSL#3, *E. coli* Nissle 1917 ha indotto la secrezione di IL-8; analogamente, invece, ai batteri presenti nella

mix probiotica, ha ridotto l'apoptosi indotta da *Salmonella dublin*. Il VSL#3 ha determinato un incremento nella resistenza transepiteliale, stabilizzando tight junction e aumentando l'espressione di mucina. Benchè ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus* siano in grado di ridurre la concentrazione di mieloperossidasi (marker di infiammazione), la traslocazione di batteri luminari verso siti extraintestinali ed i livelli plasmatici di endotossina (Mao *et al.*, 1996), l'azione sinergica di ceppi probiotici in un'unica miscela si è rivelata più efficace rispetto alla somministrazione di un unico ceppo batterico (Otte e Podolsky, 2004). La combinazione di ceppi probiotici può, inoltre, influenzare le loro capacità adesive e l'attività stessa a livello del tratto gastrointestinale umano (Ouwehand *et al.*, 2000).

Le funzioni di trasporto e barriera, il turnover ed il differenziamento epiteliale sono processi regolati, almeno parzialmente, da eventi di trasduzione del segnale che traggono origine dal recettore dell'epidermal growth factor (EGFr) (Buret *et al.*, 1999). L'attivazione di EGFr causa la redistribuzione dei filamenti di actina nella regione apicale dell'epitelio, e determina variazioni a livello di tight junction e citoscheletro, associate ad un generale incremento nella resistenza transepiteliale e, dunque, nella funzione barriera (Galan *et al.*, 1992; Buret *et al.*, 1999). L'infezione di linee cellulari epiteliali con patogeni invasivi riduce questa funzione barriera, mediante riarrangiamenti di proteine citoscheletriche e giunzionali, ed incrementa la secrezione basale e stimolata di cloruro (Resta-Lenert e Barrett, 2002). Come mostrato da Resta-Lenert e Barrett (2003), il pretrattamento con i probiotici *S. thermophilus* e *L. acidophilus* è in grado di limitare i danni epiteliali indotti da patogeni enteroinvasivi e promuovere il ripristino dell'integrità mucosale. In particolare, i meccanismi d'azione riportati includono interferenza con adesione ed invasione di patogeni, incremento della resistenza transepiteliale, mantenimento (astina, ZO-1) od incremento (actinina, occludina) della fosforilazione di proteine citoscheletriche e giunzionali, reversione dell'aumentata secrezione basale di cloruro e dell'inattivazione di EGFr indotte da patogeni. L'EGF e l'attivazione dell'EGFr promuovono il ripristino della barriera epiteliale in diverse condizioni patologiche del tratto gastrointestinale (Venturi *et al.*, 1999; Czerucka *et al.*, 2000; Elliott *et al.*, 2000), e sono responsabili della regolazione di motilità, proliferazione, e mantenimento di dimensioni e forma cellulare (Banan *et al.*, 2000; Kamata *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000).

## Applicazioni

La dimostrazione del ruolo fondamentale che il microbiota intestinale svolge sulla salute dell'ospite rappresenta il razionale che giustifica la modulazione di tale microbiota mediante trattamento probiotico. La terapia probiotica viene, infatti, utilizzata al fine di correggere squilibri presenti a livello della composizione del microbiota intestinale. Tali alterazioni possono insorgere come conseguenza di stress, terapie antibiotiche, o patologie quali diarrea, intolleranze alimentari, e artrite.

### Gastroenterite acuta

La somministrazione di probiotici si è rivelata particolarmente efficace nel trattamento della diarrea causata sia da rotavirus, agente infettivo estremamente diffuso nelle nazioni occidentali (Saavedra *et al.*, 1994), che da agenti eziologici non identificati (Van Niel *et al.*, 2002). In caso di

infezione da rotavirus, diversi ceppi probiotici sono in grado di inibire la sua adesione all'epitelio intestinale mediante modificazione, indotta da fattori solubili prodotti dai probiotici stessi, dello stato di glicosilazione dei recettori delle cellule epiteliali (Freitas *et al.*, 2003). In particolare, *L. rhamnosus* GG si è rivelato efficace nella prevenzione di diarrea associata a trattamento antibiotico (Arvola *et al.*, 1999), diarrea da infezione ospedaliera (Szajewska e Mrukowicz, 2001), e diarrea secondaria a stati di malnutrizione (Oberhelman *et al.*, 1999).

## **Infiammazione gastrica**

Il microrganismo patogeno *H. pylori* rappresenta il principale agente eziologico di gastriti e ulcere gastriche, e costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo di cancro allo stomaco. Il regolare consumo di batteri probiotici è in grado di sopprimere la colonizzazione e l'attività di *H. pylori*. I probiotici non eradicano il patogeno ma ne sopprimono la crescita con conseguente riduzione dell'infiammazione (Wang *et al.*, 2004).

## **Diabete**

La somministrazione orale di *L. casei* in topi diabetici, è in grado di ridurre in maniera significativa i livelli plasmatici di glucosio, ed inibire la produzione di cellule T CD4<sup>+</sup> specifiche e citochine, quali IFN- e IL-2, che rappresentano leading factor nell'induzione di diabete autoimmune (Matsuzaki *et al.*, 1997). In maniera simile, effetti anti-diabetici sono stati riportati per *L. rhamnosus* GG e *L. acidophilus* (Tabuchi *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2007).

## **Dolore addominale**

La sensazione di dolore addominale è un sintomo ampiamente diffuso nella popolazione (20%) e in pazienti affetti da irritable bowel syndrome (IBS), la cui origine sembra essere correlata a ipersensibilità viscerale. La somministrazione orale di *L. acidophilus* NCFM è in grado di indurre l'espressione di recettori  $\mu$ -oppioidi e cannabinoidi a livello delle cellule dell'epitelio intestinale, e di mediare funzioni analgesiche. L'efficacia dei probiotici, paragonabile ad una dose standard di morfina, suggerisce come la specifica modulazione della flora intestinale costituisca un nuovo promettente trattamento per il dolore addominale, sicuro e relativamente economico (Rousseaux *et al.*, 2007).

## **Anormalità della flora colonica indotte da stress**

Eventi della vita carichi di stress possono contribuire allo sviluppo e alla riattivazione dell'infiammazione intestinale in IBD, alle manifestazioni cliniche dell'IBS, e allo sviluppo di allergie alimentari mediante sensibilizzazione del tessuto intestinale ad antigeni orali, incremento della permeabilità transepiteliale e uptake luminale di antigeni (Mayer, 2000; Collins, 2001; Yang *et al.*, 2006). Tali disturbi possono essere corretti mediante somministrazione di microrganismi probiotici che: (i) localmente, a livello dell'epitelio intestinale, esercitano un effetto trofico sulle villosità intestinali, normalizzano il microbiota, prevengono l'adesione di batteri luminali e rinforzano la funzione barriera e la sua integrità; (ii) a livello della mucosa intestinale, mediante

secrezione di fattori solubili o direttamente attraverso l'attivazione di specifici recettori [TLR, recettori del mannosio, leptina di tipo C dendritic cell-specific intercellular adhesion molecole 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)] che riconoscono strutture glucidiche di patogeni e glicoproteine self, stimolano cellule immuni, quali mast cell e linfociti T, e normalizzano il rapporto tra citochine pro- ed anti-infiammatorie; (iii) stimolano indirettamente, attraverso un pathway neuromorale citochinico, le fibre nervose afferenti (vago afferente), determinando (iv) una riduzione nei livelli del corticosterone sistemico e dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) (Eutamene e Bueno, 2007).

Il probiotico *L. farciminis* è risultato in grado di prevenire un'incrementata permeabilità paracellulare a livello di colon indotta da stress acuti, presumibilmente mediante inibizione della fosforilazione della catena leggera della miosina e contrazione del citoscheletro (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2006). Il consumo di latte fermentato con colture di yogurt arricchite con *L. casei* ha determinato un incremento nel numero di linfociti ed ha prevenuto il calo di cellule NK in studenti in preparazione di esami universitari (Marcos *et al.*, 2004).

## **Anoressia nervosa**

L'anoressia nervosa, disturbo alimentare relativamente frequente nella società moderna durante l'età adolescenziale, causa uno stato di malnutrizione con peculiari alterazioni immunologiche (Nova *et al.*, 2002). Nova *et al.* (2006) hanno riportato, dopo intake di yogurt per 10 settimane, effetti positivi sui marker immunologici correlati allo stato nutrizionale dei pazienti, come evidenziato dall'alto rapporto di cellule CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e dall'incrementata produzione di IFN- $\gamma$ .

## **Cancro colon-rettale**

Il cancro colon-rettale rappresenta una delle più diffuse forme di cancro e una delle principali cause di mortalità nel mondo occidentale (Ferley *et al.*, 2001). Diversi meccanismi sono stati proposti come potenzialmente coinvolti nell'attività anticarcinogenica dei probiotici (Tab. 12). Un'attività antigenotossica specie-specifica, che dipende strettamente dalla vitalità, è stata riportata, ad esempio, per diversi microrganismi probiotici, capaci di prevenire ed inibire danni al DNA determinati dall'esposizione a mutageni e carcinogeni (Pool-Zobel *et al.*, 1996). Mediante studi *in vitro*, è stato, infatti, dimostrato come i LAB possano legare composti mutageni (quali le ammine eterocicliche che si formano durante la cottura di cibi ricchi in proteine, Trp-P-2, PhIP, IQ, e MelQX), e come questo binding sia correlato ad una riduzione nella mutagenicità (Orrhage *et al.*, 1994). Tuttavia, non è ancora stata chiarita la natura reversibile o meno del binding *in vivo*, così come non sono noti i livelli significativi da un punto di vista biologico di mutageni e microrganismi (Commane *et al.*, 2005). LAB o composti solubili da loro prodotti possono anche interagire direttamente con cellule tumorali in coltura, inibendone la crescita e promuovendo la differenziazione cellulare (Baricault *et al.*, 1995).

**Tab. 12.** Potenziali meccanismi di attività anti-cancerogenica dei probiotici.

<b>Mechanism</b>	<b>Evidence for this from</b>
Anti-genotoxicity	Comet and Ames assays
Inhibition of colonic enzyme activity	<i>In vivo</i> studies in man and animals
Control of growth of potentially harmful bacteria	Studies of antibacterial activity of probiotics
Interaction with colonocytes	Cell line studies of adhesion and effects of bacterial attachment to colonocytes
Immune system stimulation	Measured increases in secretory and inflammatory responses in animals and man
Production of physiologically active metabolites	Short chain fatty induced differentiation and apoptosis <i>in vitro</i>

L'azione profilattica esercitata dai probiotici relativamente all'insorgenza di tumori intestinali potrebbe essere correlata alla loro capacità di metabolizzare composti potenzialmente cancerogeni (Hosono *et al.*, 1990; Deguchi *et al.*, 1993), diminuire i livelli di enzimi microbici, quali nitroreduccasi, azoreduccasi e  $\beta$ -glucuronidasi coinvolti nella produzione intestinale di carcinogeni (Burns e Rowland, 2000), ed incrementare l'attività della glutatione-S-transferasi, enzima dell'ospite associato alla detossificazione di xenobiotici (Challa *et al.*, 1997). La somministrazione di LAB è stata, inoltre, associata ad un incremento nell'attività NADPH-citocromo P-450 reduttasica del colon (Pool-Zobel *et al.*, 1996), ed alla riduzione della uridina difosfogluconil trasferasi epatica (Abdelali *et al.*, 1995), enzimi coinvolti nel metabolismo murino di carcinogeni.

Studi epidemiologici hanno evidenziato l'associazione tra rischio di sviluppo di cancro al colon e consumo di diete ad alto contenuto di grassi. L'effetto sembra essere determinato da incrementati livelli di acidi biliari rilasciati a livello intestinale per facilitare la digestione lipidica. Nel colon, i sali biliari possono essere deconiugati e successivamente  $7\alpha$ -deidrossilati ad opera di enzimi microbici, con l'ottenimento di acidi biliari secondari (deossicolico e litocolico) (Kitahara *et al.*, 2000). Tali acidi sono caratterizzati da un effetto citotossico che stimola la proliferazione delle cellule epiteliali del colon ed incrementa la probabilità di sviluppo di cancro (Ling, 1995). L'attività anticancerogena dei probiotici potrebbe essere correlata alla loro capacità di influenzare i livelli di attività  $7\alpha$ -deidrossilasica, mediante modulazione della microflora intestinale. Teoricamente, la presenza dell'enzima BSH, che caratterizza diversi microrganismi probiotici, potrebbe aumentare la disponibilità di acidi biliari secondari, ma la diminuita tossicità cellulare osservata in un ecosistema microbico intestinale simulato in seguito a trattamento con *L. reuteri*, suggerisce come i probiotici siano in grado di esercitare un effetto protettivo, presumibilmente attribuibile ad un binding fisico con i sali biliari (De Boever *et al.*, 2000). Un'ulteriore alterazione delle condizioni fisico-chimiche presenti a livello intestinale è rappresentata dall'abbassamento del pH che, insieme alla conseguente inibizione della crescita di batteri putrefattivi, potrebbe concorrere all'attività antitumorale dei probiotici (Hirayama e Rafter, 2000).

L'inibizione della formazione di lesioni pre-neoplastiche (aberrant crypt foci), osservata dopo esposizione a carcinogeni e successiva somministrazione orale di probiotici, ha permesso di ipotizzare un meccanismo d'azione durante la fase di promozione della carcinogenesi (Rowland *et al.*, 1998). I probiotici potrebbero influenzare la perdita del controllo dell'omeostasi intestinale associata a questa fase, causata da riduzione dell'apoptosi e stimolazione della proliferazione cellulare (Fearon e Vogelstein, 1990). L'ipotesi più accreditata è che, in realtà, siano metaboliti dei probiotici, SCFA ed in particolare butirrato, a regolare i processi di apoptosi e differenziazione cellulare (Mariadason *et al.*, 2000).

Estremamente complessi sono i potenziali meccanismi esercitati da batteri probiotici nella soppressione immunitaria dei processi di cancerogenesi. Una risposta immune infiammatoria è in grado di determinare il rilascio di molecole citotossiche da monociti e macrofagi attivati, capaci di lisare *in vitro* le cellule tumorali (Philip e Epstein, 1986). A questi si aggiungono gli effetti citotossici e citostatici delle citochine infiammatorie IL-1 e TNF- $\alpha$ , e delle cellule NK (Raitano e Korc, 1993; Takeuchi *et al.*, 2001). Studi condotti su modelli animali e volontari umani, hanno dimostrato come la somministrazione di probiotici sia in grado di determinare un incremento nel numero e nell'attività di linfociti T e cellule NK (Gill *et al.*, 2001; Aatourri *et al.*, 2002). Per alcuni ceppi probiotici sono stati riportati anche effetti anti-infiammatori, quali ridotta produzione di TNF- $\alpha$ , downregolazione della risposta Th1 o attivazione di una risposta Th2 (Yasui *et al.*, 1999; Borruel *et al.*, 2002).

La quasi totalità delle informazioni relative all'attività anticancerogena dei probiotici deriva da studi *in vitro* e modelli animali. Le differenze a livello di composizione e attività metaboliche della microflora intestinale di uomo e animale, e le modalità di somministrazione dei probiotici (intravenosa, intraperitoneale o intralesionale in studi su modello animale) rendono estremamente difficile poter estrapolare i risultati al sistema umano.

## Allergie

La modulazione del microbiota intestinale mediante somministrazione di probiotici può contribuire alla prevenzione di stati allergici. Trial a doppio cieco hanno mostrato come la somministrazione alle madri prima della nascita e ai neonati nei primi mesi di vita, di *L. rhamnosus* GG abbia significativamente ridotto l'insorgenza di eczema atopico in soggetti a rischio (Kirjavainen *et al.*, 2002; Kalliomaki *et al.*, 2003). I principali fattori di rischio per l'insorgenza di dermatite atopica sono di natura genetica, ma concorrono anche fattori ambientali, quali composizione del microbiota intestinale, carico microbico durante l'infanzia e processing antigenico a livello intestinale. Il trattamento con probiotici, capaci di sopprimere la produzione di citochine pro-infiammatorie e/o incrementare le citochine regolatorie IL-10 e TGF- $\beta$  e le cellule Th3, si è rivelato particolarmente efficace in bambini affetti da allergia al latte di mucca e dermatite atopica mediata da IgE (Pohjavuori *et al.*, 2004; Viljanen *et al.*, 2005). Un ulteriore trial ha mostrato come il consumo per un mese di latti fermentati arricchiti con probiotici, sia in grado di ridurre i sintomi di rinite allergica perenne (Wang *et al.*, 2004). L'assenza di effetti benefici in adolescenti affetti da allergia da polline suggerisce come i probiotici esercitino presumibilmente i loro effetti durante lo sviluppo del sistema immune nella prima infanzia (Helin *et al.*, 2002).

Stati allergici di tipo I sono associati alla degranolazione di mast cell successiva al cross-linking tra IgE presenti sulla superficie e antigeni allergici. La produzione di IgE è incrementata da IL-4, IL-5 e IL-3, prodotte da cellule T helper di tipo 2 (Platts-Mills, 2001). In particolare, l'IL-4 svolge un ruolo fondamentale sia nella produzione antigene-specifica che nella upregolazione di IgE (Shang *et al.*, 2004). L'induzione della produzione di IL-12 da parte di macrofagi e cellule dendritiche, con conseguente induzione di IFN- $\gamma$  che promuove il fenotipo Th1 e sopprime la produzione di IL-4, costituisce un potenziale meccanismo d'azione di batteri probiotici, ed offre un razionale alla loro capacità di sopprimere reazioni allergiche (Fujiwara *et al.*, 2004; Pochard *et al.*, 2005). Recentemente, mediante studi *in vitro*, Iwabuchi *et al.* (2007) hanno riportato un meccanismo d'azione differente, dimostrando per *B. longum* BB536 un effetto Th2 soppressivo ma

indipendente da citochine Th1. Il ceppo di *Bifidobacterium* ha indotto la maturazione di cellule dendritiche derivanti dal midollo osseo ed ha soppresso direttamente la loro produzione di IL-4.

In modelli murini di asma allergica, Blumer *et al.* (2007) e Feleszko *et al.* (2007) hanno valutato il potenziale impiego di probiotici dopo sensibilizzazione orale all'allergene e sviluppo di infiammazione e ipereattività. Ceppi batterici, quali LGG e *B. lactis*, sono stati capaci di determinare una ridotta concentrazione di eosinofili ed un calo in citochine correlate a stati allergici come IL-5 e IL-10.

## **Irritable bowel syndrome**

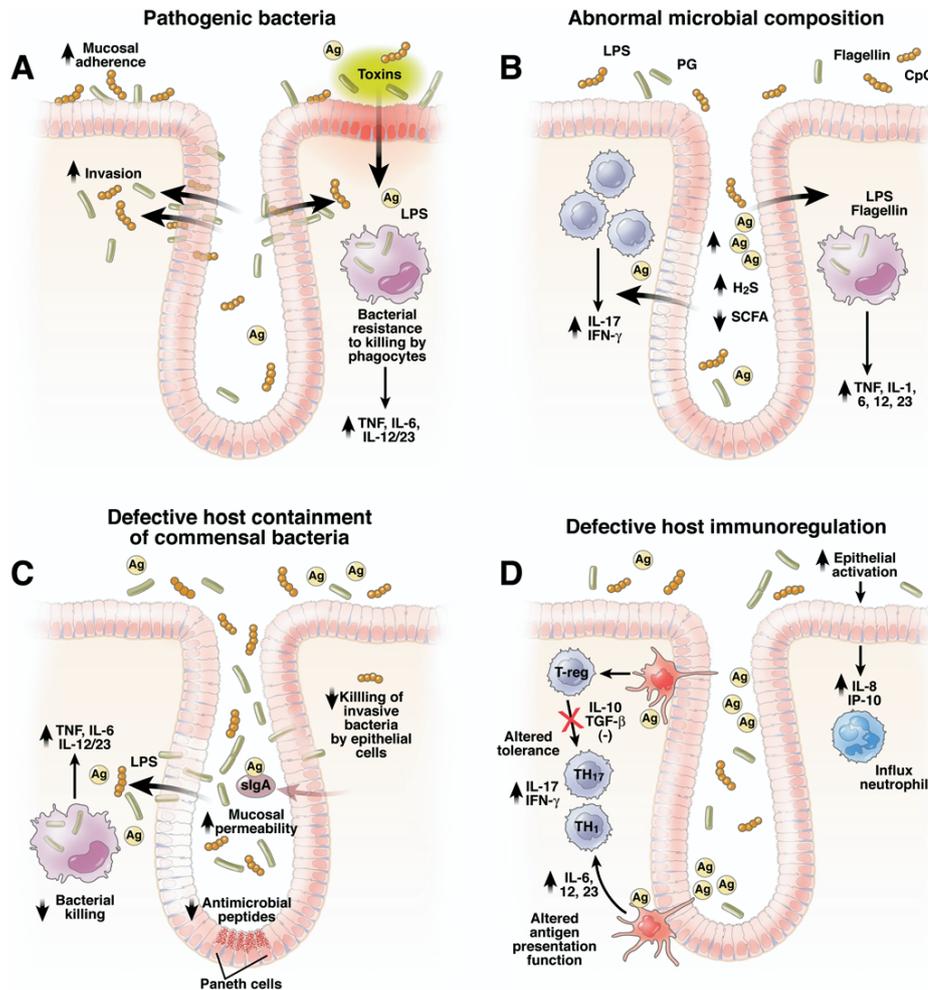
Diversi sintomi gastrointestinali, quali dolore addominale, aumentata frequenza di evacuazioni e/o costipazione, caratterizzano l'irritable bowel syndrome. Sono state riportate anche variazioni nella composizione del microbiota intestinale, che includono un ridotto numero di lattobacilli, di *E. coli* e bifidobatteri, ed un contemporaneo incremento di anaerobi fecali. Un significativo miglioramento dei sintomi è stato ottenuto dopo trattamento probiotico, ma l'eterogeneità degli studi condotti e l'osservazione di una risposta placebo del 30-50% rendono estremamente difficile poter trarre conclusioni definitive sull'effetto dei probiotici in IBS (Saggioro, 2004; O'Mahony *et al.*, 2005; Limdi *et al.*, 2006).

## **Inflammatory bowel disease**

Le malattie infiammatorie intestinali si suddividono in 2 fenotipi principali, morbo di Crohn (CD) e colite ulcerosa (UC). Entrambi rappresentano disordini cronici aggressivi con un'incidenza pari allo 0.1-0.5%. Un pattern discontinuo, che può coinvolgere l'intero tratto gastrointestinale, e la presenza di ulcerazioni estese ed occasionalmente granulomi, caratterizzano il morbo di Crohn. Al contrario, UC è contraddistinta da infiammazione con ulcerazioni superficiali limitate alla mucosa del colon e non segmentali; generalmente, il processo infiammatorio ha inizio a livello di retto per poi espandersi nell'intestino crasso. L'associazione con anticorpi anti-neutrofili (pANCA, perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies) (Saxon *et al.*, 1990), e con l'antigene HLA-DR 0103 (Satsangi *et al.*, 1996), suggeriscono una presunta natura autoimmune per UC. L'analisi batteriologica di biopsie prelevate da pazienti affetti da UC ha rivelato un numero di batteri circa doppio rispetto a quelli associati a CD (Bibiloni, 2006). Tale differenza potrebbe riflettere la natura alterata del muco in UC, più sottile e meno solfata, il che potrebbe ridurre la dislocazione batterica normalmente operata del flusso di muco, e potrebbe fornire un milieu nutrizionale più facilmente accessibile data la maggiore degradabilità di mucine non solfatate (Pullan *et al.*, 1994; Robertson e Corfield, 1999). Inoltre, UC è caratterizzata da una risposta immune Th2 con produzione di IL-4, IL-5 e/o IL-13, mentre CD da una risposta effettrice Th1 associata alla secrezione di IL-12 e IFN- $\gamma$  (Strober *et al.*, 2002).

Fattori genetici, responsività del sistema immune, e fattori ambientali giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi e progressione di questi disordini infiammatori (Fig. 17) (Xavier e Podolsky, 2007). In IBD si assiste, infatti, ad una risposta immune mucosale eccessiva e sregolata nei confronti di componenti potenzialmente antigenici della microflora intestinale (Fig. 18A e B) (Bouma e Strober, 2003). Il coinvolgimento della microflora residente [teoria della disbiosi (Tamboli *et al.*, 2004)] è dimostrato da: (i) assenza di infiammazione in topi germ-free (Strober *et*

*al.*, 2002); (ii) miglioramento delle condizioni dopo trattamento antibiotico o diversione dello stream enterico (Sartor, 2000); (iii) predominanza delle lesioni in aree ad alta esposizione batterica, quali ileo terminale, colon e pouch ileali (Perencevich e Burakoff, 2006); (iv) variazioni nella composizione della microflora [riduzione significativa nella diversità del microbiota, con la perdita di anaerobi appartenenti ai generi *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, e *Bifidobacterium*, ed il concomitante incremento di *E. coli* aderente/invasivo, enterococchi,  $\gamma$ -*proteobacteria* e batteriofagi (Ott *et al.*, 2004; Bibiloni, 2006; Frank *et al.*, 2007; Takaishi *et al.*, 2007; Lepage *et al.*, 2008; Swidsinski *et al.*, 2008)], con deficienza nell'apporto energetico di SCFA (Roediger, 1980) e sovrapproduzione di idrogeno solfuro, metabolita estremamente tossico per la mucosa intestinale (Pitcher *et al.*, 2000); (v) assenza di un agente eziologico, nonostante alcune ipotesi avanzate sul possibile coinvolgimento di *M. paratuberculosis* (Greenstein, 2003) [nel 1913, Dalziel descrisse una forma di enterite cronica interstiziale che fu poi denominata da Crohn e colleghi morbo di Crohn (Crohn *et al.*, 1932), e notò le somiglianze con la malattia bovina di Johne, causata da *M. avium* subsp. *paratuberculosis*], clamidie (Elliott *et al.*, 1981), *L. monocytogenes* (Blaser *et al.*, 1984), *E. coli* (Ohkusa *et al.*, 2004), e citomegalovirus (Criscuoli *et al.*, 2006); (vi) mutazioni nel gene CARD15 (caspase activating recruitment domain) sul cromosoma 16, responsabili di un'anormale funzione NOD2 (tali mutazioni, associate a CD, potrebbero determinare un'aberrante attivazione di NF- $\kappa$ B, un'inefficace risposta immune a componenti batterici ed un'inefficace clearance di batteri intracellulari presenti nell'epitelio intestinale umano) (Hugot *et al.*, 2001; Bonen *et al.*, 2003; Hisamatsu *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2006; Baumgart e Carding, 2007), e in altri geni di suscettibilità a IBD, quali DLG5 (Stoll *et al.*, 2004) e OCTN3 (Lamhonwah *et al.*, 2003); (vii) perdita di tolleranza immunologica nei confronti del microbiota intestinale come evidenziato da incrementate risposte umorali e di cellule T (Duchmann *et al.*, 1995), e dalla presenza di anticorpi mucosali diretti contro antigeni della flora enterica, quali proteine flagellari di enterobatteri, clostridi e *Bacteroides* (Macpherson *et al.*, 1996; Subramanian *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2008).



**Fig. 17.** Teorie sulla patogenesi di IBD.

**(A) Pathogenic bacteria.**

La presenza di patogeni tradizionali o alterazioni funzionali nei batteri commensali (incrementata adesione epiteliale, invasione, resistenza) possono determinare una maggiore stimolazione batterica di risposte immuni innate e adattative.

**(B) Abnormal microbial composition.**

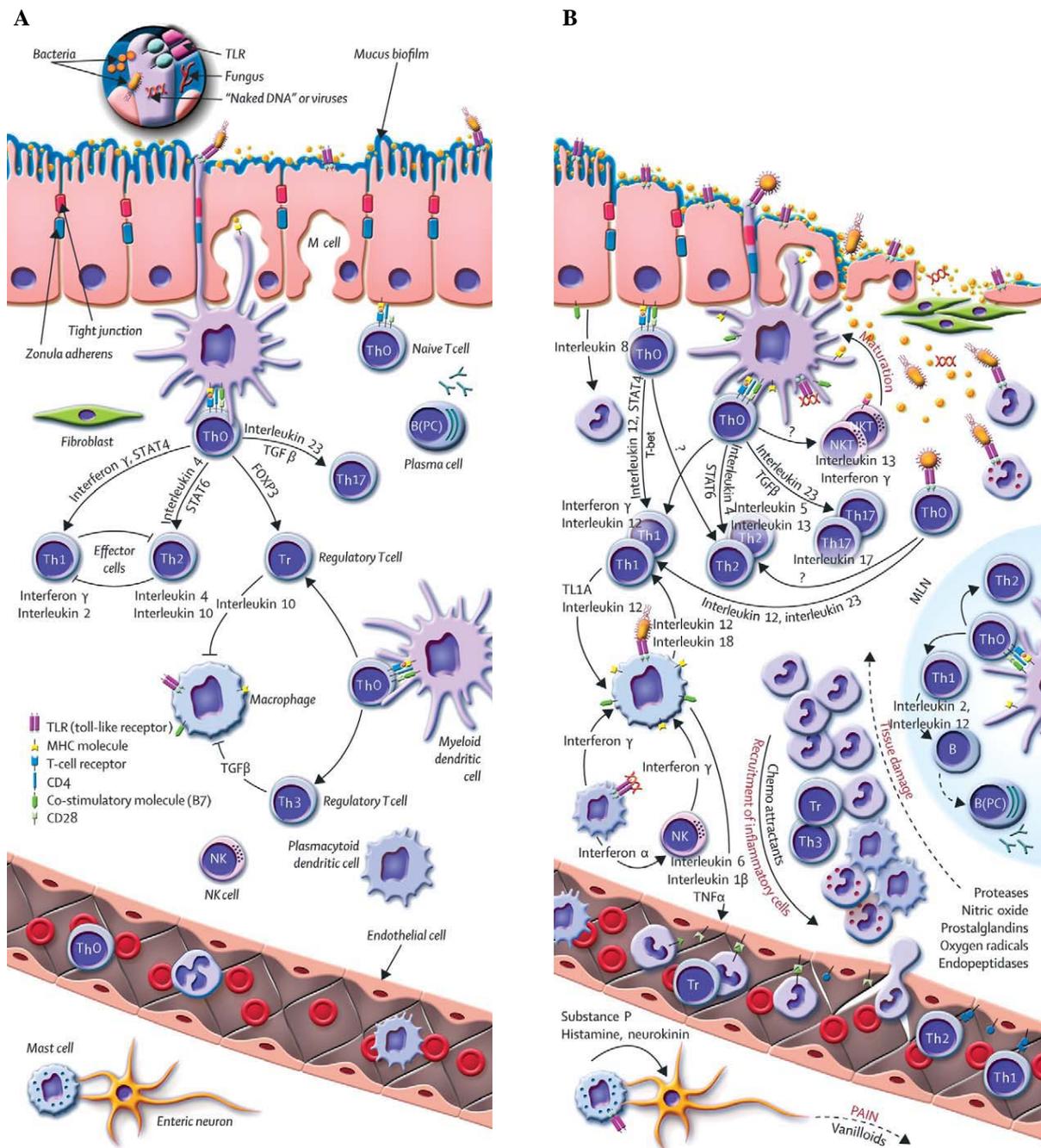
Ridotte concentrazioni di batteri “protettivi”, butirrato-produttori, possono determinare un incremento nella permeabilità mucosale. Maggiori concentrazioni di batteri “aggressivi” comportano aumentate quantità di antigeni e metaboliti tossici, quali H<sub>2</sub>S, con incremento nella permeabilità mucosale ed inibizione della produzione di butirrato.

**(C) Defective host containment of commensal bacteria.**

Difetti nella secrezione di peptidi antimicrobici o IgA secretorie possono determinare overgrowth batterica a livello mucosale; difetti nei meccanismi di killing di batteri fagocitati possono comportare la loro persistenza a livello intracellulare ed un’inefficace clearance antigenica.

**(D) Defective host immunoregulation.**

La down-regolazione di risposte immuni innate, a livello di cellule epiteliali o APC, può determinare induzione di risposte infiammatorie mediante secrezione di chemochine o citochine pro-infiammatorie. La disfunzione di cellule T regolatorie o APC può comportare perdita di tolleranza nei confronti di antigeni microbici ubiquitari o induzione di risposte autoimmuni cross-reactive.



**Fig. 18.** Sistema immunitario intestinale.

**(A)** Stato sano.

M cell = microfold cell (cellule specializzate dell'epitelio); Th = cellule T helper; Th0 = cellule T naive; Th, Th1, Th2, Th17 = cellule T effettrici; Tr, Th3 = cellule T regolatorie; B = cellule B; B(PC) = plasma cell; NKT = cellule T natural killer.

**(B)** IBD.

MLN = linfonodi mesenterici.

La funzione della barriera epiteliale potrebbe rappresentare un fattore aggiuntivo nello sviluppo dell'inflammatione. La riduzione nello spessore del muco ed un'aumentata permeabilità mucosale, che può derivare da un difetto genetico, dal contatto diretto con batteri patogeni o come conseguenza del processo infiammatorio, potrebbero determinare la perdita di tolleranza nei confronti di batteri enterici non patogeni, consentendo quindi ad organismi commensali di avere facile accesso al milieu interno, e perpetuare lo stato di inflammatione mediante una serie di

pathway di signaling pro-infiammatori (Boirivant e Strober, 2007; Swidsinski *et al.*, 2008). Shkoda *et al.* (2007) hanno analizzato i profili di espressione proteica nell'epitelio intestinale di pazienti affetti da IBD, ed hanno evidenziato significative variazioni a carico di proteine coinvolte nei processi di trasduzione del segnale, risposta allo stress e metabolismo energetico. In particolare, l'induzione dell'espressione di Rho GDI  $\alpha$  potrebbe essere associata alla distruzione dell'omeostasi ed integrità dell'epitelio intestinale, con incremento nella permeabilità epiteliale. Studi proteomici sulla patogenesi di UC hanno suggerito il coinvolgimento di un'alterata regolazione dell'immunità mucosale e di disfunzioni mitocondriali dei colonociti (swelling, perdita di integrità delle membrane, creste ridotte e distorte, perdita di corpi densi) con conseguenti difetti nella generazione di energia ed incrementati livelli di ROS (Hsieh *et al.*, 2006).

La terapia farmacologia convenzionale per l'IBD è mirata alla soppressione della risposta immune o alla modulazione della risposta infiammatoria (mesalazina e corticosteroidi). In relazione allo spettro d'attività, gli antibiotici possono selettivamente ridurre l'invasione tissutale, eliminare specie batteriche aggressive e determinare concentrazioni batteriche ridotte a livello luminale e mucosale. E' ampiamente riconosciuto il ruolo essenziale degli antibiotici nel trattamento di complicazioni settiche in IBD, quali fistole e ascessi perianali, peritonite localizzata dovuta a overgrowth batterica, infezioni postoperatorie, e megacolon tossico; tuttavia, la loro somministrazione cronica è associata ad effetti collaterali negativi e comporta il rischio di insorgenza di antibiotico resistenza. Inoltre, sulla base di trial clinici controllati, l'impiego di antibiotici come trattamento primario di IBD rimane ancora controverso (Sartor, 2004b; Baumgart e Sandborn, 2007).

Una promettente alternativa è offerta dai probiotici, capaci di alterare la microflora intestinale, modulare la risposta immune e limitare alcuni effetti collaterali associati alla chemioterapia convenzionale (Saavedra, 1999; Sullivan e Nord, 2005). Tuttavia, il trattamento dell'IBD con probiotici si è rivelato, fino ad ora, solo marginalmente efficace come primario agente terapeutico ma è, comunque, in grado di risolvere i disordini meno severi e prevenire recidive. In tab. 13 sono riportati gli studi condotti in pazienti umani, con i principali outcome associati alla somministrazione dei probiotici. Recentemente, Fujimori *et al.* (2007) hanno riportato come la coterapia di alte dosi di probiotico e prebiotico (simbiotico) possa essere impiegata con efficacia e sicurezza nel trattamento del morbo di Crohn e sia in grado di indurre la remissione di forme attive. Il potenziale di una terapia simbiotica era già stato valutato nel trattamento di UC attiva. Furrie *et al.* (2005) hanno, infatti, dimostrato come la somministrazione per un mese di *B. longum* e Synergy 1 (inulin-oligofructose) in pazienti affetti da UC sia associata ad una significativa riduzione dei marker di infiammazione mucosale e ad una riduzione della colite a livello sia macro- che microscopico. In particolare, durante la terapia simbiotica, sono stati osservati livelli ridotti di mRNA per defensine 2, 3 e 4, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ . A differenza della defensina umana 1, molecola costitutivamente espressa, le defensine 2, 3 e 4 risultano up-regolate in presenza di batteri e citochine pro-infiammatorie, e significativamente sovraesprese in UC ma non in CD (Wehkamp *et al.*, 2003).

**Tab. 13.** Terapia probiotica in IBD.

Probiotic microorganism	Type of study	Trial outcome	Reference
<i>Lactobacillus</i> GG	Human trial. Open study. <i>N</i> = 14	Increase in gut IgA response	Malin <i>et al.</i> (1996)
	Human trial. Open study. <i>N</i> = 4	Improved intestinal permeability and CDAI	Gupta <i>et al.</i> (2000)
	Human trial. Open-labeled study. <i>N</i> = 10 per group	Probiotic and prebiotic fructooligosaccharide induced remission in pouchitis trial when administered as adjuvant to antibiotic	Friedman <i>et al.</i> (2000)
	Randomized double-blind placebo-controlled human trial. <i>N</i> = 45	No benefit in postoperative prevention of recurrence of CD	Prantera <i>et al.</i> (2002)
<i>E. coli</i> strain Nissle 1917	Randomized, double-blind human trial. <i>N</i> = 120	Patients with active UC demonstrated similar relapse rates compared with patients on mesalazine	Kruis <i>et al.</i> (1997)
	Randomized, double-blind human trial. <i>N</i> = 116	Confirmed result from Kruis <i>et al.</i> (1997)	Rembacken <i>et al.</i> (1999)
	Randomized, double-blind human trial. <i>N</i> = 327	Remission maintained in patients receiving probiotic	Kruis <i>et al.</i> (2001)
	Randomized, double-blind human trial. <i>N</i> = 28	Remission maintained in patients receiving probiotic with steroids compared with steroids and placebo	Malchow (1997)
<i>Bifidobacteria</i> -fermented milk	Randomized, double-blind human trial. <i>N</i> = 21	Remission maintained in patients receiving <i>bifidobacteria</i> -fermented milk compared with placebo	Ishikawa <i>et al.</i> (2003)
VSL#3	Randomized double-blind placebo-controlled human trial. <i>N</i> = 40	Maintenance of remission in chronic pouchitis. 15% relapse compared with 100% in control group	Gionchetti <i>et al.</i> (2000)
	Open trial. <i>N</i> = 20	Maintenance of remission in UC patients	Venturi <i>et al.</i> (1999)
	Randomized double-blind placebo-controlled human trial. <i>N</i> = 40	Patients with UC had 20% remission when given rifaximin and VSL#3 compared with 40% in mesalamine treated group	Campieri <i>et al.</i> (2000)
	Human trial. Open-labeled study. <i>N</i> = 34	Patients with mild to moderate UC had 77% remission/response rate	Bibiloni <i>et al.</i> (2005)
<i>S. boulardii</i>	Human trial. Double-blind study. <i>N</i> = 20	Reduced frequency of bowel movements in UC patients	Pein and Holz (1993)
		Relapse observed in 6.25% UC patients receiving probiotic plus mesalamine compared with 37.5% on mesalamine alone	Guslandi (2000)

CDAI, Crohn's Disease Activity Index.

L'IBD è caratterizzata da un incremento nella produzione di citochine infiammatorie, da fenomeni di apoptosi delle cellule epiteliali e di infiltrazione di cellule immuni con la conseguente perdita dell'integrità dell'epitelio intestinale (Sartor, 2002). Relativamente alla funzione della barriera intestinale, l'interazione dei probiotici con i TLR è in grado di indurre la produzione di citochine protettive, quali IL-6 e KC-1, che mediano la rigenerazione dell'epitelio intestinale ed inibiscono fenomeni di apoptosi (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). In studi *in vitro*, il probiotico *E. coli* Nissle 1917 è stato capace di contrastare gli effetti distruttivi di *E. coli* EPEC mediante alterazione del pathway di signaling della proteina chinasi c, redistribuzione ed incremento nei livelli di espressione della zonula-occludens-2 (Zyrek *et al.*, 2007).

E' stato riportato come i probiotici possano anche influenzare la produzione di criptidine, sostanze antibatteriche a basso peso molecolare prodotte dalle Paneth cell. Recentemente, è stata infatti dimostrata l'induzione, ad opera di *E. coli* Nissle 1917, della  $\beta$ -defensina-2 mediante pathway NF-kB e AP-1 dipendente (Schlee *et al.*, 2007). La capacità di controllare la proliferazione della flora a livello delle cripte intestinali potrebbe consentire ai probiotici di influenzare l'insorgenza di IBD in determinate aree dell'epitelio intestinale.

Gli effetti dei probiotici sulla produzione di citochine da parte delle cellule epiteliali sono già noti e documentati. Diversi ceppi probiotici appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sono stati in grado di attenuare la colite in modelli murini e ridurre la produzione di citochine pro-infiammatorie (McCarthy *et al.*, 2003). Lan *et al.* (2005) hanno riportato, invece, l'induzione di un set unico di citochine infiammatorie ad opera di *L. rhamnosus* GG, ceppo probiotico che si è mostrato anche in grado di downregolare la produzione di protein kinasi C e IL-6, indotte da *E. coli* e *B. ovatus*. La vitalità di questo microrganismo probiotico non rappresenta un fattore necessario per ottenere l'inibizione della produzione di IL-8 indotta da TNF- $\alpha$  in Caco-2 cell (Zhang *et al.*, 2005). Risultati simili sono stati ottenuti mediante esposizione delle cellule epiteliali a *S. boulardii*, anche se in questo caso è un fattore solubile termostabile il diretto responsabile degli effetti sulla produzione di citochine infiammatorie (Sougioultzis *et al.*, 2006). Nonostante la capacità di indurre upregolazione di molecole coinvolte in processi pro-infiammatori, studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato come questi effetti siano transienti e non portino allo sviluppo di caratteri istologici tipici dell'infiammazione (Ruiz *et al.*, 2005; Ukena *et al.*, 2005). Il significato biologico dell'attivazione controllata e transiente di mediatori pro-infiammatori resta ancora da chiarire.

I probiotici sono, inoltre, in grado di influenzare lo sviluppo di cellule T regolatorie. La loro somministrazione determina un'incrementata elaborazione di citochine regolatorie, quali IL-10 e TGF- $\beta$  (von der Weid *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 2004), a loro volta responsabili degli effetti protettivi dei probiotici. Tali effetti vengono esercitati mediante induzione di cellule T e/o interazione con le cellule dendritiche mucosali. Membri di *Bifidobacterium* si sono dimostrati, generalmente, i più potenti nell'upregolare la produzione di IL-10 da cellule dendritiche sia CD11+ che CD11-, mentre i componenti del VSL#3 sono efficaci nel ridurre la produzione di IL-12 (Hart *et al.*, 2004). Alla variabilità osservata nelle capacità di singoli ceppi probiotici di indurre la produzione di determinate citochine, si aggiunge l'eterogeneità funzionale delle cellule dendritiche. Il sito di isolamento di tali cellule sembra, infatti, influenzare la tipologia di citochine prodotte in risposta al trattamento probiotico (O'Mahony *et al.*, 2006).

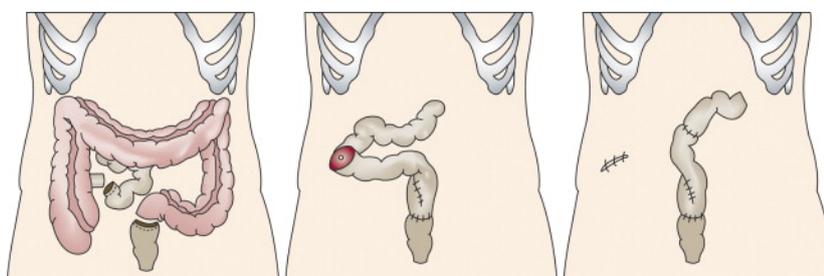
Nonostante la somministrazione probiotica offra considerevoli promesse nel trattamento di disordini intestinali, restano comunque necessarie ulteriori analisi mirate all'ottimizzazione di dose, combinazione di specie probiotiche, frequenza e durata della somministrazione, co-terapia con prebiotici, e pretrattamento antibiotico, per l'ottenimento di preparazioni individuali che siano associate a determinate indicazioni cliniche e al corredo genetico dell'ospite (Sartor, 2004a, 2004b).

La bassa percentuale di insorgenza di IBD in paesi con scarsa sanitizzazione, bassi livelli di igiene e con frequenti infezioni da vermi parassitari, ha portato ad ipotizzare come questi microrganismi possano agire nella prevenzione di tali disordini. In modelli animali di IBD, gli helminth si sono, infatti, rivelati capaci di ridurre l'infiammazione intestinale e modificare i profili citochinici delle cellule mononucleari della lamina propria [ridotta produzione di IL-12 e IFN- $\gamma$  ed incremento di IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- $\beta$  (Reddy e Fried, 2007)]. Due recenti trial condotti da

Summers *et al.* (2005a, 2005b) hanno dimostrato l'efficacia dell'impiego di helminth nel trattamento di pazienti affetti da UC e CD.

## Paucite

Dal 1978, la totale proctocolectomia e la creazione di una Ileal J-Pouch-Anal Anastomosi (IPAA) costituiscono il trattamento chirurgico di scelta per pazienti affetti da colite ulcerosa refrattaria o UC con displasia. In caso di complicazioni quali displasia, perforazione, sanguinamento rettale refrattario e megacolon tossico non responsivo al trattamento medico, si procede all'asportazione parziale o totale di colon e retto, dove è principalmente confinata la colite ulcerosa, e si crea una pouch, vale a dire un serbatoio a livello dell'ileo terminale che consenta stasi fecale e continenza (Fig. 19) (McGuire *et al.*, 2007). La stessa procedura viene effettuata anche in pazienti con familial adenomatous polyposis coli, ma con un'incidenza inferiore al 6% (Parks, 1980).



**Fig. 19.** Proctocolectomia con ileo-pouch anal anastomosis.

Benchè questa procedura generalmente curi UC e determini un significativo miglioramento della qualità di vita, dopo IPAA possono insorgere complicazioni, quali alta frequenza di evacuazioni, incontinenza, ridotta fertilità e necessità di rioperare (Baumgart e Sandborn, 2007). La più comune complicazione a lungo termine è nota come paucite, infiammazione idiopatica iatrogena della pouch che si sviluppa nel 15-46% dei pazienti sottoposti a totale proctocolectomia e IPAA entro 5 anni dall'intervento.

Fattori di rischio associati all'insorgenza di paucite includono estensiva o severa colite ulcerosa, giovane età al momento della diagnosi di UC, sesso, ileite backwash, un precedente episodio di paucite, presenza di manifestazioni extraintestinali di IBD, specialmente primary sclerosing cholangitis, consumo di farmaci anti-infiammatori non steroidei, evidenze di colite associata al morbo di Crohn, displasia, elevata conta piastrinica (maggiore di  $450 \times 10^9/l$ ), positività a pANCA (perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody) (livelli  $< 100$  ELISA units/ml), polimorfismi nel gene dell'antagonista del recettore dell'IL-1 e nel gene codificante per TNF, ma tali fattori non sono stati dimostrati coerentemente tra i diversi studi (Pardi e Sandborn, 2006; Maser e Present, 2008). Colite fulminante e fumo potrebbero, invece, proteggere dallo sviluppo di paucite (Merrett *et al.*, 1996; Achkar *et al.*, 2005).

Pazienti affetti da paucite possono essere classificati sulla base di: (i) disease activity [remissione, forma leggera-moderata (aumentata frequenza di evacuazioni, urgenza, incontinenza infrequente) o severa (disidratazione, incontinenza frequente)]; (ii) durata dei sintomi [acuta ( $< 4$  settimane) o cronica ( $\geq 4$  settimane)]; (iii) pattern della malattia [infrequente (1-2 episodi acuti),

relapsing ( $\geq 3$  episodi acuti) o continua/cronica (forma responsiva al trattamento che richiede una terapia di mantenimento, o forma resistente al trattamento)]; (iv) risposta al trattamento antibiotico (responsiva, dipendente o refrattaria (Sandborn e Pardi, 2004).

Pouchitis Disease Activity Index (PDAI) rappresenta lo strumento diagnostico maggiormente impiegato e costituisce un oggettivo e riproducibile sistema di scoring per la paucite (Sandborn *et al.*, 1994; Shen, 2003). Un PDAI score totale viene calcolato sulla base dei sintomi clinici, caratteri endoscopici ed esame istologico della pouch. I sintomi più frequentemente riportati includono aumentata frequenza di evacuazioni [fino a 4-8 movimenti intestinali giornalieri, Meagher *et al.* (1998)] e fluidità delle feci [fino a 600-700 ml di feci semiformate, Sagar e Pemberton (1997)], crampi addominali e tenesmo. Occasionalmente i pazienti possono sviluppare febbre, malessere, gonfiore, sanguinamento e manifestazioni extraintestinali, quali artrite, spondilite anchilosante, ipoderma gangrenosum, eritema nodoso, e uveite (Sandborn, 1996). I caratteri endoscopici comprendono eritema mucosale, edema, petecchie, perdita del pattern vascolare, erosioni ed ulcerazioni superficiali; l'esame istologico mostra un infiltrato infiammatorio acuto con ascessi delle cripte ed ulcerazioni, ed infiammazione cronica con atrofia dei villi e iperplasia delle cripte, il che probabilmente rappresenta una risposta adattativa della mucosa della pouch alla stasi fecale (Sheperd *et al.*, 1987). Uno score  $\geq 7$  indica paucite attiva, mentre la remissione è definita come PDAI  $< 7$ .

Nonostante siano state formulate diverse ipotesi quali overgrowth batterica dovuta alla stasi fecale, ischemia mucosale della pouch, CD e ricorrenza di UC, eziologia e patofisiologia della paucite sono ancora largamente sconosciute. Comunque, il fatto che tale condizione insorga quasi esclusivamente in pazienti affetti da UC, che si sviluppi tipicamente quando l'ileostomia viene chiusa e si ha, quindi, passaggio del contenuto luminale attraverso la pouch, unitamente alla responsività al trattamento antibatterico suggeriscono un'eziologia infettiva con una predisposizione genetica (Shen, 2003). Il potenziale coinvolgimento della microflora intestinale sembra confermato dal fatto che in paucite, si assiste ad un calo nel rapporto tra batteri anaerobi e aerobi [con incremento di *C. perfringes*, ceppi emolitici di *E. coli* e batteri solfato-riduttori (Gosselink *et al.*, 2004)], ad una ridotta concentrazione fecale di bifidobatteri e lattobacilli, e ad un incremento del pH luminale [fino a valori di 6.5 anziché il valore di 5.4 normalmente determinato a livello di pouch, (Ruseler-van Embden *et al.*, 1994)]. A supporto dell'ipotesi di disbiosi, un recente studio ha consentito l'identificazione di un unico pattern microbico aderente al biofilm che sovrasta la mucosa di pouch infiammate (Komanduri *et al.*, 2007). Alterazioni nell'espressione di ormoni peptidici gastrointestinali (messaggeri chimici responsabili di funzioni metaboliche, meccaniche, secretorie e trofiche a livello intestinale) quali, ad esempio, gastrina, grelina, sostanza P e somatostatina, sono state proposte come fattore eziologico nell'insorgenza di paucite (M'koma *et al.*, 2007). Allo sviluppo di tale condizione infiammatoria potrebbe contribuire anche uno sbilanciamento tra citochine pro- e anti-infiammatorie, con incremento di IL-1 $\beta$  e IL-8 (Nikolaus *et al.*, 1998; Bulois *et al.*, 2000; Evgenikos *et al.*, 2002). In paucite, sono stati inoltre determinati livelli d'espressione significativamente maggiori delle chemochine MCP-1, MCP-3 e IP-10 (Helwig *et al.*, 2004). Le alterazioni a livello di risposta immune dell'ospite potrebbero essere determinate da un'attivazione esagerata del sistema di immunità innata mucosale nei confronti di prodotti batterici presenti nel lumen, mediata da un'anormale regolazione dei TLR. Toiyama *et al.* (2006) hanno, infatti, suggerito come la paucite possa essere associata a variazioni nell'espressione di TLR ed in particolare come la sovraespressione di TLR4 possa contribuire alla patogenesi di questo

disordine. La contemporanea perdita di espressione di TLR3 e 5 potrebbe risultare nella disfunzione della barriera epiteliale ed incrementare il rischio di infezione della pouch.

Coffey *et al.* (2001) hanno evidenziato come in paucite si assista ad incrementati livelli di apoptosi, mediata da Fas-Fas-L (CD95-CD95L), presumibilmente coinvolti nell'atrofia dei villi e responsabili del breakdown della barriera mucosale. Alla distruzione mucosale con ulcerazioni focali e lesioni aftose, e all'iperplasia delle cripte contribuiscono inoltre l'incremento nei livelli di cellule T CD4+, la maggiore produzione di IFN- $\gamma$ , e gli aumentati livelli di espressione di metalloproteinasi della matrice (Stallmach *et al.*, 1998, 2000). Queste proteasi svolgono un ruolo fondamentale nella degradazione della matrice extracellulare, sia in condizioni patologiche che di remodelling tissutale, e rappresentano probabilmente lo step finale nella cascata di eventi responsabili del danno tissutale in paucite.

Prima di procedere al trattamento è necessario escludere altre cause, meno frequenti, di disfunzione o infiammazione della pouch, quali stenosi anatomica con conseguente ostruzione e stasi fecale, diarrea infettiva causata da patogeni intestinali o citomegalovirus, cuffite (infiammazione della mucosa rettale sopra la zona di transizione anale), fistole e ascessi perianali, malassorbimento di bile, IBS o sepsi cronica pelvica. Il trattamento di paucite è per lo più empirico a causa della scarsità di trial clinici controllati. Antibiotici ad ampio spettro, quali metronidazolo e ciprofloxacina, da soli, sequenzialmente o in combinazione, sono ampiamente utilizzati e rappresentano il mainstay del trattamento. Entrambi determinano una riduzione del PDAI score ed un significativo miglioramento di sintomi clinici, score endoscopici e istologici (Madden, 1994; Shen, 2001). La scarsa tolleranza al metronidazolo (il 55% dei pazienti sperimenta nausea, vomito, dolore addominale, emicranie, rash cutaneo, gusto metallico e neuropatia periferica) ed il rischio di sviluppo di antibiotico resistenza hanno portato tuttavia, ad una alternativa terapeutica rappresentata dalla somministrazione combinata di ciprofloxacina e rifaximina. L'ampio spettro antimicrobico, che copre organismi Gram-positivi e negativi, sia aerobi che anaerobi, ed il basso assorbimento a livello della mucosa gastrointestinale rendono rifaximina un antibiotico particolarmente idoneo al trattamento localizzato di patologie relative al tratto gastrointestinale.

La somministrazione di agenti anti-infiammatori o immunomodulatori, quali mesalamina, 5-amminosalicilati, ciclosporine, bismuto, steroidi e budesonide, si rende necessaria in caso di pazienti affetti da paucite cronica refrattaria alla terapia antibiotica. Miner *et al.* (2004) hanno riportato efficacia, sicurezza e tollerabilità di alicaforsen (240 mg a notte per 6 settimane), inibitore antisenso di ICAM-1, nel trattamento di paucite cronica. ICAM-1 rappresenta un importante mediatore di infiammazione, coinvolto nella migrazione leucocitaria; le incrementate concentrazioni sieriche riportate in paucite suggeriscono un potenziale ruolo nella patofisiologia di questa condizione infiammatoria. Gionchetti *et al.* (2007a) hanno riscontrato una frequenza di remissione pari al 75% in pazienti affetti da paucite cronica, dopo somministrazione di budesonide 9 mg al giorno per 8 settimane. Il rischio di trasformazione neoplastica a livello di pouch è basso ma non trascurabile, e l'eventuale insorgenza di polipi richiede una frequente sorveglianza. Solo in un numero limitato di casi (danni severi alla funzionalità della pouch e scarsa qualità di vita) si procede all'esclusione o excisione della pouch con permanente ileostomia.

Benché la terapia antibatterica sia in grado di indurre e mantenere la remissione della paucite, recenti studi hanno suggerito come l'alterazione della microflora della pouch mediante somministrazione di batteri probiotici, possa essere efficace nel mantenere la remissione clinica, nel prevenire recidive e come profilassi nel prevenire il primo onset della paucite (Campieri, 1999;

Gionchetti *et al.*, 2000, 2003a, 2007b; Gosselink *et al.*, 2004; Mimura *et al.*, 2004; Sartor, 2004a, 2004b; Kühbacher *et al.*, 2006). I batteri probiotici potrebbero esercitare i loro effetti mediante inibizione della crescita di batteri enterici patogeni, inibizione del binding e dell'invasione epiteliale da parte di patogeni, stimolazione della funzione della barriera mucosale ed alterazione della risposta immune dell'ospite, ma la comprensione degli specifici meccanismi alla base della loro efficacia nel trattamento della paucite resta ancora largamente incompleta.

Ulisse *et al.* (2001) hanno riportato come il trattamento probiotico sia capace di determinare un'incremento nei livelli tissutali di IL-10 ed una riduzione nell'espressione di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ ), sintasi inducibile dell'ossido nitrico e nell'attività di metalloproteinasi della matrice (MMP2 e 9). Gionchetti *et al.* (2000) hanno condotto il primo trial controllato sul mantenimento della remissione in pazienti affetti da paucite cronica, e hanno dimostrato l'efficacia della somministrazione di 6 g al giorno di VSL#3 per 9 mesi nel prevenire flare-up. Simili risultati sono stati ottenuti da Mimura *et al.* (2004), che hanno valutato l'efficacia di una singola preparazione giornaliera ad alta dose di VSL#3 nel mantenimento della remissione in caso di paucite ricorrente o refrattaria. In particolare, dopo somministrazione del VSL#3 (6 g al giorno per 12 mesi) in pazienti in remissione, si è evidenziato un aumento nel numero totale di batteri intestinali, un incremento nella ricchezza e nella diversità della microflora intestinale (specie di quella anaerobia) ed una riduzione di quella fungina, il che suggerisce come il ripristino dell'integrità di un microbiota protettivo associato alla mucosa intestinale possa rappresentare un potenziale meccanismo d'azione dei batteri probiotici e giustificare quindi la loro efficacia nel trattamento di disordini infiammatori della barriera gastrointestinale (Kühbacher *et al.*, 2006). Friedman e George (2000) hanno riportato come anche la somministrazione di *L. rhamnosus* GG in combinazione con fruttooligosaccaridi sia in grado di indurre remissione in pazienti affetti da paucite cronica.

Shen *et al.* (2005) hanno valutato l'efficacia del trattamento probiotico (6 g al giorno di VSL#3 per 8 mesi) in pazienti affetti da paucite antibiotico-dipendente. Durante il trattamento, 25 pazienti su 31 hanno dovuto interrompere la terapia per la ricorrenza di sintomi o lo sviluppo di effetti collaterali, suggerendo come l'impiego di probiotici non possa ancora essere adottato nella pratica clinica quotidiana.

Il trattamento con 1 pacchetto al giorno di VSL#3 per 12 mesi si è rivelato efficace nel prevenire l'insorgenza di paucite acuta durante il primo anno successivo a IPAA, e nel migliorare significativamente la qualità di vita dei pazienti (Gionchetti *et al.*, 2003a). Un effetto simile è stato riportato anche da Gosselink *et al.* (2004) dopo somministrazione orale di *L. rhamnosus* GG ( $1-2 \times 10^{10}$  batteri).

Recentemente, Gionchetti *et al.* (2007b) hanno dimostrato efficacia e sicurezza di una terapia ad alte dosi di VSL#3 (3600 miliardi di batteri al giorno per 4 settimane) nel trattamento di paucite attiva. La somministrazione di batteri probiotici potrebbe costituire una potenziale alternativa alla terapia antibiotica in pazienti affetti da paucite leggera. La somministrazione di *L. rhamnosus* GG ( $0.5-1 \times 10^{10}$  cfu/capsula 2 volte al giorno per 3 mesi) e di un latte fermentato con *Bifidobacterium*, non ha, invece, sortito alcun effetto statisticamente significativo e differente rispetto al placebo, nel trattamento di paucite moderatamente attiva, e si è rivelata quindi completamente inefficace come terapia primaria per la risoluzione dell'infiammazione della pouch (Kuisma *et al.*, 2003; Laake *et al.*, 2003).

Pronio *et al.* (2008) hanno valutato l'efficacia della somministrazione di probiotici (2 sacchetti di VSL#3 al giorno per 12 mesi) ed i loro effetti sulle cellule T regolatorie, in 31 pazienti senza segni né sintomi di paucite, a tempi diversi dall'intervento e costruzione di IPAA. Durante il periodo di studio, oltre ad un calo nel PDAI score, è stato osservato un significativo incremento nella percentuale di cellule mucosali CD4+CD25 e CD4+ LAP (latency-associated peptide)-positive, e nell'espressione dell'mRNA di Foxp3, mentre è stata dimostrata una significativa riduzione nei livelli di espressione di IL-1 $\beta$ .

## Disordini diverticolari

Circa il 60% degli esseri umani che vivono nelle nazioni occidentali industrializzate sviluppano diverticoli al colon. Benché studi epidemiologici abbiano attribuito un possibile ruolo eziologico alla deficienza di fibre alimentari, la causa dell'insorgenza di diverticoli rimane tuttora sconosciuta (Heczko *et al.*, 2006). Il razionale per l'impiego di probiotici è ristabilire la normale flora batterica che, in presenza di disordini diverticolari, potrebbe essere alterata con riduzione del tempo di transito nel colon e stasi del materiale fecale a livello dei diverticoli. Esistono pochi dati relativi al trattamento probiotico di diverticolite senza complicazioni. L'efficacia del trattamento probiotico è stata, fino ad ora, riportata in un unico studio, in cui la somministrazione combinata di antibiotico e probiotico (*E. coli* Nissle 1917) ha determinato una riduzione significativa del tempo richiesto per l'ottenimento della remissione clinica ed il miglioramento dei sintomi addominali (Fric e Zavoral, 2003).

In caso di disordini diverticolari, i probiotici potrebbero alleviare l'infiammazione intestinale, normalizzare la disfunzione mucosale e downregolare reazioni di ipersensibilità (Shanahan, 2001a). Il trattamento ottimale, in assenza di complicazioni, potrebbe essere quindi rappresentato da terapia antibiotica, per normalizzare la microflora intestinale, seguita dalla somministrazione combinata di probiotici per prevenire recidive, e prebiotici per mantenere la crescita di batteri "protettivi" (Petruzzello *et al.*, 2006).

## Disordini correlati all'accumulo di ossalato

L'ossalato è un composto estremamente tossico per l'uomo, presente in frutta, verdure, grano e noccioline (Hodgkinson, 1977). Il normale intake giornaliero varia da 70 a 920 mg ma aumenta significativamente nei vegetariani (Morozumi *et al.*, 1987). Nell'uomo, un accumulo di acido ossalico può comportare l'insorgenza di diverse condizioni patologiche, quali iperossaluria, urolitiasi, danno renale, cardiomiopatia e disordini nella conduttività cardiaca (Williams e Smith, 1968; James, 1972, Rodby *et al.*, 1991). Un incremento nella degradazione intraluminale di ossalato potrebbe determinare una riduzione dell'assorbimento [3-5% di ossalato assunto con la dieta viene normalmente assorbito a livello di colon (Hokama *et al.*, 2005)] e, conseguentemente, un calo nelle concentrazioni plasmatiche ed urinarie di questo composto. Tuttavia, la natura altamente ossidata dell'acido ossalico e la capacità di chelare ioni Ca<sup>2+</sup> rendono particolarmente difficile il suo catabolismo.

*Oxalobacter formigenes*, microrganismo anaerobio del tratto gastrointestinale umano, ha sviluppato una totale dipendenza dal metabolismo dell'ossalato per la produzione di energia. Recenti studi hanno evidenziato la sua capacità di scavenging e promozione della

secrezione/escrezione di acido ossalico a livello intestinale (Sidhu *et al.*, 1999, 2001; Hatch *et al.*, 2006). Ulteriori batteri degradanti l'ossalato sono stati isolati dal tratto gastrointestinale umano e comprendono *Eubacterium lentum* (Ito *et al.*, 1996), *E. faecalis* (Hokama *et al.*, 2000) e *Providencia rettgeri* (Hokama *et al.*, 2005).

In modelli murini e nell'uomo, è stata dimostrata una correlazione diretta tra somministrazione orale di batteri probiotici e riduzione dell'escrezione urinaria di ossalato. Kwak *et al.* (2006) hanno mostrato come *Lactobacillus* sia in grado di prevenire l'insorgenza di nefrolitiasi in stone-forming rat; Campieri *et al.* (2001) e Lieske *et al.* (2005) hanno riportato l'efficacia del trattamento con *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* in pazienti affetti da urolitiasi idiopatica e iperossaluria enterica. In particolare, è stato caratterizzato l'enzima oxalyl-CoA decarboxylase (*oxc*) in *B. lactis* DSM10140 (Federici *et al.*, 2004), ed è stata dimostrata la presenza in *L. acidophilus* NCFM di un operone coinvolto nel catabolismo dell'ossalato, contenente geni omologhi a *oxc* e *frc* (formyl-CoA transferase) di *O. formigenes* (Azacarate-Peril *et al.*, 2006).

Recentemente, Turrioni *et al.* (2007) hanno condotto uno screening sulla capacità degradativa dell'ossalato in 60 ceppi di *Lactobacillus* ampiamente utilizzati in prodotti farmaceutici e functional food. Il catabolismo dell'acido ossalico si è rivelato un fenotipo conservato nelle specie *L. acidophilus* e *L. gasseri*, pur mostrando efficienze diverse. L'analisi, effettuata mediante elettroforesi capillare, delle attività enzimatiche *oxc* e *frc* in *L. acidophilus* LA14 ha evidenziato, contrariamente a *O. formigenes*, basse velocità di consumo e specificità di substrato ma i risultati ottenuti suggeriscono comunque il potenziale impiego di ceppi di *Lactobacillus* nella degradazione dell'ossalato a livello dell'intestino umano.

## **Infezioni del tratto respiratorio**

La capacità dei probiotici di ridurre la colonizzazione del muco nasale da parte di batteri potenzialmente patogeni, quali *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, streptococchi  $\beta$ -emolitici ed *Haemophilus influenzae* (Gluck e Gebbers, 2003), supporta l'osservazione di una ridotta infezione respiratoria in seguito a somministrazione di lattici fermentati arricchiti con *L. rhamnosus* GG (Hatakka *et al.*, 2001).

## **Infezioni del tratto urinario**

In uno studio condotto su donne sane, l'intake giornaliero di *L. rhamnosus* e *L. fermentum* è risultato in un decremento significativo di lieviti e coliformi a livello vaginale, e nella normalizzazione della microflora in caso di vaginosi batterica (Reid *et al.*, 2003).

## **Invecchiamento**

La senescenza del sistema immunitario influenza soprattutto l'immunità cellulo-mediata, e comporta un calo nella capacità proliferativa di linfociti e nella produzione di IL-2. A queste alterazioni si aggiunge il decremento nella concentrazione di IgA e nel rapporto di linfociti maturi/immaturo, e l'aumento in citochine pro-infiammatorie e nella generazione di specie reattive dell'ossigeno (Nova *et al.*, 2007). Diversi trial hanno mostrato come ceppi probiotici, quali *B. lactis* HN019, siano in grado di ripristinare un corretto equilibrio della microflora intestinale,

incrementare la capacità fagocitica di monociti e cellule polimorfonucleate, e l'attività tumoricida di NK, fornendo quindi protezione contro patogeni enterici e urogenitali, e prevenendo l'insorgenza di disordini correlati all'età (Arunachalam *et al.*, 2000; Turchet *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2007).

## Cross-talk con l'ospite

Gli effetti del consumo di supplementi microbici vivi con potenziali effetti benefici sulla salute e fisiologia dell'ospite, sono diventati, recentemente, oggetto di numerosi studi clinici (Marteau *et al.*, 2001; Saavedra, 2001). Tuttavia, l'impatto di specie probiotiche su composizione e funzionamento del microbiota intestinale, come il microbiota residente medi gli effetti verso l'ospite, e l'impatto del genotipo dell'ospite sulla risposta al trattamento probiotico non sono ancora noti.

Al fine di investigare i dettagli molecolari dell'interazione tra probiotici, membri residenti del microbiota intestinale ed ospite, Sonnenburg *et al.* (2006) hanno colonizzato topi germ-free con *B. thetaiotaomicron* e *B. longum*. *B. thetaiotaomicron* è stato scelto in quanto prominente membro saccarolitico del microbiota intestinale [6% della microflora negli studi di enumerazione di Eckburg *et al.* (2005)], in possesso del maggior arsenale di idrolasi glicosidiche e liasi polisaccaridiche tra i simbionti intestinali sequenziati (Xu *et al.*, 2003). Al contrario, *B. longum* rappresenta un membro minore del microbiota intestinale (Ben-Amor *et al.*, 2005; Eckburg *et al.*, 2005) ma è comunemente impiegato come probiotico (Schell *et al.*, 2002). Il profilo trascrizionale genomico di entrambe le specie batteriche e dell'epitelio intestinale, combinato all'analisi mediante spettrometria di massa dell'utilizzo dei glicani, ha rivelato come la presenza di *B. longum* sia in grado di determinare un'espansione nella diversità dei polisaccaridi degradabili da *B. thetaiotaomicron* (ad esempio carboidrati contenenti mannosio e xilosio), e di indurre geni dell'ospite coinvolti nell'immunità innata. L'upregolazione del macchinario di degradazione dello xilosio in *B. thetaiotaomicron* e *B. longum* potrebbe essere determinata da una diversa disponibilità di substrati oppure dall'azione sinergica di attività enzimatiche complementari e, quindi, dalla cooperazione (sacrificio del fitness individuale per il fitness del gruppo) tra i 2 microrganismi. Il genotipo dell'ospite ha influenzato il trascrittoma espresso da *B. thetaiotaomicron* in presenza di *B. longum* ma non la sua capacità di utilizzo di polisaccaridi, che è stata osservata anche in presenza del probiotico *L. casei*. Le 3 specie probiotiche analizzate, *B. longum*, *B. animalis*, e *L. casei*, hanno indotto risposte differenti in *B. thetaiotaomicron*, sia in termini di dimensioni della risposta (ovvero numero di geni che subiscono variazioni nei livelli di espressione), che nella funzione dei geni influenzati, suggerendo come natura dell'espansione, impatto sull'ambiente nutritivo intestinale ed effetto sull'ospite siano strettamente correlati al microrganismo consumato. A livello dell'ospite, la co-colonizzazione ha indotto geni responsivi a citochine, quali IFN inducibile GTPase, e regolato l'espressione di geni codificanti per proteine antibatteriche, come RegIII $\beta$  e RegIII $\gamma$ . In particolare, la capacità di *B. longum* di reprimere l'espressione di proteine antibatteriche dell'ospite potrebbe promuovere la sua sopravvivenza a livello intestinale e, contemporaneamente, influenzare composizione, struttura e funzione della comunità microbica. Il modello murino gnotobiotico impiegato in questo studio, ha permesso di illustrare le relazioni che si instaurano tra ospite, componenti del microbiota e specie microbiche intenzionalmente consumate, ed ha suggerito come simbionti e probiotici possano adattare il loro utilizzo di glicani in risposta gli uni agli altri.

In un modello animale rappresentato da topi germ-free colonizzati con il microbiota intestinale umano di neonati, sono stati, recentemente, determinati gli effetti metabolici conseguenti alla somministrazione dei probiotici *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Mediante spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR e ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), è stato osservato come l'esposizione a tali microrganismi risulti in un alterato metabolismo epatico di lipidi, in livelli ridotti delle lipoproteine plasmatiche VLDL e LDL, e in un incremento nel processo glicolitico. Il trattamento probiotico è stato associato anche all'alterazione di diversi pathway, compreso il metabolismo di amminoacidi, metilammine e SCFA. In particolare, a livello di cieco, è stata riscontrata una significativa riduzione di acetato, un ridotto rapporto epatico acetato:propionato, ed un'incrementata attività proteolitica che probabilmente riflette il metabolismo basale dei ceppi di *Lactobacillus* (Martin *et al.*, 2007b). La ridotta escrezione fecale di acidi biliari conferma la modulazione indotta dai probiotici a livello del circolo biliare enteroepatico, responsabile dell'abbassamento del colesterolo e dei livelli ematici di lipidi (Pereira e Gibson, 2002).

L'analisi mediante microarray dell'espressione genica intestinale in topi gnotobiotici monoassociati con probiotici, ha mostrato come *L. casei* Shirota e *B. breve* Yakult siano in grado di alterare l'espressione genica in cellule epiteliali di ileo e colon. Gli effetti su numero e tipologia di geni indotti o soppressi sono risultati ceppo- e sito-dipendenti. In particolare, la monoassociazione con *L. casei* Shirota ha determinato un forte incremento, a livello di intestino tenue, nell'espressione di geni codificanti per criptidine e matrilisina, coinvolte nei sistemi di difesa contro patogeni, e per proteine di binding ad acidi grassi, responsabili del trasporto e metabolismo lipidico. Entrambi i ceppi probiotici sono stati associati ad un leggero incremento nei livelli di mRNA di hsp60. La monoassociazione con *B. breve* Yakult ha determinato, a livello di colon, la downregolazione di geni coinvolti in funzioni di trasporto, metabolismo, ma soprattutto in risposte infiammatorie, immunitarie, e in meccanismi di difesa, il che può essere correlato alla natura non pericolosa e generalmente anti-infiammatoria dei probiotici (Matsumoto *et al.*, 2005; Shima *et al.*, 2007).

Al fine di chiarire i meccanismi molecolari responsabili dell'adattamento di *B. longum* al tratto gastrointestinale, Yuan *et al.* (2008) hanno impiegato un modello di coltura di *B. longum* NCC2705 nell'intestino di coniglio, ed hanno riportato le variazioni nei profili proteomici del microrganismo associate all'incubazione *in vivo*. Mediante analisi 2D-PAGE accoppiata a MALDI-TOF-MS e/o ESI-MS/MS, sono state identificate diverse proteine i cui livelli di espressione variano in maniera significativa durante la crescita intestinale. In particolare, è stata osservata l'upregolazione dell'enzima coloilglicina idrolasi, noto anche come BSH, la cui espressione potrebbe essere stata indotta dai sali biliari incontrati da *B. longum* NCC2705 nell'intestino di coniglio, e che potrebbe, pertanto, svolgere un ruolo fondamentale nell'interazione iniziale del probiotico con l'ambiente intestinale. La presenza, nel tratto gastrointestinale, di sali biliari ed altri agenti che potrebbero compromettere la vitalità di *Bifidobacterium*, sembra essere responsabile dell'induzione di 3 proteine da stress (GroEL, trigger factor chaperone, ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2) coinvolte nel folding, assemblaggio e degradazione di proteine, ed essenziali per garantire la sopravvivenza di batteri sottoposti a condizioni di stress. L'aumentata espressione dell'elongation factor Tu (EF-Tu), proteina citoplasmatica con un ruolo centrale nella sintesi proteica ma recentemente identificata anche sulla superficie batterica (Marques *et al.*, 1998; Dallo *et al.*, 2002) ed in grado di indurre una risposta pro-infiammatoria (Granato *et al.*, 2004), suggerisce come questo fattore possa contribuire alla ritenzione o promuovere l'adesione stessa di *Bifidobacterium* nel tratto gastrointestinale. Durante la crescita nell'intestino di coniglio, sono risultati upregolati anche

glicosil idrolasi ed enzimi coinvolti nel pathway F6PPK, che presumibilmente consentono a *B. longum* NCC2705 di minimizzare il cross-feeding di competitori. Inoltre, l'analisi proteomica ha rivelato una serie di modificazioni post-traduzionali, evidenziabili in cambiamenti di carica e/o peso molecolare. Recenti studi hanno mostrato come, ad esempio, la fosforilazione sia estesa a diverse proteine inclusi enzimi biosintetici e metabolici, sia in batteri Gram-positivi che negativi. Il signaling mediato dalla fosforilazione degli amminoacidi serina, treonina, e/o tirosina, è spesso implicato nella regolazione della virulenza batterica (Rosen *et al.*, 2004; Cozzone, 2005) e, in alcuni casi, in grado di interferire con la trasduzione eucariotica del segnale, e rendere l'ospite più sensibile a infezione e adesione (Selbach *et al.*, 2003; Hatakeyama e Higashi, 2005). Pkg e LuxS sono state identificate per la prima volta da Yuan *et al.* (2008) come fosfoproteine in *Bifidobacterium*. LuxS ed il suo prodotto AI-2 mediano le interazioni tra microrganismi appartenenti a generi differenti, e questo sistema di quorum sensing controlla una varietà di processi cellulari, quali produzione di fattori di patogenicità, di tossine, formazione di biofilm, e motilità (Sun *et al.*, 2004; Merritt *et al.*, 2005; Vendeville *et al.*, 2005; Xavier e Bassler, 2005). Non è ancora chiaro se, in batteri enterici, il ruolo primario di LuxS/AI-2 sia il metabolismo, la regolazione dell'espressione genica mediante monitoraggio delle densità di popolazione, od un metodo di comunicazione interspecie (Li *et al.*, 2006). Yuan *et al.* (2008) suggeriscono come *Bifidobacterium* possa rispondere alla presenza di batteri competitori sequestrando e distruggendo le molecole AI-2 da loro prodotte, ed eliminando quindi le loro capacità di comunicazione intercellulare. Inoltre, la sovraespressione di propri autoinduttori potrebbe consentire a *B. longum* di incrementare l'espressione di geni metabolici richiesti per l'ottenimento rapido di alte densità cellulari.

La combinazione di 2-DE e MS è stata impiegata anche da Yang *et al.* (2007) al fine di analizzare cambiamenti nei pattern dei proteomi di *L. fermentum* e delle cellule dell'epitelio intestinale in 2 sistemi modello: *in vivo* nel digiuno di coniglio, ed *in vitro* con Caco-2 cell. L'esposizione all'ambiente intestinale ha determinato, in *Lactobacillus*, un incremento nei livelli di espressione di idrolasi glicosidiche, presumibilmente coinvolte nella degradazione di mucina, e, analogamente a quanto osservato per *Bifidobacterium* (Yuan *et al.*, 2008), di enzimi coinvolti nel pathway F6PPK. E' stato riscontrato, invece, un significativo calo in enzimi chiave coinvolti in processi energetici (lattato deidrogenasi, diidrolipoammide deidrogenasi e nicotinato fosforibosiltransferasi), e nel metabolismo di amminoacidi (arginil-tRNA sintetasi e aspartato-semialdeide deidrogenasi). Il calo nell'espressione degli enzimi diidrolipoammide deidrogenasi (componente del complesso piruvato deidrogenasi) e nicotinato fosforibosiltransferasi potrebbe comportare bassi livelli di ossidazione del substrato e, conseguentemente, ridotta produzione di radicali liberi dell'ossigeno potenzialmente tossici, favorendo la sopravvivenza di *L. fermentum* nell'intestino tenue. Anche la diminuita sintesi proteica e, quindi, il risparmio di grandi quantità di energia, potrebbero, a loro volta, contribuire alla sopravvivenza intestinale di *Lactobacillus*. In seguito all'interazione con *L. fermentum*, le cellule Caco-2 hanno mostrato variazioni positive a carico di proteine responsabili dell'integrità intestinale, necessaria per l'immunosorveglianza e l'esclusione di eventi di traslocazione batterica, quali voltage-dependent anion channel 1 (VDAC-1), glutatione trasferasi (GST) e hsp gp96. L'upregolazione di VDAC-1 potrebbe determinare alterazioni a livello di citoscheletro e tight junction, incrementando la resistenza transepiteliale e migliorando la funzione barriera (Resta-Lenert e Barrett, 2003). In maniera analoga, la sovraespressione di hsp gp96 e GST potrebbe favorire la protezione delle cellule dell'epitelio

intestinale da batteri patogeni e composti xenobiotici potenzialmente pericolosi, ottimizzando sopravvivenza e funzione cellulare (Wu *et al.*, 2004).

## Rifaximina

### Caratteristiche generali

Rifaximina (Fig. 20), derivato semisintetico della rifamicina SV (4-deoxy-4'-methylpyridol[1',2'-1,2]imidazo[5,4-c]rifamycin SV), appartiene alla categoria farmacoterapeutica degli antimicrobici intestinali. Con le rifamicine (gruppo di antibiotici macrociclici strutturalmente simili, prodotti fermentativi di *Nocardia mediterranei*), condivide il meccanismo d'azione che consiste nell'inibizione della RNA polimerasi batterica mediante interazione specifica con la subunità  $\beta$  dell'enzima.

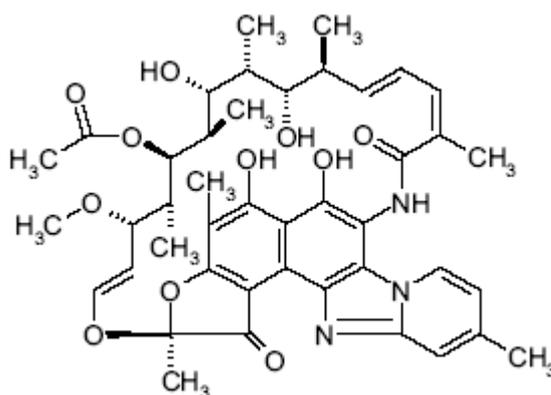


Fig. 20. Struttura chimica di rifaximina.

Rifaximina è stata il risultato di esperimenti di sintesi, condotti presso i laboratori dell'Alfa Wassermann, volti a modificare i composti originari per ottenere un minor assorbimento gastrointestinale mantenendo una buona attività antibatterica (Marchi *et al.*, 1985). Tra le diverse molecole sintetizzate e caratterizzate da migliorate proprietà farmacocinetiche (ideale assenza di assorbimento a livello del tratto gastrointestinale) e farmacodinamiche (ampio spettro di attività antibatterica), il composto marcato come L/105 e successivamente denominato rifaximina, è stato selezionato per ulteriori sviluppi. L'aggiunta dell'anello benzimidazolico è responsabile della mancanza di assorbimento del farmaco. Recentemente, è stata determinata la struttura in soluzione di rifaximina e di un suo derivato ad anello aperto, mediante combinazione di spettri NMR, metodi di simulazione teorica e calcoli di dinamiche molecolari (Martini *et al.*, 2004). La scarsa solubilità in acqua (circa 1  $\mu\text{g/ml}$ ) a differenza della bile, fa sì che rifaximina sia dispersa e altamente attiva a livello di piccolo intestino, e meno disponibile nel colon acquoso (Gerard *et al.*, 2005).

Siccome il farmaco non viene assorbito dalla mucosa gastrointestinale (assorbimento < 0.4%) né tanto meno inattivato dai succhi gastrici, la somministrazione orale fornisce alte concentrazioni intestinali, il che da un lato permette di minimizzare i problemi correlati ad un eventuale assorbimento sistemico, quali insorgenza di antibiotico resistenza ed effetti collaterali sistemici, e

dall'altro rende rifaximina un agente antibatterico particolarmente idoneo per il trattamento localizzato di patologie relative al tratto gastrointestinale.

Rifaximina è stata descritta nel 1982, introdotta sul mercato italiano 5 anni dopo per il trattamento di infezioni acute e croniche, diarrea batterica, diverticolosi, encefalopatia epatica, e profilassi pre- e post-operatoria, e solo successivamente in altre nazioni europee. L'antibiotico è venduto in 16 paesi dislocati in aree asiatiche e dell'africa settentrionale così come nel nord e sud america. Il composto Xifaxan<sup>TM</sup> (Salix Pharmaceuticals, Inc., Raleigh, NC) è stato recentemente approvato dalla US Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento della diarrea da viaggiatore causata da ceppi diarrogenici non invasivi di *E. coli*, in pazienti di età superiore a 12 anni (Maggio 2004, [http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21361\\_xifaxan\\_lbl.pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21361_xifaxan_lbl.pdf)). L'uso è sconsigliato in caso di complicazioni, quali febbre e sangue nelle feci, e nel caso in cui la diarrea sia provocata da patogeni diversi da *E. coli* (Salix Pharmaceuticals, 2004). Benché non ancora approvata per il trattamento di encefalopatia epatica, è stato riconosciuto lo status "orphan drug" di rifaximina per questo disordine.

## Attività antibatterica

Rifaximina, similmente agli altri membri della famiglia delle rifamicine, è un inibitore della sintesi batterica di RNA (in particolare inibisce l'inizio della formazione della catena); non ha invece alcun effetto sulla sintesi proteica né su quella del DNA, come dimostrato da studi condotti su *E. coli* con composti marcati radioattivamente (Vrijssen e Boeyé, 1992). In studi molto recenti, mediante cristallografia a raggi X, è stato riportato come rifaximina agisca, similmente alle rifamicine, rimuovendo ioni magnesio dalla RNA polimerasi batterica; tuttavia, il binding all'enzima di rifamicine strutturalmente non correlate è risultato estremamente diverso (Artsimovitch *et al.*, 2005).

L'attività antibatterica *in vitro*, in base alle procedure definite dal National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997), è stata determinata utilizzando la minima concentrazione inibente (MIC) contro batteri provenienti da isolati clinici o collezioni di colture. La MIC è definibile come la più bassa concentrazione di antibiotico che inibisce la crescita del microorganismo sottoposto ad analisi. Un ceppo batterico, in accordo alle linee interpretative per composti correlati quali rifampicina, viene considerato sensibile nel caso di  $MIC \leq 1$  mg/l, moderatamente sensibile per  $MIC \leq 2$  mg/l, e resistente nel caso di  $MIC \geq 4$  mg/l. Rifaximina è dotata di un ampio spettro di attività antibatterica, che copre organismi Gram-positivi e Gram-negativi, sia aerobi che anaerobi. I dati *in vitro* indicano, in generale, che la suscettibilità di organismi Gram-positivi (MIC: 0.03-5 µg/ml) è maggiore rispetto a quella di Gram-negativi (MIC: 8-50 µg/ml). Rifaximina possiede una buona attività inibitoria contro specie di *Staphylococcus* (meticillina sensibili o resistenti), *Streptococcus*, *Enterococcus*, così come contro *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *B. cereus*, *Moraxella catarrhalis*, *H. influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Bacteroides bivius-disiens*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *C. difficile*, *H. pylori* e *Vibrio cholerae* (Tab. 14) (Hoover *et al.*, 1993; Gillis e Brogden, 1995). *Y. enterocolitica* e *C. jejuni* mostrano alti valori di MIC<sub>90</sub>, rispettivamente di 128 e 521 µg/ml; il valore di MIC<sub>50</sub> per *C. difficile* è tra i più bassi riportati per rifaximina nei confronti di patogeni enterici (Tab. 14) (Sierra *et al.*, 2001). L'assenza di un assorbimento

sistemico, le basse concentrazioni plasmatiche del farmaco, e le concentrazioni ignote a livello del tratto gastrointestinale non permettono di poter interpretare correttamente i valori delle MIC e prevedere accuratamente l'attività *in vivo*, ma le alte concentrazioni raggiunte a livello fecale superano di gran lunga i valori di MIC osservati *in vitro* nei confronti di un ampio range di organismi patogeni. Dopo somministrazione orale di rifaximina, le concentrazioni fecali del farmaco variano, infatti, tra 4 e 8 mg/g di feci, il che corrisponde a circa 160/250 volte il valore di MIC<sub>90</sub> riportato per diversi enteropatogeni (Jiang e DuPont, 2005).

**Tab. 14.** Attività antibatterica *in vitro* di rifaximina contro alcuni enteropatogeni.

Pathogen	No. of strains	MIC <sub>50</sub> range (µg/ml)	MIC <sub>90</sub> range (µg/ml)	Reference
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	179	8	16-32	Gomi <i>et al.</i> (2001); Sierra <i>et al.</i> (2001a, 2001b)
Enteroaggregative <i>E. coli</i>	168	8	16-32	Gomi <i>et al.</i> (2001); Sierra <i>et al.</i> (2001a, 2001b)
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	21	8	16	Sierra <i>et al.</i> (2001a)
<i>Salmonella enteritidis</i>	10	2	8	Hoover <i>et al.</i> (1993)
<i>Salmonella</i> spp.	60	4	4-64	Gomi <i>et al.</i> (2001); Sierra <i>et al.</i> (2001b)
<i>Shigella flexneri</i>	106	4	8-16	Sierra <i>et al.</i> (2001a, 2001b)
<i>Shigella sonnei</i>	40	4	16	Sierra <i>et al.</i> (2001a, 2001b)
<i>Shigella dysenteriae</i>	4	4	8	Sierra <i>et al.</i> (2001a)
<i>Shigella</i> spp.	46	4	8-64	Hoover <i>et al.</i> (1993); Gomi <i>et al.</i> (2001)
<i>Campylobacter jejuni</i>	12	256	512	Sierra <i>et al.</i> (2001b)
<i>Campylobacter</i> spp.	9	Not reported	32	Gomi <i>et al.</i> (2001)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	20	8-64	> 8-128	Hoover <i>et al.</i> (1993); Sierra <i>et al.</i> (2001b)
<i>Vibrio cholerae</i>	403	2-4	2-4	Scrascia <i>et al.</i> (2003)
<i>Helicobacter pylori</i>	82	1-4	2-8	Megraud <i>et al.</i> (1994); Holton <i>et al.</i> (1995)
<i>Clostridium difficile</i>	56	0.78	Not reported	Ripa <i>et al.</i> (1987); Gillis and Brogden (1995)

Il trattamento ad alte dosi di rifaximina (600 mg 3 volte al giorno per 14 giorni) si è rivelato efficace nell'eradicare infezioni da protozoi in pazienti affetti da HIV-1, che presentavano sintomi enterici e sistemici attribuibili a *Cryptosporidium parvum* o *Blastocystis hominis* associati ad enteropatogeni (Amenta *et al.*, 1999). Presunti effetti positivi in caso di diarrea da protozoi sono stati riportati anche recentemente, in uno studio multicentrico condotto su pazienti affetti da diarrea del viaggiatore (Steffen *et al.*, 2003).

L'intestino umano rappresenta un ecosistema particolarmente complesso in equilibrio dinamico tra micropopolazione, regime alimentare ed ospite. La microflora intestinale è generalmente molto stabile ma sensibile al tipo di alimentazione, e soprattutto all'azione di sostanze quali gli antibiotici. Gli effetti di rifaximina sulla popolazione batterica intestinale sono stati oggetto di diversi trial clinici. In uno studio condotto su pazienti affetti da diarrea infettiva, la somministrazione di rifaximina ha portato ad una completa eliminazione o ad un significativo declino nella concentrazione fecale di ceppi enteropatogeni di *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *E. faecalis* e *S. aureus* (Alvisi *et al.*, 1984).

Un ulteriore trial, mirato a valutare l'impatto di alte dosi di rifaximina sui gruppi microbici più rappresentativi della flora intestinale, è stato condotto su pazienti affetti da colite ulcerosa, patologia infiammatoria che coinvolge principalmente la mucosa del retto e del colon sinistro (Brigidi *et al.*, 2002). I risultati indicano come rifaximina non alteri in modo permanente la microflora fecale dei soggetti analizzati: i valori di concentrazione di coliformi, bifidobatteri, lattobacili, enterococchi, *Bacteroides* e *C. perfringens*, subiscono variazioni nel corso della somministrazione ma si approssimano a valori simili a quelli iniziali dopo il periodo di wash-out. Il trial ha portato anche

all'isolamento di ceppi resistenti all'antibiotico. I bifidobatteri, in particolar modo, si sono distinti per il maggior numero di mutanti resistenti isolati durante i cicli di trattamento. La resistenza a rifaximina o ad altri composti della medesima famiglia non sembra essere un processo mediato da plasmidi, il che supporta la mancanza di trasmissione orizzontale tra i microrganismi intestinali e la scomparsa dei mutanti resistenti in assenza di pressione selettiva. Si assume infatti che, una volta terminato il trattamento antibiotico, i batteri resistenti siano privi di qualunque vantaggio selettivo e metabolicamente sfavoriti nella competizione con quelli sensibili.

Il meccanismo di resistenza potrebbe essere simile a quello dell'analogo strutturale rifampicina, primariamente dovuto ad una mutazione cromosomica puntiforme nel target farmacologico, RNA polimerasi DNA-dipendente (Spratt, 1994). A differenza del trasferimento mediato da plasmidi [comune per gli antibiotici aminoglicosidici neomicina e bacitracina (Smith e Baker, 2002)], la trasmissione orizzontale del fenotipo antibiotico resistenza caratterizzato da mutazione cromosomica, è molto meno frequente (Spratt, 1994).

Data la spontanea e frequente insorgenza di mutanti resistenti a rifampicina, il problema dell'antibiotico resistenza è stato affrontato sistematicamente anche nei confronti di rifaximina (Marchese *et al.*, 2000). Sono stati selezionati *in vitro* ceppi spontaneamente resistenti al farmaco mediante esposizione a concentrazioni gradualmente crescenti dell'antibiotico. La frequenza dei mutanti, espressa come rapporto tra numero di cellule resistenti e numero di cellule dell'inoculo, si è dimostrata differente sulla base della concentrazione di farmaco impiegata e del ceppo scelto per l'analisi. In caso di pre-incubazione dei microrganismi ad una concentrazione sub-inibitoria di rifaximina, è stata riscontrata una frequente tendenza a sviluppare resistenza.

Le alte concentrazioni del farmaco nel lumen del tratto gastrointestinale, decisamente maggiori rispetto ai valori sub-inibitori, unitamente alla presenza di un'atmosfera anaerobica fanno sì che, durante la terapia antibiotica, l'insorgenza di resistenza batterica a rifaximina sia un fenomeno alquanto infrequente.

## Farmacocinetica

Le prime indagini sulle proprietà farmacocinetiche di rifaximina sono state condotte in topi e cani mediante impiego di un saggio microbiologico (agar diffusion test e *S. aureus* 209 P FDA come organismo test) (Venturini, 1983a, 1983b). La farmacocinetica umana dopo somministrazione orale dell'antibiotico, è stata invece studiata in volontari sani, pazienti affetti da IBD, encefalopatia epatica, o shigellosi indotta sperimentalmente. Le proprietà farmacocinetiche di rifaximina sono risultate completamente differenti da quelle di rifampicina. La concentrazione del farmaco non è misurabile nel siero e nei tessuti, e la via di eliminazione è prettamente fecale.

In un numero limitato di studi condotti su volontari sani e pazienti sottoposti a colecistectomia, è stato verificato il basso assorbimento sistemico del farmaco (Gillis e Brogden, 1995). Nel plasma dei soggetti in esame non sono state rilevate tracce di rifaximina (inferiori al limite di detection, < 2 ng/ml) e meno dello 0.01% della dose somministrata è stata ritrovata nelle urine (Descombe *et al.*, 1994). Nei campioni di bile non si è osservata la presenza se non di piccole quantità del farmaco, a testimonianza dell'assenza di una distribuzione epatica di rifaximina. La presenza di disordini gastrointestinali non ha mostrato alcun effetto sull'assorbimento sistemico del farmaco (Gerard *et al.*, 2005).

Rifaximina viene quasi interamente escreta nelle feci come farmaco non modificato (Salix Pharmaceuticals, 2004). Le concentrazioni fecali sono state determinate in 39 pazienti affetti da diarrea del viaggiatore, dopo somministrazione di 400 mg di antibiotico 2 volte al giorno per 3 giorni: 8 mg/g di feci e 2.5 mg/g di feci 4 giorni dopo la sospensione del trattamento (Jiang *et al.*, 2000). Attualmente non sono disponibili informazioni relative ad un eventuale metabolismo gastrointestinale o ad una sua modificazione.

Assorbimento ed escrezione del farmaco non sono stati valutati in bambini (< 12 anni) e anziani (> 65 anni) ma la tollerabilità di rifaximina in queste due popolazioni sembra essere estremamente alta (Baker, 2005; Scarpinato e Pelosini, 2005). Non sono stati misurati gli effetti del sesso e di eventuali disfunzioni renali sulla farmacocinetica di rifaximina. Un assorbimento inferiore allo 0.1% è stato osservato in pazienti affetti da encefalopatia epatica, il che elimina la necessità di dover aggiustare le dosi in caso di danno epatico.

## Interazioni tra farmaci

I meccanismi che determinano variazioni nella biotrasformazione di farmaci ad opera di altri agenti antimicrobici coinvolgono, principalmente, fenomeni di inibizione o induzione di specifici enzimi del citocromo P<sub>450</sub>. Rifampicina e rifabutina, ad esempio, inducono diversi enzimi, incluso CYP3A4, incrementando quindi il metabolismo di altri farmaci (Gillum *et al.*, 1993). Studi *in vitro* hanno mostrato come rifaximina, a concentrazioni comprese tra 2 e 200 ng/ml, non sia in grado di inibire gli isoenzimi epatici del citocromo P<sub>450</sub> umano 1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, e 3A4, bensì di indurre CYP3A4 ([http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21361\\_xifaxan\\_lbl.pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21361_xifaxan_lbl.pdf)). Tuttavia, studi successivi, condotti su ratto e nell'uomo, hanno mostrato come l'antibiotico non alteri significativamente, *in vivo*, l'attività intestinale o epatica di CYP3A4 (Steffen *et al.*, 2003). Sulla base del recente studio di Ma *et al.* (2007), dove viene riportata l'induzione del gene CYP3A11 da parte di rifaximina, appare strettamente necessario riconsiderare le potenziali interazioni tra farmaci.

Poiché l'analogo strutturale rifampicina è capace di interagire con contraccettivi orali compromettendone l'efficacia, è stata valutata anche l'interazione tra rifaximina ed un contraccettivo orale contenente etinil estradiolo e norgestimate. In 28 donne sane a cui è stato somministrato l'antibiotico per un breve periodo di tempo, non sono state rilevate alterazioni nella farmacocinetica di etinil estradiolo e norgestimate, né sono stati riportati casi di gravidanza ([http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21361\\_xifaxan\\_lbl.pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21361_xifaxan_lbl.pdf)).

## Farmacodinamica

Diversi studi hanno indagato gli effetti farmacologici di rifaximina. La somministrazione dell'antibiotico non determina alcun effetto su pH e volume di acidi gastrici, così come sull'attività pepsinica. Inoltre, rifaximina non influenza l'emptying rate né la motilità intestinale (Dayan, 1997).

Il trattamento con rifaximina determina un incremento nella percentuale di sopravvivenza di topi affetti da colite e causa una significativa riduzione della traslocazione batterica verso i linfonodi mesenterici. Inoltre, le cellule mononucleari prelevate dal tratto gastrointestinale dopo somministrazione dell'antibiotico, hanno rilasciato quantità decisamente inferiori di IFN- $\gamma$ ,

suggerendo un possibile effetto anti-infiammatorio di rifaximina (Fiorucci *et al.*, 2002). Effetti simili sono stati riportati in 14 pazienti con paucite, sottoposti a terapia combinata di rifaximina e ciprofloxacina. Dopo somministrazione antibiotica, il marker neutrofilo elastasi e le chemochine IL-8, MCP-1, MCP-3 e IL-10 sono diminuite significativamente (Helwig *et al.*, 2004). Tuttavia, resta ancora da chiarire se tali risultati siano attribuibili all'effetto anti-infiammatorio di rifaximina o se siano la conseguenza della sua attività battericida.

Studi *in vitro* hanno dimostrato un effetto anti-biofilm per diverse rifamicine, inclusa rifampicina (Jones *et al.*, 2001; Peck *et al.*, 2003). Presumibilmente lo stesso effetto contribuisce all'azione positiva esercitata da rifaximina in casi di diarrea del viaggiatore causata da ceppi di *E. coli*, in cui si ha la formazione di biofilm composti da batteri e mucosa intestinale (Crump *et al.*, 2002; Sherlock *et al.*, 2004).

## Potenziale terapeutico

La pressoché totale mancanza di assorbimento sistemico dopo somministrazione orale, suggerisce il possibile ruolo di rifaximina nel trattamento di patologie, mediate da batteri sensibili all'antibiotico, localizzate nel tratto gastrointestinale, nel tratto genitale o a livello cutaneo. Le indicazioni cliniche confermate e potenziali di rifaximina sono riportate in Tab. 15.

**Tab. 15.** Indicazioni cliniche confermate e potenziali per rifaximina.

<b>Established indications</b>
Infectious diarrhea (including travelers' diarrhea)
Hepatic encephalopathy
Small intestine bacterial overgrowth
Inflammatory bowel disease
Colonic diverticular disease
<b>Potential indications</b>
IBS and chronic constipation
<i>C. difficile</i> infection
Bowel preparation before colorectal surgery
<i>H. pylori</i> infection
Selective bowel decontamination in acute pancreatitis
Prevention of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis
Prevention of NSAID-induced intestinal injury
Extragastrintestinal indications
Skin infections
Bacterial vaginosis
Periodontal disease
NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs

## Infezioni intestinali e diarrea

La diarrea infettiva è generalmente accompagnata da sintomi di nausea, vomito e crampi addominali. La diarrea del viaggiatore rappresenta una condizione altamente limitante, causata principalmente da infezioni batteriche che colpiscono per lo più chi viaggia verso paesi in via di sviluppo. Viene generalmente acquisita mediante ingestione di cibo o acqua contaminati da materiale fecale. Il rischio di contrarre questo disordine è di circa il 4% in paesi industrializzati, < 10% nel sud europa, circa del 20% in Israele, Giappone, Sud Africa e certe isole caraibiche, e varia

dal 20 al 70% nel resto del mondo in via di sviluppo (DuPont, 2006). Circa il 40% dei pazienti affetti da diarrea del viaggiatore sperimentano un disagio inferiore ai 2 giorni e caratterizzato da non più di 2 evacuazioni giornaliere. Un numero di evacuazioni superiore a 3 nell'arco di 24 h generalmente indica una forma di diarrea severa, che si protrarrà per diversi giorni. Altri sintomi includono crampi addominali (40-60%), nausea (10-70%), vomito (5-10%), e febbre (10-30%) (Ericsson, 2003). La diarrea del viaggiatore viene contrastata modificando il regime alimentare e mediante somministrazione di loperamide, difenoxilato e subsalicilato di bismuto. Questi agenti sono comunemente impiegati nel trattamento di forme leggere o moderate di diarrea, ma possono prolungare il disagio e rendere necessaria, quindi, una terapia antibiotica in caso di disordini persistenti, severi, o associati a febbre e feci sanguinanti (Guerrant *et al.*, 2001; Ericsson, 2003). Circa l'1% dei pazienti richiede il ricovero ospedaliero, il 20% è confinato a letto, e circa il 40% deve modificare il proprio itinerario.

*In vitro* rifaximina ha mostrato una buona attività inibitoria nei confronti di diversi enteropatogeni quali *E. coli*, *Shigella* spp., e *Salmonella* spp., responsabili della sindrome della diarrea del viaggiatore (Sierra *et al.*, 2001); *in vivo* ha portato a significativi miglioramenti nella frequenza e nella consistenza delle evacuazioni in soggetti affetti da diarrea infettiva (Gillis e Brodgen, 1995).

Il foglietto illustrativo del composto Xifaxan<sup>TM</sup> mostra i risultati di due trial di fondamentale importanza, condotti proprio al fine di ottenere l'approvazione all'uso di rifaximina negli USA. Entrambi sono stati studi randomizzati, a doppio cieco e controllati da placebo; uno è stato condotto in Messico, Guatemala e Kenya, l'altro, che ha previsto anche un gruppo di controllo sottoposto a trattamento con ciprofloxacina, in Messico, Guatemala, Peru e India. Nel primo trial non sono state riscontrate differenze nei tempi di ottenimento di eradicazione microbiologica (definita come assenza del patogeno in una coltura fecale dopo 72 h di terapia) tra rifaximina e placebo, ma l'antibiotico ha considerevolmente migliorato i sintomi e ridotto la durata del disordine espressa come TLUS (time to last unformed stool). Relativamente al secondo trial, non vengono fornite informazioni su TLUS, tempistiche di cura clinica ed eradicazione microbiologica; è riportato, invece, come pazienti affetti da complicazioni e per lo più infettati da *C. jejuni*, non rispondano al trattamento. L'uso di rifaximina è, infatti, controindicato nel caso in cui si sospetta che gli agenti eziologici siano *C. jejuni*, *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. Se i sintomi associati alla diarrea del viaggiatore peggiorano o persistono per più di 24-48 h, la terapia deve essere immediatamente sospesa e sostituita da trattamento antibiotico alternativo (Salix Pharmaceuticals, 2004).

Recentemente, è stato condotto uno studio multicentrico, randomizzato e a doppio cieco, in pazienti affetti da diarrea del viaggiatore, in cui rifaximina si è rivelata un agente particolarmente potente contro patogeni invasivi. L'efficacia e l'ottima tollerabilità dell'antibiotico ne suggeriscono l'introduzione nei kit da viaggio per il trattamento della diarrea infettiva (Steffen *et al.*, 2003). La dose raccomandata è di 200 mg 3 volte al giorno per 3 giorni. Inoltre, DuPont (2008) ha valutato e confermato il potenziale impiego di rifaximina anche come agente profilattico in caso di viaggi in aree ad alto rischio.

Rifaximina si è mostrata anche in grado di ridurre significativamente la durata della diarrea in pazienti affetti da infezioni da *E. coli* enteroaggregativo, un patogeno emergente responsabile di disturbi intestinali derivanti dall'alimentazione (Huang *et al.*, 2004).

## Encefalopatia epatica

Si tratta di una complessa sindrome metabolica e neuropsichiatrica che affligge pazienti affetti da danno epatico acuto o cronico. La complessa patofisiologia sembra correlata, almeno in parte, alla produzione di ammonio da proteine alimentari ad opera dei batteri del tratto gastrointestinale. I livelli crescenti di ammonio nel sangue e a livello del sistema nervoso centrale determinano alterazioni nella neurotrasmissione, neurotossicità, e le manifestazioni neuropsichiatriche tipiche dell'encefalopatia epatica (disturbi comportamentali, della personalità, dell'umore e dell'intelletto, alterata attività neuromuscolare e anomalie nell'elettroencefalogramma) (Conn, 1988). I livelli di ammonio possono essere ridotti mediante diminuzione delle proteine assunte con la dieta, impiego di terapia antimicrobica locale nel tratto gastrointestinale (neomicina), e/o somministrazione di disaccaridi non assorbibili (lattulosio) per rimuovere o intrappolare gli ioni ammonio (Butterworth, 2003; Als-Nielsen *et al.*, 2004). Allo stato attuale il trattamento farmacologico di scelta prevede la somministrazione di lattulosio o il più recente lactitol (Blei, 1998), mentre l'uso di neomicina, antibiotico aminoglicosidico scarsamente assorbito, è diventato meno frequente per la possibilità di effetti collaterali come oto- o nefro-tossicità (Mullen e Dasarathy, 1999).

I risultati di un piccolo numero di trial clinici a doppio cieco hanno indicato come rifaximina sia di pari efficacia ma spesso di miglior tollerabilità rispetto a lattulosio e neomicina (Gillis e Brodgen, 1995). Più recentemente, in un trial clinico controllato e a doppio cieco, condotto su pazienti con grado I-III di encefalopatia epatica acuta, è stata valutata l'efficacia e la sicurezza di rifaximina a confronto con lactitol. Da un punto di vista clinico l'efficacia globale delle due terapie è risultata essere simile in termini di miglioramento o totale regressione degli episodi della patologia, ma rifaximina si è distinta per il maggior effetto sui livelli d'ammonio e sulle anomalie dell'EEG, portando ad una miglior evoluzione dell'indice PSE (portosystemic encephalopathy) utilizzato per la valutazione globale dell'encefalopatia epatica (Mas *et al.*, 2003). Tali risultati, unitamente all'assenza di reazioni avverse di una certa gravità, suggeriscono di considerare rifaximina un'utile e sicura terapia alternativa a lactitol nel trattamento dell'encefalopatia epatica acuta in pazienti cirrotici.

Riggio *et al.* (2005) hanno mostrato, comunque, come rifaximina non sia in grado di prevenire l'insorgenza di encefalopatia epatica durante il primo mese successivo allo shunt portosistemico intraepatico transgiugulare.

La dose comunemente impiegata è di 400 mg 3 volte al giorno per periodi di settimane o mesi.

## Diverticolosi

L'incidenza della patologia è drammaticamente aumentata nel secolo scorso nei paesi occidentali, probabilmente in parallelo al crescente apporto di alimenti raffinati e al calo concomitante di fibre nella dieta, dove rappresenta il quinto più importante disordine gastrointestinale in termini di costi di cure sanitarie dirette e indirette, con una mortalità di 2.5 pazienti ogni 100000 all'anno (Sandler *et al.*, 2002).

La diverticolosi, affezione spesso asintomatica ma che può talvolta esser la causa di importanti emorragie o di altri disturbi legati all'infiammazione dei diverticoli (malformazioni di origine congenita o acquisita dell'apparato digerente con ristagno di feci o di altri materiali), è il risultato di complesse interazioni tra fibre alimentari, struttura della parete del colon e motilità intestinale.

Inoltre, in caso di disordini diverticolari senza complicazioni (perforazioni, fistole, ostruzione, sanguinamento), si ha infiammazione cronica a livello mucosale, variazioni nella composizione del microbiota intestinale, e ipersensibilità viscerale (Petruzzello *et al.*, 2006).

Nonostante il tasso di remissione spontanea sia alto in pazienti affetti da sintomi leggeri o moderati, l'impiego di antibiotici non assorbibili costituisce il trattamento d'elezione. Anche la somministrazione probiotica potrebbe essere benefica, consentendo il ripristino di una normale microflora intestinale. Giaccari *et al.* (1993) hanno riportato i risultati di un trial sulla prevenzione di complicazioni dopo diverticolite acuta. Tutti i pazienti con stenosi postdiverticolare del colon sono stati trattati sequenzialmente con rifaximina e lattobacilli per un periodo di 12 mesi. Il trattamento si è dimostrato efficace nel prevenire la ricorrenza di sintomi, quali dolore addominale, gonfiore, tenesmo e diarrea, e ridurre l'insorgenza di complicazioni quali fenomeni emorragici.

Un trial aperto multicentrico, in cui pazienti con disturbi diverticolari ma senza complicazioni sono stati sottoposti a trattamento con rifaximina o a sola supplementazione di fibre, ha mostrato come la somministrazione ciclica dell'antibiotico migliori significativamente i sintomi e riduca l'incidenza di episodi di diverticolite (Latella *et al.*, 2003).

Più recentemente, Brandimarte e Tursi (2004) hanno mostrato come la combinazione di rifaximina e mesalazina (immunomodulatore locale della mucosa intestinale) o glucomannano sia particolarmente efficace nel trattamento di disturbi diverticolari del colon.

Le diete occidentali dovrebbero, comunque, essere modificate aumentando l'intake di fibre e diminuendo il consumo di carni grasse e rosse.

## **Inflammatory bowel disease**

Le malattie infiammatorie intestinali sono caratterizzate da infiammazione cronica del tratto gastrointestinale con fasi alternate di remissione e periodi di attività acuta. Benchè l'eziologia di tali condizioni sia ancora largamente sconosciuta, l'attuale modello di patogenesi prevede un sistema immune sregolato scatenato da un fattore ambientale in un individuo geneticamente suscettibile (Xavier e Podolsky, 2007). L'approccio ideale per il trattamento a lungo termine di IBD dovrebbe comprendere una terapia sicura e ben tollerata che consenta la riduzione dell'infiammazione mucosale ed il mantenimento di un corretto equilibrio del microbiota intestinale (Baumgart e Sandborn, 2007). E' stata proposta la terapia combinata di agenti antimicrobici, per ridurre il carico antigenico, e modulatori del sistema immune, per modificare le risposte sregolate, seguita dall'eventuale supplementazione di probiotici (Rubin e Kornbluth, 2005).

Recenti studi hanno rivelato come la suscettibilità all'insorgenza di IBD sia fortemente correlata a variazioni genetiche nel recettore human pregnane X (PXR; NR1I2), e come diversi geni PXR siano sregolati o sottoespressi in pazienti affetti da UC o CD (Langmann *et al.*, 2004; Dring *et al.*, 2006). In un modello murino di IBD, l'attivazione mediata da PCN (pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile) di PXR ha consentito la prevenzione della colite indotta da DSS (Shah *et al.*, 2007), il che suggerisce il potenziale valore terapeutico di ligandi di PXR in IBD.

Ma *et al.* (2007) hanno mostrato come rifaximina sia uno specifico attivatore intestinale di PXR. Questo recettore nucleare è un componente integrale dei meccanismi di difesa dell'ospite, in quanto capace di regolare l'espressione di geni coinvolti nella detossificazione di composti endogeni e xenobiotici (Kliwer *et al.*, 2002). PXR viene attivato da un ampio spettro di xenobiotici, quali farmaci, pesticidi, e altri contaminanti ambientali (Carnahan e Redinbo, 2005). L'alto grado di

similarità tra rifaximina e rifampicina, noto ligando di PXR (Bertilsson *et al.*, 1998), gli elevati livelli di espressione di PXR nell'intestino umano (Miki *et al.*, 2005), dove rifaximina raggiunge alte concentrazioni (Jiang *et al.*, 2000), e l'induzione di CYP3A4, gene target di PXR, in seguito ad incubazione con rifaximina in un modello umano di epatociti (<http://www.salix.com/>), hanno suggerito l'ipotesi che anche rifaximina sia un potenziale ligando di PXR. Mediante studi in topi ingegnerizzati con PXR umanizzato e trattati oralmente con rifaximina, è stata dimostrata una significativa induzione dei geni target di PXR, quali CYP3A11, GSTA1, MRP2, e OATP2. È stato stimato un valore di 20  $\mu\text{M}$  come  $\text{EC}_{50}$  per l'attivazione di PXR da parte di rifaximina, un valore decisamente inferiore alle concentrazioni intestinali raggiunte dall'antibiotico [150  $\mu\text{g/g}$  di contenuto intestinale di topo, corrispondente a circa 200  $\mu\text{M}$  (Ma *et al.*, 2007); 8  $\text{mg/g}$  di feci nell'uomo, pari a circa 10000  $\mu\text{M}$  (Jiang *et al.*, 2000)].

Rifaximina è efficace nel trattamento di UC attiva, CD in forma leggera/moderata, così come nella prevenzione di ricorrenze postoperatorie di CD (Shafran e Johnson, 2005; Gionchetti *et al.*, 2006; Guslandi *et al.*, 2006).

## **Morbo di Crohn**

La mancanza di trial adeguatamente progettati e controllati da placebo ha portato ad un generale scetticismo relativamente all'efficacia di antibiotici come terapia primaria per induzione e mantenimento di remissione clinica nel morbo di Crohn (Thukral *et al.*, 2005).

Shafran e Johnson (2005) hanno valutato sicurezza ed efficacia di rifaximina (600 mg al giorno per 16 settimane) nel trattamento del morbo di Crohn in forma leggera e moderatamente severa. Al termine dello studio, il 59% dei pazienti è andato in remissione, con uno score CDAI inferiore a 150.

L'efficacia di rifaximina nella prevenzione di ricorrenze postoperatorie di CD è stata valutata in un trial clinico randomizzato condotto da Campieri *et al.* (2000). La somministrazione di 1.8 g al giorno per 3 mesi di antibiotico, seguita da trattamento probiotico (VSL#3) 6 g al giorno per 9 mesi, è risultata in una significativa riduzione nell'insorgenza di gravi ricorrenze endoscopiche dopo trattamento chirurgico.

## **Colite ulcerosa**

In un trial clinico a doppio cieco, condotto su pazienti refrattari ai trattamenti standard (terapia corticosteroidica intravenosa), rifaximina (400 mg 2 volte al giorno per 10 giorni) ha determinato un significativo miglioramento delle condizioni cliniche con riduzione della frequenza delle evacuazioni, del sanguinamento rettale e dello score sigmoidoscopico (Gionchetti *et al.*, 1999). Più recentemente si è mostrato come l'antibiotico, in alte dosi e per trattamenti prolungati in pazienti affetti da UC, non influenzi negativamente l'equilibrio microbico intestinale poiché non si sono osservate significative modificazioni dei più importanti gruppi batterici intestinali (Brigidi *et al.*, 2002).

In uno studio effettuato su topi, in cui è stato indotto un modello di colite, si è messo in evidenza come la somministrazione di rifaximina, oltre ad incrementare la percentuale di sopravvivenza, a diminuire i livelli di IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12, e l'attività mieloperossidasi del colon, provochi una significativa riduzione di eventi di traslocazione batterica verso i linfonodi mesenterici (Fiorucci *et al.*, 2002). Resta ancora da chiarire se tali effetti siano mediati

dall'alterazione della microflora o se la modulazione immunologica sia esercitata direttamente dall'antibiotico.

In uno studio pilota condotto su 10 pazienti affetti da UC, Guslandi *et al.* (2004) hanno mostrato come la somministrazione di rifaximina (400 mg 2 volte al giorno per 4 settimane) sia in grado di migliorare il Rachmilewitz Activity Index (RAI) e di determinare remissione clinica nel 70% dei pazienti, suggerendo un effetto corticosteroid-sparing.

## **Paucite**

L'esperienza clinica ha dimostrato l'efficacia della terapia antibiotica nella maggior parte dei pazienti affetti da paucite. Solitamente, il metronidazolo rappresenta il principale e più comune approccio terapeutico, e la maggior parte dei pazienti affetti da paucite acuta risponde rapidamente alla somministrazione di 1-1.5 g al giorno di antibiotico (Sandborn *et al.*, 1999). Il metronidazolo riduce le concentrazioni di *Bacteroides*, determina il ripristino di SCFA nel lumen della pouch, migliora l'atrofia dei villi e l'iperplasia delle cripte, determina una riduzione dell'infiltrazione leucocitaria, e presumibilmente agisce come immunostimolante o scavenger di radicali liberi dell'ossigeno responsabili del danno mucosale (Gionchetti *et al.*, 2003b).

Recentemente Shen *et al.* (2001) hanno comparato efficacia e sicurezza di ciprofloxacina e metronidazolo. Benché entrambi capaci di determinare un significativo miglioramento dei sintomi e del PDAI score, solo il trattamento con ciprofloxacina non è stato associato ad alcuna reazione avversa, indicando la migliore tollerabilità di questo farmaco. In uno studio condotto su topi deficienti per il gene codificante l'IL-10, si è osservato come ciprofloxacina e metronidazolo siano efficaci nel trattamento di stati infiammatori, rispettivamente a livello di cieco e colon (Hoentjen *et al.*, 2003).

Una terapia antimicrobica combinata è stata proposta per il trattamento di pazienti affetti da paucite cronica refrattaria. Gionchetti *et al.* (1999) hanno riportato l'efficacia della somministrazione combinata per 2 settimane di rifaximina (2 g al giorno) e ciprofloxacina (1 g al giorno), nell'indurre remissione a livello clinico, endoscopico e istologico in circa il 90% dei pazienti, senza insorgenza di effetti collaterali. Più recentemente, Abdelrazeq *et al.* (2005) hanno mostrato come la terapia combinata rifaximina-ciprofloxacina sia sicura, efficace e ben tollerata nel trattamento di paucite cronica refrattaria attiva, e possa, quindi, salvare una significativa percentuale di pouch a rischio. Isaacs *et al.* (2007) hanno valutato l'efficacia della somministrazione di rifaximina (400 mg 3 volte al giorno per 4 settimane) in pazienti affetti da paucite attiva. In seguito a trattamento, è stata riscontrata una maggiore frequenza di remissione, ma la differenza rispetto al gruppo trattato con placebo non è risultata statisticamente significativa.

## **Small intestine bacterial overgrowth (SIBO)**

Si tratta di una condizione caratterizzata da malassorbimento di nutrienti dovuto ad un'eccessiva quantità di batteri provenienti dal colon nel lumen dell'intestino tenue. I sintomi clinici associati a questo disordine includono diarrea cronica, gonfiore, dolore addominale, e perdita di peso. La terapia normalmente prevede la soppressione della colonizzazione batterica mediante impiego di antibiotici, supporto nutrizionale, correzione della anomalia a livello del piccolo intestino e della dismotilità.

Diversi studi hanno valutato sicurezza ed efficacia di rifaximina nel trattamento di SIBO. In particolare, in un trial controllato, randomizzato e a doppio cieco, Di Stefano *et al.* (2000) hanno confrontato gli effetti della somministrazione per 7 giorni di rifaximina (1.2 g al giorno) e clortetraciclina (1 g al giorno). L'impiego di rifaximina si è rivelato superiore nel migliorare i sintomi di diarrea, borborigmi ed apatia, consentendo l'eradicazione di SIBO nel 70% dei pazienti, e non sono stati riportati effetti collaterali. Lauritano *et al.* (2005) hanno analizzato diversi dosaggi di rifaximina e concluso come il trattamento per una settimana di rifaximina 1.2 g al giorno sia un buon regime in termini di efficacia e tollerabilità. Tutti gli studi sono stati però condotti con un limitato numero di pazienti.

## Irritable bowel syndrome

IBS rappresenta un disordine comune associato a gonfiore, per eccessiva produzione di gas idrogeno e metano, alterate abitudini intestinali e dolore addominale. Benché questa condizione affligga il 15-20% della popolazione, l'eziologia è tuttora sconosciuta. Le ipotesi avanzate includono alterata motilità intestinale, disfunzione sensoriale periferica e centrale, e anormale risposta allo stress. Criteri clinici, quali Rome criteria, sono stati sviluppati per aiutare nella diagnosi e categorizzazione della sindrome.

Recentemente, Yang *et al.* (2008) hanno valutato l'efficacia di rifaximina nel trattamento primario e ritrattamento di overgrowth batterica in IBS. Una risposta positiva a rifaximina è stata ottenuta in pazienti trattati per la prima volta e nel 75% di pazienti divenuti refrattari ad altri antibiotici.

## Profilassi chirurgica

I benefici della profilassi antibiotica in caso di interventi colon-rettali sono ormai largamente riconosciuti per via dell'alta concentrazione di batteri presente in queste regioni.

La somministrazione orale pre-operatoria così come quella nasogastrica post-operatoria di rifaximina si sono dimostrate efficaci nel prevenire complicazioni successive ad interventi al colon, quali diarrea, ascesso intra-addominale, polmonite e infezioni del tratto urinario (Gillis e Brodgen, 1995).

## Gastriti ed ulcere duodenali

*H. pylori* è stato riconosciuto quale causa principale della maggior parte di ulcere duodenali (Megraud e Lamouliatte, 1992); la sua presenza nello stomaco risulta invariabilmente associata ad infiammazione della mucosa (Bayerdorffer *et al.*, 1980). Al fine di eradicare il batterio, le terapie combinate si sono dimostrate più efficaci delle monoterapie (Lamouliatte, 1989). Queste, tuttavia, comportano un maggior numero di effetti collaterali, con il risultato di un trattamento spesso inadeguato ed incompleto. A queste difficoltà va ad aggiungersi l'eventuale resistenza di *H. pylori* ad agenti antimicrobici, come nel caso del metronidazolo (European Study Group on Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*, 1992).

L'attività di rifaximina contro *H. pylori* è stata determinata *in vitro* su ceppi isolati da pazienti affetti da gastrite sintomatica. A differenza della maggior parte degli antibiotici utilizzati in tali casi,

l'abbassamento del pH non risulta influenzare, se non in misura minima, la MIC di rifaximina, e la frequenza di mutazioni, comparabile a quella di macrolidi e chinoloni, appare decisamente minore rispetto a quanto osservato per il metronidazolo (Megraud *et al.*, 1994). L'attività battericida di rifaximina nei confronti di *H. pylori* ne suggerisce l'impiego, al posto del metronidazolo, nelle terapie di associazione volte ad ottenere una permanente eradicazione del microrganismo.

## **Pancreatite acuta**

In caso di pancreatite acuta, determinante è spesso la comparsa di infezioni batteriche che possono portare a complicazioni settiche sistemiche talora mortali (Marotta *et al.*, 1996). In soggetti affetti dalla patologia, sembra giocare un ruolo fondamentale il passaggio di batteri dal tratto gastrointestinale a tessuti extraintestinali attraverso la lamina propria della mucosa. In particolar modo, i batteri coliformi sembrano rappresentare il gruppo di patogeni più frequentemente coinvolto (Widdison *et al.*, 1994).

In uno studio condotto su ratti, in cui è stato indotto un modello di pancreatite acuta, la somministrazione di rifaximina e del purgante lactitol è risultata influenzare le lesioni necrotico-emorragiche del pancreas apportando effetti benefici (Marotta *et al.*, 1996).

## **Gas intestinale e sintomi correlati alla produzione di gas**

Distensione, gonfiore, dolore addominale, e flatulenza sono disturbi molto frequenti attribuiti ad un'eccessiva produzione di gas a livello di colon. Le maggiori fonti di gas intestinale sono rappresentate dall'attività metabolica di batteri che producono grandi quantità di H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, e CH<sub>4</sub> attraverso la fermentazione di carboidrati (Levitt e Bond, 1970). Restrizioni alimentari, finalizzate alla riduzione della disponibilità di substrati fermentabili dai microrganismi del colon, sembrano essere efficaci nel ridurre sintomi e produzione di gas, ma non possono essere mantenute per lunghi periodi tempo (Levitt *et al.*, 1976).

Simeticone, charcoal attivato e farmaci antimicrobici sono stati impiegati per il trattamento di sintomi correlati alla produzione di gas intestinale ma, fino ad ora, sono stati riportati risultati contrastanti relativamente alla loro efficacia (Caspary *et al.*, 1981; Potter *et al.*, 1985; Rao *et al.*, 1988; Friis *et al.*, 1991).

Di Stefano *et al.* (2000) hanno riportato come rifaximina (400 mg 2 volte al giorno per 7 giorni) sia in grado di ridurre in maniera significativa la produzione di H<sub>2</sub>, il numero di episodi di flatus, e la circonferenza dell'addome, mentre non ha alcun effetto sulla sensazione di gonfiore e dolore addominale.

## **Vaginosi batteriche**

In caso di infezioni superficiali del tratto genitale e malattie sessualmente trasmesse, alcune terapie antimicrobiche topiche si sono dimostrate efficaci, in ugual misura o addirittura superiori, rispetto alle terapie sistemiche standard (Meech e Loutit, 1985; Livengood *et al.*, 1990a; Hillier *et al.*, 1990).

La scarsa biodisponibilità di rifaximina ha generato un notevole interesse nel suo potenziale impiego come agente topico. Lo spettro antimicrobico di rifaximina include molti dei

microrganismi associati a vaginosi batteriche. Tra gli organismi altamente suscettibili *in vitro* sono compresi *B. bivius-disiens*, *G. vaginalis*, *H. ducreyi*, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus* spp., e la maggior parte dei ceppi di *N. gonorrhoeae* (Hoover *et al.*, 1993). Nonostante l'esatta patogenesi della vaginosi rimanga sconosciuta, batteri anaerobi quali *Mobiluncus* spp. e *Bacteroides* spp., sembrano giocare un ruolo chiave (Hillier *et al.*, 1990; Livengood *et al.*, 1990a, 1990b), il che suggerisce l'uso di rifaximina come trattamento topico in caso di infezioni del tratto genitale.

## Infezioni cutanee

Alcune infezioni della pelle sono causate da germi piogeni, ovvero microrganismi che producono pus e tossine attive nelle vicinanze del sito d'infezione. Si tratta principalmente di *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes*, trovati spesso in associazione tra loro. Per le forme più gravi di piodermatite risulta necessario un trattamento antibiotico sistemico, mentre forme più leggere possono essere trattate unicamente con terapie topiche (Tempera *et al.*, 1993).

Diversamente dalle altre rifamicine, rifaximina non viene assorbita attraverso lo strato cutaneo (Venturini *et al.*, 1987), il che rende possibile ridurre sia il rischio di fenomeni di sensibilizzazione che la probabilità di selezionare ceppi batterici resistenti (Eftimiadi *et al.*, 1986).

In uno studio condotto su pazienti affetti da infezioni quali follicolite, foruncolosi, intertrigo e piodermatite labiale, e sottoposti ad applicazioni epicutanee di una formulazione topica di rifaximina, è stato possibile ottenere una completa guarigione sia dal punto di vista clinico che microbiologico. Il prodotto non ha selezionato mutanti resistenti e non ha indotto fenomeni di intolleranza né effetti collaterali locali o sistemici (Tempera *et al.*, 1993). Tali risultati suggeriscono di includere rifaximina tra gli antibiotici di prima scelta per la terapia locale di piodermatiti.

## Tollerabilità

Studi tossicologici hanno mostrato come rifaximina non determini tossicità acuta o cronica in animali da laboratorio. Studi *in vitro* e *in vivo* non hanno, inoltre, rilevato potenziale genotossico (Dayan, 1997).

Benché in studi riproduttivi non siano state determinate anomalie del feto chiaramente correlabili al trattamento della madre con rifaximina (Scarpignato e Pelosini, 2005), la US FDA ha classificato il farmaco, al pari di molti altri agenti antimicrobici (Physicians' desk reference, 2004) nella pregnancy category C (ovvero studi riproduttivi in modelli animali mostrano un effetto negativo sul feto ma non sono disponibili studi nell'uomo adeguati e ben controllati; i potenziali benefici possono comunque giustificare l'impiego in donne gravide nonostante i presunti rischi) ([http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21361\\_xifaxan\\_lbl.pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21361_xifaxan_lbl.pdf)). In studi animali sono stati riportati casi di teratogenicità, quali palato fesso, agnazia, riduzione della mascella, emorragie, occhi di dimensioni inferiori, brachignazia, incompleta ossificazione ed incrementate vertebre toracolombari. Non esistono informazioni relative alla secrezione di rifaximina nel latte materno e alla sua disponibilità per neonati.

Studi su volontari sani, effettuati con dosi crescenti di rifaximina per os, fino alla dose massima di 400 mg/kg 4 volte al giorno, hanno confermato la completa assenza di assorbimento intestinale ed hanno evidenziato l'ottima tollerabilità del farmaco, riscontrata successivamente negli studi

clinici. L'eccellente tollerabilità rende l'antibiotico particolarmente adatto all'uso in pediatria e gerontologia. L'indice terapeutico, che ne ha suggerito il vasto campo d'applicazione, appare decisamente più elevato rispetto a quello di antibiotici amminoglicosidici. La tossicità acuta di rifaximina è, infatti, molto bassa con una DL<sub>50</sub> per os superiore ai 2000 mg/kg (Gillis e Brodgen, 1995).

Effetti collaterali associati alla somministrazione di rifaximina sono stati riportati in meno dell'1% dei pazienti, sono di natura gastrointestinale e comprendono flatulenza, meteorismo, dolore addominale, nausea e vomito (Gillis e Brodgen, 1995). Ulteriori reazioni avverse includono linfocitosi, monocitosi, neutropenia, dolore all'apparato uditivo, distensione dell'addome, costipazione, disidratazione, gola e labbra secche, disordini gengivali, ernia inguinale, dolore al petto, senso di fatica, malessere e debolezza, dissenteria, infezioni del tratto respiratorio, irritazione a livello di narici, nasofaringite, rinite, rinorrea, bruciore alla luce del sole, sangue nelle feci e nelle urine, riduzione di peso, anoressia, artralgia, spasmi muscolari, mialgia, vertigini, emicrania, sincope, perdita del gusto, insonnia, disuria, ematuria, proteinuria, dispnea, eccessiva sudorazione e colpi di calore (Salix Pharmaceuticals, 2004).

Una prolungata terapia ad alte dosi di rifaximina è stata associata a reazioni orticarie della pelle, anche se le eruzioni cutanee, risolvibili con l'impiego di antistaminici, non richiedono necessariamente l'interruzione del trattamento (Palermo *et al.*, 1984). Ulteriori reazioni allergiche riportate includono dermatite allergica, rash, edema angioneurotico e prurito.

In un solo paziente è stato evidenziato un leggero incremento (inferiore al doppio) nei livelli di transaminasi, mentre in un altro soggetto sono state determinate conte di eosinofili maggiori rispetto ai livelli basali, fino a circa il 9% (Gerard *et al.*, 2005).

Dopo somministrazione del farmaco, è stato riscontrato un incremento significativo nelle concentrazioni sieriche di potassio e sodio, benché ancora comprese nel range fisiologico. Tali osservazioni potrebbero essere correlate alle alterazioni a livello di elettroliti che si verificano durante il trattamento di disordini diarroici (Scarpignato e Pelosini, 2006).

I dati derivanti da trial clinici evidenziano, quindi, la tollerabilità di rifaximina unitamente ad una bassa insorgenza di reazioni avverse (Gillis e Brodgen, 1995), ma tali dati vanno necessariamente supportati da ulteriori studi controllati. Il buon profilo di tollerabilità è confermato dal programma di sorveglianza post-marketing (Palazzini, 2004). Dalla sua introduzione sul mercato, rifaximina è stata somministrata a più di 8.5 milioni di pazienti sia in Italia che all'estero. In questi anni, l'azienda farmaceutica ha riportato 26 casi di reazioni avverse (in 17 pazienti), di cui solo 4 giudicate serie (1 caso di edema angioneurotico, 1 di rash cutaneo e 2 di orticaria).

## **Dosaggi, controindicazioni e precauzioni**

Rifaximina viene somministrata oralmente sotto forma di compresse da 100 o 200 mg, sospensioni alla concentrazione di 20 mg/ml o gocce alla concentrazione di 50 mg/ml.

Si suggerisce un dosaggio giornaliero dai 10 ai 15 mg/kg per adulti e bambini sopra ai 12 anni d'età, dai 20 ai 30 mg/kg per i bambini al di sotto di questo limite. Se non indicato diversamente, la durata del trattamento nei bambini non deve superare i 7 giorni.

In trial clinici la tipica durata di una terapia con rifaximina varia da 7 a 21 giorni nel caso di encefalopatia epatica, da 5 a 7 in caso di diarrea, da 7 a 10 per il trattamento della diverticolosi, e include i 3 giorni prima dell'intervento in caso di profilassi antibiotica.

L'uso è controindicato in casi di ipersensibilità alle rifamicine o ad un qualsiasi componente della formulazione farmaceutica, e in caso di ostruzione intestinale anche parziale o di gravi lesioni ulcerative dell'intestino.

Casi di colite pseudomembranosa possono verificarsi dopo l'impiego di diversi antibiotici, rifaximina compresa, in pazienti che presentano diarrea subito dopo l'inizio della terapia antibiotica o immediatamente dopo interruzione del trattamento.

Pazienti trattati con rifaximina dovrebbero essere monitorati al fine di controllare un'eventuale crescita eccessiva di batteri non sensibili all'antibiotico.

## Conoscenze sull'analogo strutturale rifampicina

Rifampicina (Fig. 21), derivato semisintetico delle rifamicine, presenta un ampio spettro antibatterico e risulta particolarmente attiva, a basse concentrazioni, contro organismi Gram-positivi specialmente appartenenti al genere *Mycobacterium*. Questa attività giustifica l'esteso uso clinico dell'antibiotico nel trattamento della tubercolosi.

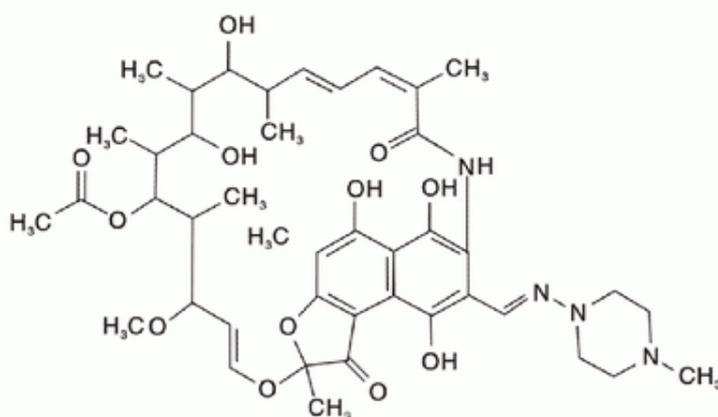


Fig. 21. Struttura chimica di rifampicina.

## Meccanismo d'azione

Hartmann *et al.* (1967) hanno descritto per primi l'effetto inibitorio di rifampicina sull'enzima RNA polimerasi di *E. coli*. Diversamente da altri potenti inibitori della sintesi di acidi nucleici, quali actinomicina e mitomicina che interagiscono con il template di DNA e determinano effetti tossici anche negli esseri umani, rifampicina interagisce specificamente e unicamente con l'enzima batterico.

La sensibilità dell'enzima correla abbastanza bene coi valori di MIC nel caso di batteri Gram-positivi. I valori di MIC decisamente maggiori in batteri Gram-negativi sembrano dipendere da una ridotta penetrazione dell'antibiotico attraverso la membrana esterna di tali organismi.

Quale preciso step della trascrizione sia inibito da rifampicina è stato chiarito da Johnston e McClure (1976) in una serie di eleganti esperimenti. Attraverso l'analisi dell'inizio della sintesi di mRNA in corrispondenza del noto promotore del fago  $\lambda$ , è stato dimostrato come l'antibiotico determini un inizio abortivo della trascrizione con inibizione della formazione del secondo legame fosfodiesterico. È stato anche proposto un modello in base al quale il binding di rifampicina all'RNA polimerasi determina un blocco sterico della traslocazione del dinucleotide pppApU con conseguente inibizione dell'elongazione della catena di RNA (McClure e Cech, 1978).

Successivamente è stato dimostrato come, anche in presenza dell'antibiotico, possano essere sintetizzate piccole quantità di oligonucleotidi (Kessler *et al.*, 1982). Rifampicina non altera l'associazione dell'RNA polimerasi al promotore, non influenza l'attacco del primo e del secondo ribonucleoside trifosfato al sito attivo dell'enzima né inibisce la formazione del primo legame fosfodiesterico, ma sembra interferire, direttamente o allostericamente, con il sito di binding dell'enzima per l'RNA che si sta sintetizzando. Questa ipotesi è supportata dall'evidenza che l'RNA polimerasi, durante l'elongazione della catena, risulta meno sensibile all'azione inibitoria dell'antibiotico. Rifampicina comunque non blocca in modo completo il sito di binding dell'RNA, ma solo la parte che accetta oligonucleotidi di maggiori dimensioni consentendo quindi la sintesi di dinucleotidi ed, in alcuni casi, anche di trinucleotidi. Alla competizione tra RNA ed antibiotico per il legame all'enzima, si aggiunge un possibile effetto destabilizzante di rifampicina sul binding di oligonucleotidi intermedi al complesso attivo enzima-DNA, con conseguente riduzione della probabilità di elongazione della catena.

Le interazioni fisiche esistenti tra antibiotico ed enzima sono state analizzate in dettaglio; mediante l'uso di rifampicina radiomarcata si è evidenziata la formazione di un complesso molto stabile in cui una molecola di antibiotico si lega a ciascun monomero dell'enzima e ne inibisce l'attività (Wehrli *et al.*, 1968). La natura dei legami sembra essere per lo più lipofila; sia la catena dell'ansa, che si spinge all'interno dell'enzima, sia la parte aromatica dell'antibiotico risultano coinvolte nell'interazione specifica con l'RNA polimerasi.

Studi genetici e di affinity labeling hanno indicato come sito primario del binding con rifampicina la subunità  $\beta$  dell'RNA polimerasi (Mr circa 150000 Da). Questa subunità, tuttavia, non mostra alcuna interazione specifica con rifampicina in forma isolata. È infatti l'interazione allosterica tra le subunità nel complesso  $\alpha_2\beta$ , che concorre alla generazione del sito di binding (Lowder e Johnson, 1987).

Studi di carattere cinetico hanno portato alla determinazione del rapporto tra costante di dissociazione ( $k_d$ , cinetica di primo ordine) e costante di associazione ( $k_a$ , cinetica di secondo ordine) del complesso RNA polimerasi-rifampicina. Questo rapporto corrisponde alla costante di equilibrio  $K$ ,  $3.5 \times 10^{-10}$  M a  $0^\circ\text{C}$ ,  $10^{-9}$  M a  $37^\circ\text{C}$ . Il basso valore di  $K$ , unitamente al fatto che una molecola di rifampicina (Mr 823 Da) è sufficiente per inattivare l'RNA polimerasi (Mr circa 475000 Da), spiegano perché concentrazioni molto basse di antibiotico riescano ad inibire l'enzima (Wehrli, 1977).

Indagini sul tasso di binding di rifampicina all'RNA polimerasi a vari stadi della trascrizione, hanno evidenziato come la presenza di acidi nucleici legati all'enzima diminuiscano fortemente la velocità di associazione; il DNA può proteggere l'RNA polimerasi dall'inattivazione, e la sintesi di RNA non risulta ostacolata durante l'elongazione della catena (Hinkle *et al.*, 1972).

Seydel *et al.* (1981) hanno identificato una seconda proteina di binding a rifampicina (rb protein) in *E. coli*, probabilmente appartenente al pool delle proteine di binding del periplasma.

Rilasciata in grandi quantità in seguito a shock osmotico, tale proteina si lega all'antibiotico con una forza decisamente minore se paragonata a quella dell'RNA polimerasi.

## Resistenza

La resistenza batterica ad antibiotici può essere determinata da: (i) ridotto uptake; (ii) incrementato export del farmaco; (iii) inattivazione o modificazione del target; (iv) idrolisi, (v) modificazione o (vi) prevenzione dell'attivazione dell'antibiotico (Normark e Normark, 2002).

Molti studi hanno mostrato come la resistenza a rifampicina sia correlata ad alterazioni nella catena  $\beta$  dell'RNA polimerasi, in seguito a mutazione nel gene codificante. L'enzima, isolato da mutanti resistenti di organismi Gram-positivi e negativi, non risulta inibito dal farmaco o lo è in misura inferiore se comparato al corrispondente enzima di ceppi sensibili (White e Lancini, 1971).

Rifampicina, rifamicina SV, streptovaricina e streptolidigina inibiscono l'enzima agendo sullo step iniziale della trascrizione o in fase di elongazione. Sono stati riportati pattern di resistenza crociata, spiegabili ammettendo l'esistenza di siti di binding parzialmente sovrapposti di dimensioni diverse (Morrow e Harmon, 1979). Tuttavia, in uno studio volto a chiarire se anche rifaximina possa selezionare mutanti di *M. tuberculosis* resistenti a rifampicina, è stata scartata l'ipotesi di resistenza crociata a basse concentrazioni di rifaximina (Debbia *et al.*, 1997).

La mutazione conferente resistenza a rifampicina avviene in un singolo step, e con una frequenza, in *E. coli*, di circa  $10^{-8}$  repliconi. Ovchinnikov *et al.* (1981) hanno mostrato come il cambiamento di un solo amminoacido all'interno della sequenza proteica della subunità  $\beta$  sia in grado di rendere l'enzima meno sensibile all'antibiotico.

Studi mirati a determinare i meccanismi molecolari alla base della resistenza a rifampicina sono stati condotti con successo in *M. tuberculosis* (Telenti *et al.*, 1993). Mediante impiego di appositi primer, progettati sulla sequenza nucleotidica del gene *rpoB* di *E. coli*, è stata amplificata una regione della sequenza della subunità  $\beta$  dell'RNA polimerasi particolarmente significativa ai fini della resistenza. E' infatti la sostituzione di amminoacidi chiave in questa regione che determina i cambiamenti conformazionali responsabili dell'alterazione del sito di binding. Tali amminoacidi sono tra l'altro conservati in numerose specie batteriche.

La resistenza a rifampicina non è un fenomeno "tutto o nulla"; localizzazione e natura della sostituzione amminoacidica possono variare e portare a differenti interazioni con l'antibiotico. I batteri mutanti possono quindi contenere RNA polimerasi sensibili in varia misura, ed essere selezionati per la resistenza a varie concentrazioni del farmaco (Wehrli, 1983).

Mutazioni che influenzano solo in parte il binding di rifampicina possono comunque determinare un effetto specifico sulla trascrizione di numerosi geni. In una varietà di mutanti si può assistere, infatti, alla comparsa di altri effetti accanto alla ridotta sensibilità dell'enzima, quali auxotrofia nei confronti di glutammina in *L. casei* (Morishita e Yura, 1976), e riduzione nell'espressione di geni di vettori episomali in *E. coli* (Romero *et al.*, 1973).

Uno studio condotto su mutanti di *E. coli* resistenti a rifampicina ha evidenziato il potenziale coinvolgimento della RNA polimerasi nella regolazione della biosintesi di arginina. Si tratta di un meccanismo specifico e non applicabile ad altri sistemi inducibili o reprimibili presenti all'interno della cellula, che comporta un aumento nella velocità di divisione cellulare e nella sintesi di RNA ed arginina, ed una minor inducibilità dell'acetilornitina  $\delta$ -transaminasi da parte di arginina, rifampicina o di una combinazione delle due (Wozny *et al.*, 1975).

Non esiste una stretta correlazione tra sensibilità dell'RNA polimerasi e valori di MIC, il che potrebbe essere determinato da cambiamenti nella permeabilità cellulare e dall'impossibilità di comparare direttamente MIC e attività enzimatica. Allo stato attuale non si hanno informazioni sul ruolo della permeabilità di membrana nel meccanismo di resistenza a rifampicina. Nel caso di agenti idrofilici, quali  $\beta$ -lattamici e tetracicline, mutazioni nelle porine della membrana cellulare esterna di batteri Gram-negativi possono conferire resistenza. Tuttavia rifampicina, a causa del peso molecolare relativamente alto e dell'intrinseca natura lipofila, non sembra penetrare attraverso i canali formati da porine, bensì mediante diffusione nel doppio strato fosfolipidico della membrana esterna.

In uno studio condotto su *Mycobacterium* è stata dimostrata l'importanza di fattori di permeabilità nell'ottenimento della resistenza. L'ipotesi di una disorganizzazione delle membrane nasce dall'evidenza di un'aumentata sensibilità in presenza di Tween 80. L'effetto, né permanente né di lunga durata, è risultato essere indipendente da un'eventuale attività metabolica incrementata dal tensioattivo così come da un metabolismo specifico dello stesso, suggerendo un effetto diretto sull'envelope cellulare. È stata inoltre scartata la possibilità di modificazione dell'antibiotico ad opera di enzimi generalmente presenti nell'envelope di organismi resistenti e dipendenti da episomi (Hui *et al.*, 1977).

Recentemente, Fujiwara *et al.* (2001) hanno valutato il transito intestinale di un mutante di *B. longum* resistente a rifampicina e streptomina. La persistenza nel tratto gastrointestinale per adesione alla superficie della mucosa, così come l'attività idrolitica di glucuronidi rendono il microorganismo un appropriato candidato per l'utilizzo come probiotico.

Billington *et al.* (1999) e Mariam *et al.* (2004) hanno misurato il costo fisiologico della resistenza a rifampicina in *M. tuberculosis*, evidenziando una ridotta velocità di crescita nei mutanti resistenti. Tali risultati suggeriscono come la resistenza sia associata ad un ridotto fitness batterico (con riduzione in trasmissione, persistenza e crescita sia all'interno che all'esterno dell'ospite), e come, in assenza dell'antibiotico, i batteri resistenti siano svantaggiati metabolicamente rispetto ai ceppi sensibili. Tuttavia, l'esistenza di mutazioni cost-free e di meccanismi compensatori, con conseguente riduzione dei costi senza perdita del fenotipo resistente, potrebbe contribuire alla stabilizzazione dei mutanti resistenti nella popolazione.

Più recentemente, Perkins e Nicholson (2008) hanno mostrato come mutazioni nel gene *rpoB* in *B. subtilis*, responsabili dell'acquisizione della resistenza a rifampicina, determinino alterazioni nell'espressione di diversi fenotipi posti sotto controllo trascrizionale, quali crescita, trasformazione, sporulazione, germinazione ed utilizzo di substrati.

## Scopo della tesi

Una terapia sicura e ben tollerata che consenta la riduzione dell'infiammazione mucosale ed il mantenimento di un corretto equilibrio del microbiota intestinale, costituisce l'approccio ideale per il trattamento a lungo termine di disordini intestinali quali inflammatory bowel disease (Baumgart e Sandborn, 2007). E' stata proposta la terapia combinata di agenti antimicrobici, per ridurre il carico antigenico, e modulatori del sistema immune, per modificare le risposte sregolate, seguita dall'eventuale supplementazione di probiotici (Rubin e Kornbluth, 2005).

Sulla base dei meccanismi d'azione complementari di antibiotici e probiotici, i vantaggi di un approccio terapeutico combinato potrebbero includere l'allargamento dello spettro antimicrobico, per effetto barriera dei batteri probiotici, e la limitazione di effetti collaterali associati alla chemioterapia tradizionale, quali decremento indiscriminato di batteri intestinali "aggressivi" e "protettivi", assorbimento alterato di elementi nutritivi, reazioni allergiche e infiammatorie.

Rifaximina, derivato semisintetico della rifamicina SV, appartiene alla categoria farmacoterapeutica degli antimicrobici intestinali. Con le rifamicine condivide il meccanismo d'azione che consiste nell'inibizione della RNA polimerasi batterica mediante interazione specifica con la subunità  $\beta$  dell'enzima. Il farmaco è stato il risultato di esperimenti di sintesi, condotti presso i laboratori dell'Alfa Wassermann, volti a modificare i composti originari per ottenere un minor assorbimento gastrointestinale mantenendo una buona attività antibatterica. Siccome l'antibiotico non viene assorbito dalla mucosa gastrointestinale né inattivato dai succhi gastrici, la somministrazione orale fornisce alte concentrazioni intestinali, il che da un lato permette di minimizzare i problemi correlati ad un eventuale assorbimento sistemico, quali insorgenza di antibiotico resistenza ed effetti collaterali sistemici, e dall'altro rende rifaximina un agente antibatterico particolarmente idoneo per il trattamento localizzato di patologie relative al tratto gastrointestinale.

Rifaximina è dotata di un ampio spettro di attività antibatterica, che copre organismi Gram-positivi e Gram-negativi, sia aerobi che anaerobi. In particolare, il farmaco possiede una buona attività inibitoria contro specie di *Staphylococcus* (meticillina sensibili o resistenti), *Streptococcus*, *Enterococcus*, così come contro *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *B. cereus*, *Moraxella catarrhalis*, *H. influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Bacteroides bivius-disiens*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp., *Mobiluncus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *C. difficile*, *H. pylori* e *Vibrio colerae*.

Prodotti fermentati arricchiti con batteri probiotici ["live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host" (Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization, 2002)] rappresentano una categoria di functional food di estremo successo. I probiotici destinati all'impiego umano possono essere suddivisi in probiotici alimentari e farmaceutici. I primi, oltre all'effetto positivo esercitato direttamente sulla microflora intestinale dell'ospite, contribuiscono alle proprietà organolettiche, reologiche e nutrizionali dei cibi. I probiotici farmaceutici trovano impiego nel trattamento di diarrea, stipsi, flatulenza, acidità gastrica, colonizzazione da patogeni, gastroenterite e ipercolesterolemia. Recenti trial clinici hanno dimostrato la loro efficacia anche nel trattamento di malattie infiammatorie intestinali quali UC (Furrie *et al.*, 2005), CD (Fujimori *et al.*, 2007), paucite (Gionchetti *et al.*, 2000, 2003a, 2003b, 2007b; Gosselink *et al.*, 2004; Mimura *et al.*, 2004; Sartor, 2004a, 2004b; Kühbacher *et al.*, 2006) e IBS (Limdi *et al.*, 2006).

Fondamentale è che i probiotici siano, prima di tutto, GRAS, generally recognized as safe (Salminen *et al.*, 1998a) e, dunque, non patogeni né associabili a potenziali rischi per la salute dell'ospite. Per quanto concerne la loro efficacia a livello intestinale, le caratteristiche ottimali includono tolleranza alle condizioni presenti nel tratto gastrointestinale (resistenza ai succhi gastrici, alla bile, e alla digestione ad opera di enzimi enterici o pancreatici), capacità di adesione alle superfici intestinali, antagonismo nei confronti di batteri patogeni, produzione di sostanze antimicrobiche, neutralizzazione di cataboliti tossici mediante enzimi detossificanti e capacità di modulare le risposte immuni dell'ospite (Tannock, 1999; Dunne *et al.*, 2001; Madsen *et al.*, 2001; Ulisse *et al.*, 2001; Lammers *et al.*, 2003).

In questa tesi di dottorato, è stato valutato l'impatto di rifaximina e della somministrazione combinata di antibiotico e probiotico *B. lactis* BI07 sulla microflora fecale di un soggetto sano, sia in termini di composizione batterica che di prodotti metabolici fermentativi. Entrambi i trattamenti hanno determinato un incremento significativo nella concentrazione di batteri appartenenti al genere *Bifidobacterium*, suggerendo l'insorgenza di antibiotico resistenza.

I meccanismi alla base della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium* sono stati caratterizzati mediante approcci molecolari di tipo genetico, proteomico e fisiologico. È stata determinata la sequenza del gene *rpoB*, codificante per la subunità  $\beta$  della RNA polimerasi batterica, target molecolare del farmaco, in specie rappresentative a livello intestinale e componenti della formulazione probiotica VSL#3. La combinazione di elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa MALDI-TOF ha consentito la determinazione dei cambiamenti metabolici correlati all'acquisizione della resistenza a rifaximina. È stata valutata l'attività trascrizionale degli estratti enzimatici di *B. lactis* BI07 e sono stati verificati meccanismi supplementari di resistenza quali alterazioni nella permeabilità della membrana cellulare capaci di impedire l'uptake di antibiotico.

Sono stati, inoltre, riportati gli effetti esercitati da rifaximina e dalla somministrazione combinata di antibiotico e mutanti di *B. lactis* BI07 resistenti, sulle funzioni regolatorie del sistema immunitario dell'ospite.

La comprensione dei meccanismi molecolari alla base della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*, assume un significato applicativo a livello medico e farmaceutico, e rappresenta la base scientifica per giustificare la somministrazione combinata di rifaximina e bifidobatteri probiotici nel trattamento clinico di disordini intestinali.

## Capitolo 1

### **Impatto di rifaximina sul microbiota intestinale. Impiego di un modello dinamico gastrointestinale.**

*Manuscript in preparation*

## Introduzione

L'analisi del microbiota a livello di colon è fortemente limitata dalla natura invasiva dei metodi finalizzati al recupero dei microrganismi. Per ragioni etiche e pratiche, la maggior parte dei dati a disposizione proviene da pazienti sottoposti a ileostomia o da vittime di morte improvvisa.

L'impiego di un sistema di coltura in continuo a 3 stadi, capace di modellare fisiologia ed ecologia delle diverse regioni del colon, può fornire indicazioni sulle variazioni conseguenti alla perturbazione del sistema.

Un modello dinamico gastrointestinale (gut model) è stato utilizzato al fine di valutare (i) l'impatto di rifaximina sulla popolazione batterica intestinale di un individuo sano e (ii) gli effetti sul microbiota intestinale della somministrazione combinata di antibiotico e del ceppo probiotico *B. lactis* BI07.

Sono state determinate variazioni a livello di popolazione batterica mediante conteggio su piastre di terreni selettivi, FISH con impiego di sonde per il gene 16S rRNA, e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). L'analisi HPLC ha consentito la determinazione degli outcome metabolici, in termini di profili di SCFA.

Lo studio è stato effettuato in collaborazione con l'università di Reading, Food Microbial Science Unit, Department of Chemistry, Pharmacy and Food Bioscience.

## Modelli *in vitro* del colon umano

Lo studio del microbiota del colon può essere condotto *in vivo* su volontari sani, pazienti ricoverati, sottoposti a ileostomia o vittime di morte improvvisa. Tuttavia, ragioni etiche e pratiche limitano l'accesso a materiale umano diverso da feci, quale tessuto e contenuto intestinale.

La disponibilità di modelli animali permette di analizzare i processi metabolici mediati da microrganismi intestinali ma la diversa fisiologia del tratto digestivo rende estremamente difficile poter estrapolare i dati all'uomo. È stato, infatti, riportato come i roditori siano coprofagi e come il tratto gastrointestinale superiore dei maiali, generalmente considerati estremamente simili all'uomo, sia colonizzato da un'ampia varietà e quantità di microrganismi (Macfarlane e Macfarlane, 2007).

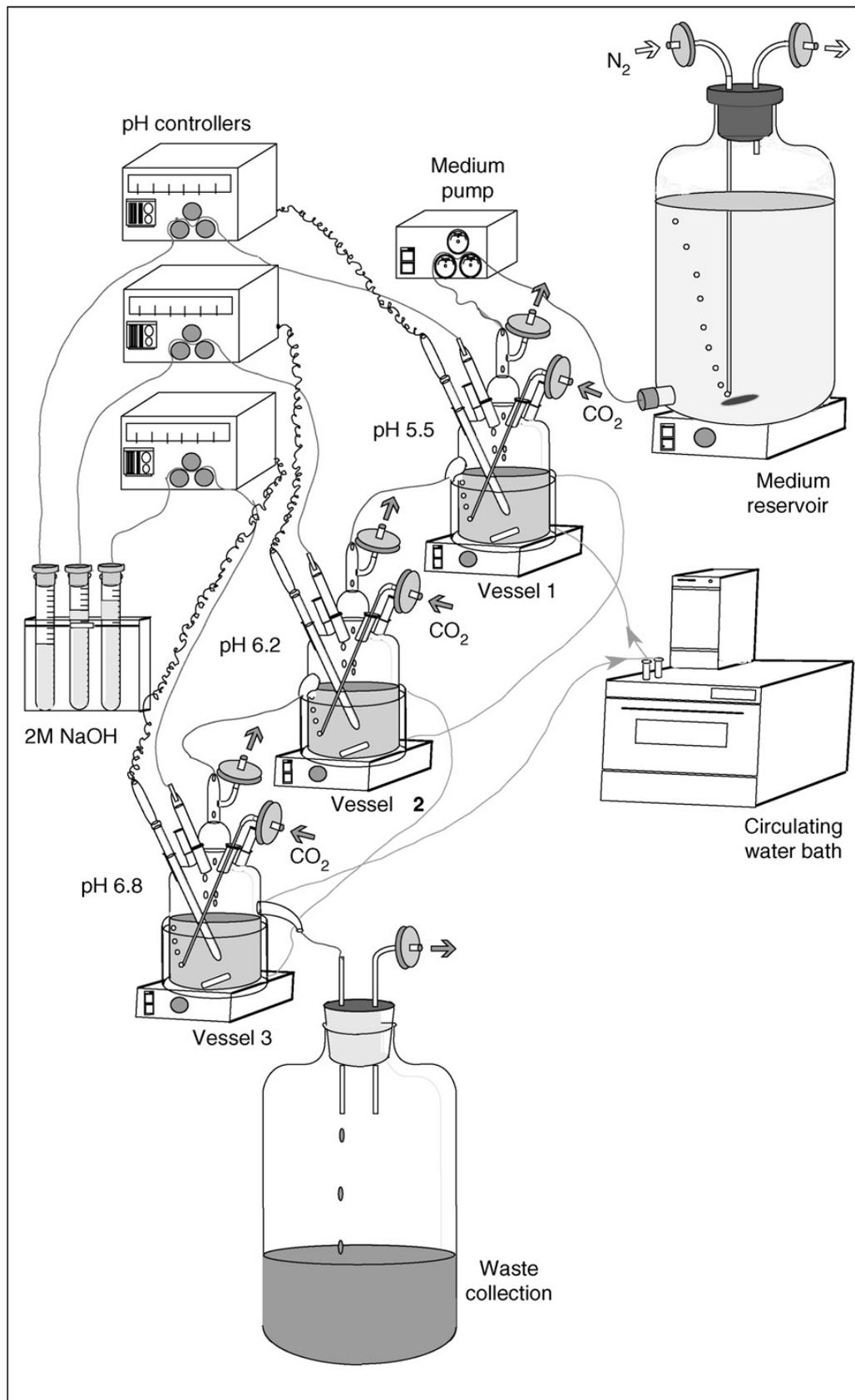
In vittime umane di morte improvvisa, è stata dimostrata un'enorme variabilità lungo il tratto gastrointestinale, di substrati disponibili, popolazioni batteriche, e metabolismo del microbiota (MacFarlane *et al.*, 1992, 1998), e come tale variabilità dipenda strettamente dal tempo di transito intestinale (Cummings *et al.*, 1987b; Macfarlane *et al.*, 1992). I determinanti nutrizionali ed ambientali, e le caratteristiche anatomiche, fisiologiche e microbiologiche che influenzano i processi metabolici intestinali, sono estremamente complessi e interdipendenti. In particolare, quantità e composizione chimica di substrati fermentabili disponibili, forma fisica (dimensione delle particelle, solubilità, associazione con complessi non digeribili quali tannini, lignina, silice, etc.), specie batteriche che compongono il microbiota intestinale, fattori ecologici (interazioni competitive e/o cooperative), e disponibilità di accettori inorganici di elettroni, come  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , determinano le modalità di digestione dei substrati e la formazione dei prodotti fermentativi. L'intestino crasso può, quindi, essere considerato un sistema aperto, con ingresso di residui alimentari provenienti dal piccolo intestino, ed escrezione periodica di materiale fecale all'altra estremità. Caratteristiche anatomiche e meccanismi di peristalsi intestinale fanno sì che i batteri

capaci di colonizzare i residui del cibo a livello di intestino tenue, e capaci di mantenere una significativa popolazione, fungano da inoculo all'ingresso successivo nel colon.

L'inaccessibilità al tratto digerente di individui sani ha portato allo sviluppo di diversi modelli *in vitro*, basati sull'impiego di colture pure o miste, e materiale fecale. Tali modelli, variabili da semplici sistemi di fermentazione batch a sofisticati sistemi di coltura in continuo a multi-stadi, rappresentano tool particolarmente utili e relativamente poco costosi, per l'analisi di processi mediati dal microbiota che avvengono nel lumen del colon. In particolare, colture continue a multi-stadi consentono di poter condurre studi a lungo termine e valutare eventuali perturbazioni del microbiota in condizioni di steady state.

Gibson *et al.* (1988) hanno sviluppato un sistema di coltura in continuo a 3 stadi, capace di riprodurre le caratteristiche spaziali, temporali, nutrizionali, e fisico-chimiche del microbiota del colon prossimale e distale (Fig. 1.1). Questo modello *in vitro* è stato validato sulla base di determinazioni chimiche e microbiologiche effettuate sui contenuti intestinali di vittime umane di morte improvvisa (MacFarlane *et al.*, 1998). Benché siano chiaramente trascurati fattori dell'ospite, quali secrezioni intestinali, sistema immunitario, e assorbimento di metaboliti microbici, il sistema consente il modelling dell'ecologia e delle attività metaboliche dei batteri presenti nel colon in relazione a diverse condizioni nutrizionali e ambientali. La possibilità di effettuare campionamenti con una certa frequenza e in diversi punti del modello, e il poter variare i parametri che influenzano i processi fermentativi (come pH e tempo di transito degli alimenti), rendono possibile l'analisi dei meccanismi molecolari sottesi, ad esempio, a utilizzo di carboidrati, metabolismo di xenobiotici, somministrazione di probiotici e prebiotici, biofilm batterici e attività antimicrobiche. Recentemente, un sistema fermentativo a 3 stadi è stato impiegato per valutare gli effetti della combinazione di antibiotico (piperacillina) e inibitore  $\beta$ -lattamico (tazobactam), sulle capacità proliferative di *C. difficile* (Baines *et al.*, 2005).

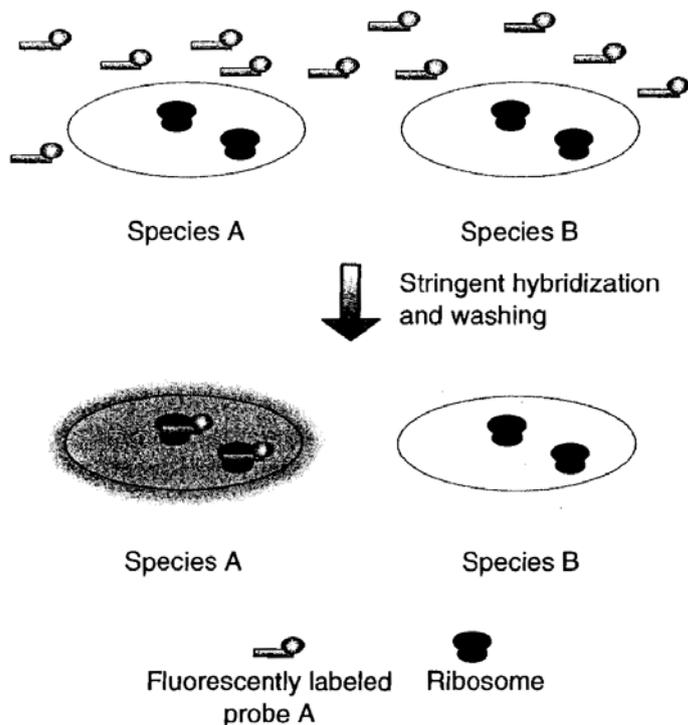
Successivamente, Minekus *et al.* (1999) hanno sviluppato un sistema multi-compartimentale capace di simulare le condizioni esistenti a livello di stomaco e piccolo intestino. Il modello combina la rimozione di metaboliti e acqua a movimenti peristaltici per poter mantenere concentrazioni fisiologiche di microrganismi, materiale secco e metaboliti microbici.



**Fig. 1.1.** Diagramma schematico di un tipico sistema di coltura in continuo a 3 stadi capace di simulare le condizioni nutrizionali e ambientali presenti a livello dell'intestino umano. Medium di coltura sterile alimenta V1, che rappresenta il colon prossimale, ed in sequenza V2 e V3, che mimano rispettivamente colon trasverso e distale. Nel sistema fermentativo, sono riprodotti gradienti nutrizionali e di pH, analoghi alle condizioni osservate *in vivo*.

## Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

La tecnica FISH utilizza sonde oligonucleotidiche specifiche, marcate con fluorofori, dirette verso regioni variabili del gene 16S rRNA (Langendijk *et al.*, 1995; Franks *et al.*, 1998; Harmsen *et al.*, 2002). Batteri appartenenti a gruppi filogenetici diversi sono quantificati tramite conta delle cellule fluorescenti al microscopio o mediante citometria a flusso (Fig. 1.2) (Zoetendal *et al.*, 2004).



**Fig. 1.2.** FISH con sonde oligonucleotidiche rRNA-targeted. Appropriate condizioni di ibridazione e lavaggio sono necessarie per evitare binding aspecifici e consentire la detection degli specifici target in campioni complessi.

L'analisi FISH è stata recentemente impiegata al fine di valutare la composizione del tratto gastrointestinale umano, e sono state sviluppate sonde oligonucleotidiche che consentono la quantificazione di diversi generi batterici, quali *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, e *Veillonella* (McCartney, 2002; Mai e Morris, 2004; Collado *et al.*, 2007).

La possibilità di una determinazione diretta dei microrganismi costituisce uno dei principali vantaggi di questa tecnica; tuttavia, la bassa sensibilità (limite inferiore di detection =  $10^6$  cellule/g di feci) ne limita il campo di applicazione.

## Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

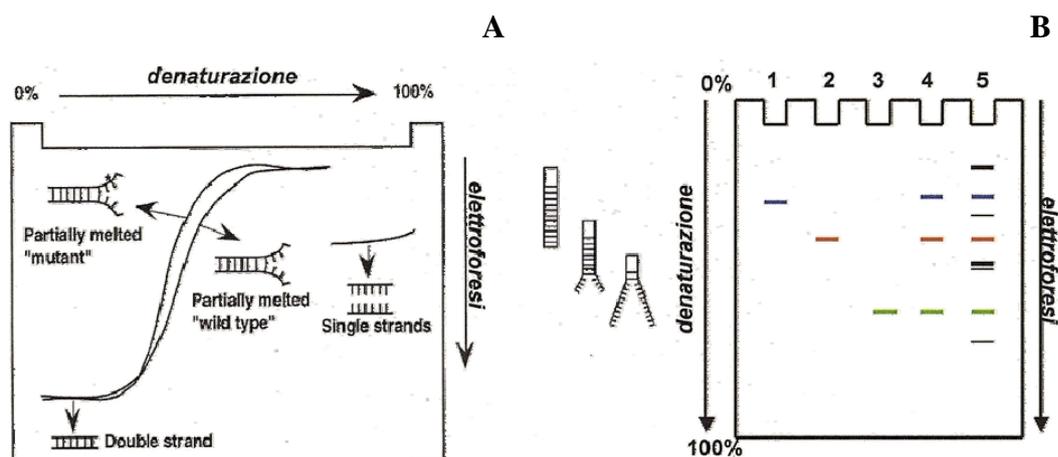
Si tratta di una tecnica di separazione elettroforetica, recentemente introdotta nell'ambito della biologia molecolare, impiegata per l'analisi di corti frammenti di DNA (200-700 bp) che differiscono nella sequenza anche di un solo paio di basi. Nelle elettroforesi classiche condotte su gel di agarosio o acrilammide, i frammenti di DNA vengono separati in base al peso molecolare; la velocità di corsa diminuisce parallelamente all'incremento di lunghezza del frammento. Al contrario, in DGGE frammenti di DNA di pari peso molecolare sono separati in base al pattern di denaturazione (Fischer e Lerman, 1984).

La presenza di calore o denaturanti chimici consente la denaturazione dei due filamenti costituenti una molecola di dsDNA. Temperatura e concentrazione di denaturante a cui si verifica la separazione dei due filamenti, dipendono fortemente dalla sequenza del frammento stesso. In particolare, i fattori determinanti sono: quantità di legami idrogeno che si instaurano tra basi complementari (ovvero contenuto G+C della sequenza), e tipo di interazioni che si stabiliscono tra basi adiacenti sullo stesso filamento (stacking interaction). Una molecola di DNA possiede, quindi, domini con temperature di melting ( $T_m$ ) caratteristiche, determinate dalla sequenza nucleotidica (melting domain). Frammenti di DNA pressoché identici in peso molecolare, ma che differiscono anche per un singolo nucleotide, possono essere caratterizzati da  $T_m$  e melting domain diversi tra loro.

L'analisi DGGE viene condotta su gel di poliacrilammide contenente un gradiente denaturante in modo tale che il dsDNA sia soggetto, durante la corsa, ad un aumento nelle condizioni di denaturazione con conseguente separazione in corrispondenza dei melting domain. Nella parte superiore del gel, dove si hanno condizioni di denaturazione blanda, i melting domain a  $T_m$  inferiore iniziano a denaturarsi parzialmente, creando molecole ramificate con mobilità minore. L'incremento nelle condizioni di denaturazione lungo il gel di poliacrilammide determina la totale dissociazione dei frammenti parzialmente denaturati in ssDNA.

Sperimentalmente, la completa dissociazione dei due filamenti di dsDNA viene ostacolata mediante introduzione, all'estremità di ciascun filamento, di domini caratterizzati da alto contenuto in G+C e alte  $T_m$ . La formazione di 3 legami a idrogeno in una coppia di basi GC, a differenza dei 2 presenti in una coppia AT, implica la necessità di raggiungere una temperatura o una concentrazione di denaturante chimico più elevata, per ottenere la rottura di tali legami. Regioni G+C-rich vengono create artificialmente ad una estremità del dsDNA mediante incorporazione di un GC-clamp durante le reazioni di amplificazione. L'incorporazione del GC-clamp è resa possibile dall'utilizzo di primer caratterizzati da una sequenza di circa 30-40 GC all'estremità 5'. La regione ds così ottenuta, stabile anche a forti condizioni di denaturazione, si comporta al pari di un vero e proprio morsetto, impedendo la dissociazione completa dei frammenti in ssDNA. La presenza di GC-clamp di ugual sequenza all'estremità di ciascuna molecola fa sì che le differenze tra i profili di corsa dei frammenti analizzati, siano principalmente determinate da variazioni nella sequenza dei low melting domain.

Poiché la  $T_m$  è determinata dalla sequenza nucleotidica, la presenza di una singola mutazione è capace di generare un profilo di denaturazione diverso e, conseguentemente, una diversa corsa elettroforetica tra DNA mutato e wild-type (Fig. 1.3A). Analogamente, anche la ricorrenza di polimorfismi in regioni conservate quali il gene 16S rRNA batterico, può essere analizzata mediante DGGE (Fig. 1.3B).



**Fig. 1.3.** Analisi DGGE.

(A) DGGE perpendicolare di campioni di DNA wild-type e mutante.

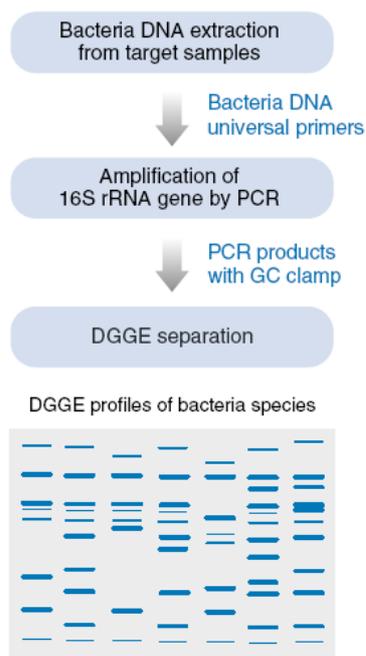
(B) DGGE parallela di comunità batteriche presenti in un campione biologico. I profili di corsa specie-specifici consentono una valutazione qualitativa e semi-quantitativa dei filotipi presenti.

Gli agenti denaturanti normalmente impiegati, urea, formammide, metanolo e dimetilsolfossido (DMSO), sono di natura idrofobica e determinano una riduzione della  $T_m$ . In particolare, le proprietà denaturanti di urea e formammide sono attribuite alla bassa energia di solvatazione, e alla capacità di incrementare la solubilità di basi libere. Formammide e urea determinano, rispettivamente, un calo nella  $T_m$  di DNA lineare pari a 2.4-2.9°C/mole e circa 2°C/mole, ma tali valori subiscono variazioni in relazione a composizione G+C, conformazione dell'elica e stato di idratazione del DNA.

In DGGE, l'ambiente denaturante è realizzato mediante combinazione di temperatura costante, solitamente 50°-65°C, e gradiente di concentrazione lineare costituito da urea e formammide [una soluzione denaturante al 100% contiene urea 7 M e formammide 40% (v/v)]. Il gradiente può essere realizzato sia perpendicolarmente che in senso parallelo rispetto alla direzione di corsa elettroforetica (Fig. 1.3).

I frammenti di DNA possono essere ottenuti mediante amplificazione con primer caratterizzati da GC-clamp di 30-40 basi, o digestione con enzimi di restrizione che consentano l'ottenimento di frammenti di lunghezza compresa tra 200 e 700 bp. AluI, HaeII, HhaI, MspI e RsaI sono i più utilizzati. La corsa elettroforetica di ampliconi e frammenti di restrizione lungo il gel di poliacrilammide avviene all'interno di una camera riscaldata con sistema di agitazione e ricircolo continuo di buffer di corsa, alimentato da pompa peristaltica. La colorazione del gel mediante nitrato d'argento consente la visualizzazione delle bande di DNA e la valutazione dei profili di corsa.

La tecnica DGGE è rapida, sensibile, dotata di alta risoluzione, e consente il recupero da gel dei frammenti separati per successive analisi di sequenza. Muyzer e Smalla (1998) e Zoetendal *et al.* (1998) hanno riportato come l'analisi DGGE consenta la detection di batteri che costituiscono meno dell'1% della comunità batterica totale. I fingerprinting ottenuti mediante PCR-DGGE permettono la visualizzazione della diversità microbica (Fig. 1.4), e l'intensità di ciascuna banda costituisce una misura semi-quantitativa dell'abbondanza relativa del filotipo corrispondente nella popolazione.



**Fig. 1.4.** Tecnica PCR-DGGE.

La difficoltà nel mettere a punto il sistema, le analisi computazionali richieste per scelta e posizionamento del GC-clamp, l'utilizzo di formammide e acrilammide ma soprattutto i bias introdotti nelle reazioni di amplificazione (Von Wintzingrode *et al.*, 1997) costituiscono i principali limiti di questa tecnica. Inoltre, l'analisi non consente l'individuazione della posizione di mutazioni o polimorfismi, e la detection di geni ad alto contenuto G+C e di frammenti superiori in dimensione a 1000 bp.

L'analisi DGGE rappresenta uno step preliminare di ottimizzazione e messa a punto di parametri operativi per l'attuazione di altre tecniche di elettroforesi denaturante, quali TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) e CDGE (Constant Denaturing Gel Electrophoresis).

In CDGE, non si ha gradiente di denaturazione ma è presente un denaturante chimico, solitamente urea, a concentrazione costante nel gel. La concentrazione ottimale di denaturante è determinata mediante analisi in DGGE perpendicolare o parallela. Ad esempio, in caso di analisi di mutanti, è necessario individuare la regione di massimo split, ovvero l'area di massima separazione tra i profili di corsa del mutante e del wild-type, che corrisponde ad una precisa concentrazione di denaturante. In tal modo è possibile ridurre i tempi di casting ed ottenere comunque un'alta sensibilità comparabile ad un'analisi DGGE. Tuttavia, l'applicabilità della tecnica è limitata alla visualizzazione di mutazioni note.

In TTGE, è presente un denaturante chimico, solitamente urea, in concentrazione costante come in CDGE, ma viene, inoltre, realizzato un gradiente di temperatura. Diversamente da un'analisi DGGE, la temperatura aumenta linearmente durante la corsa elettroforetica, originando così un gradiente temporale e non spaziale. Il gradiente viene realizzato dal sistema, mediante setting del parametro ramp rate, che indica l'aumento di temperatura nel tempo ( $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ). L'utilizzo di bassi valori di ramp rate ( $1^{\circ}\text{-}3^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ) consente di ottenere una risoluzione migliore ma prolunga i tempi di corsa. L'intervallo di temperatura, solitamente compreso tra  $40^{\circ}$  e  $70^{\circ}\text{C}$ , è individuato mediante impiego di

un software che determina il profilo di melting della sequenza analizzata e calcola la temperatura di midpoint (TM), in corrispondenza della quale ogni base è in equilibrio tra stato denaturato e non; il susseguirsi dei valori di TM costituisce il profilo di melting. Tuttavia, i range di temperatura calcolati teoricamente potrebbero essere superiori alla capacità del sistema e non risultare, quindi, attuabili da un punto di vista operativo. In tali casi, si procede all'aggiunta di urea che consente l'abbassamento del range termico. La tecnica TTGE viene per lo più impiegata nel caso in cui sia necessario effettuare rapidi screening.

## FPQuest

Il software FPQuest (Bio-Rad) consente l'analisi dei pattern ottenuti in gel DGGE, mediante costruzione di database, identificazione di bande, clustering e analisi statistica, con dimensioning technique quali Principal Component Analysis (PCA) e Multidimensional Scaling (MDS).

Dopo aver effettuato import e normalizzazione delle immagini, si procede alla creazione di un database, in cui vengono inserite tutte le informazioni relative ai campioni analizzati (entry), e agli esperimenti (fingerprint type) condotti (definiti, ad esempio, dalla specifica coppia di primer utilizzata).

Successivamente, viene effettuata una ricerca automatica di lane e valutato l'andamento delle curve densitometriche, che mostrano intensità e posizione delle bande. L'individuazione, automatica o manuale, di threshold per altezza e area dei picchi nelle curve densitometriche, consente la determinazione delle bande stesse. Dopo selezione dei parametri di ottimizzazione (shift permesso tra due lane per ottenere un matching ottimale delle bande) e tolleranza (spostamento consentito tra due bande per considerarle o meno corrispondenti), il software FPQuest esegue il band matching.

Il tool Cluster Analysis calcola una matrice di similarità tra i profili dei campioni analizzati, e li raggruppa in una struttura gerarchica ad albero (dendogramma), sulla base della loro correlazione. Il parametro statistico Pearson product-moment correlation, indice della correlazione tra 2 variabili, viene utilizzato come coefficiente nel calcolo della matrice di similarità, e corrisponde al rapporto tra covarianza e prodotto delle deviazioni standard. Il metodo di clustering Ward rappresenta un algoritmo gerarchico agglomerativo, che raggruppa gli oggetti iniziali in cluster progressivamente più ampi sulla base di stime di similarità. Per minimizzare la varianza all'interno dei gruppi, l'algoritmo ottimizza la partizione ottenuta tramite aggregazione di due elementi. Una partizione viene ritenuta ottimale quando le classi risultano omogenee al loro interno e differenti l'una dall'altra. L'algoritmo ricerca il salto minimo di aumento di varianza interna, aggregando ad un cluster già individuato, l'unità o il gruppo con il minor incremento di varianza interna. In corrispondenza di ciascun ramo del dendogramma, viene calcolato il parametro cophenetic correlation, che rappresenta la correlazione tra misure di similarità derivate dall'albero e calcolate dalla matrice, ed esprime la solidità dei cluster così identificati.

Per verificare l'esistenza di una correlazione tra appartenenza di un campione ad un determinato cluster del dendogramma e time point di raccolta, il software applica il test del Chi-Square ( $\chi^2$ ) ad una tabella di contingenza, che associa tra loro gruppi di campioni (cluster) e categorie (time point).

## Materiali e metodi

### Raccolta e preparazione del materiale fecale

Il materiale fecale è stato fornito da un individuo sano di 30 anni, che non aveva assunto antibiotici per almeno 3 mesi prima dell'inizio dello studio. Le feci sono state raccolte e diluite ad una concentrazione pari al 20% in PBS 0.1 M pre-ridotto (Oxoid). Il campione è stato omogenizzato per 120 s in uno stomacher (Seward), ed i maggiori residui alimentari sono stati rimossi mediante passaggio dello slurry fecale attraverso 2 setacci con diametro dei pori rispettivamente di 1 e 0.125 mm. Cento ml della sospensione sono stati utilizzati per inoculare ciascuno dei 3 vessel del sistema di coltura in continuo. Aliquote da 1 ml dell'inoculo fecale sono state prelevate per analisi batteriologiche.

### Ceppi batterici e condizioni di coltura

*B. lactis* BI07, componente della formulazione probiotica VSL#3 (VSL Pharmaceuticals), è stato cresciuto in anaerobiosi in terreno MRS (Difco) addizionato dello 0.05% di L-cisteina HCl, a 37°C per 18-36 h. Le condizioni anaerobiche sono state ottenute mediante impiego di Anaerocult A (Merck).

I ceppi batterici del microbiota intestinale cresciuti in piastre di terreno selettivo, sono elencati nelle sezioni successive.

### Prodotti chimici e microbiologici

Tutti i prodotti, salvo diversa indicazione, sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich. I terreni di coltura batteriologica sono stati forniti da Difco. Rifaximina è stata sintetizzata presso i laboratori dell'Alfa Wassermann.

### Sistema di coltura in continuo a 3 stadi: “the colon model”

Il modello intestinale, sviluppato da Gibson *et al.* (1988), consiste di 3 vessel arrangiati in serie, V1, V2, e V3, con volumi operativi rispettivamente di 280, 300 e 300 ml. I vessel si alimentano l'un l'altro sequenzialmente e mimano la regione prossimale, traversa e distale del colon umano, in termini di pH (5.5, 6.2, 6.8) e disponibilità di substrato. Ciascun fermentatore è mantenuto in agitazione magnetica, ad una temperatura di 37°C e in condizioni anaerobiche, ottenute mediante insufflazione di 10:10:80 CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> (15 ml/min). Temperatura e pH sono controllati automaticamente mediante ricircolo di acqua e controller modulare di pH.

La composizione in g/l del medium colturale è la seguente: amido 5.0; acqua peptonata 5.0 (Oxoid); triptone 5.0 (Oxoid); estratto di lievito 4.5 (Oxoid); NaCl 4.5 (Thermo Fisher Scientific); KCl 4.5 (Thermo Fisher Scientific); mucina (gastrica porcina di tipo II) 4; caseina 3; pectina (citrus) 2; xilano (avena/farro) 2; arabinogalattani (legno di larice) 2; NaHCO<sub>3</sub> 1.5 (Thermo Fisher Scientific); MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.25; gomma di guar 1; inulina 1 (Orafti Active Food Ingredient, Tienen, Belgium); L-cisteina HCl 0.8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 (Thermo Fisher Scientific); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 (Thermo Fisher Scientific); sali biliari 0.4; CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.15; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.005; emina 0.05;

tween 80 1.0; vitamina K<sub>1</sub> 0.00001. Dopo aggiunta di 4 ml/l di una soluzione di resazurina 0.025% (w/v), il medium è stato autoclavato a 121°C per 15 min. I vessel sono stati inoculati con la sospensione del materiale fecale e, dopo 24 h di establishment, è stata attivata la pompa peristaltica per il medium feed a V1, che alimenta in sequenza V2 e V3.

Il retention time del sistema di coltura in continuo è stato fissato pari a 36 h. Tale valore, corrispondente al reciproco della dilution rate, è costituito dalla somma dei singoli valori di retention in ciascun fermentatore.

Il raggiungimento di uno steady state (SS), in corrispondenza del quale si ha stabilizzazione dei valori di concentrazione batterica, è stato determinato mediante conteggi in piastra su terreni selettivi e FISH. E' stata valutata anche la stabilizzazione dei profili di produzione degli SCFA mediante analisi HPLC. Sulla base delle stime effettuate da MacFarlane *et al.* (1998), 8 turnover completi di volume sono necessari per l'ottenimento del primo steady state.

Solo al raggiungimento di SS, al sistema di coltura in continuo (V1) sono stati addizionati 280 mg di rifaximina 3 volte al giorno, quantitativo equivalente ad una somministrazione giornaliera nell'uomo pari a 1800 mg di antibiotico (Brigidi *et al.*, 2002). Per valutare l'effetto sul microbiota intestinale della somministrazione combinata di antibiotico e probiotico, è stata effettuata un'ulteriore aggiunta giornaliera di 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> CFU/ml di *B. lactis* BI07.

I campioni destinati a conta batterica, analisi FISH, DGGE e HPLC, sono stati prelevati durante il trattamento a diversi time point (T<sub>0h</sub>, T<sub>6h</sub>, T<sub>24h</sub>, T<sub>96h</sub>, T<sub>192h</sub>, T<sub>216h</sub>, T<sub>240h</sub>), fino al raggiungimento del secondo SS (MacFarlane *et al.*, 1998).

## Conta vitale in piastra su terreni selettivi

Diluizioni seriali in acqua peptonata sono state effettuate sia per i campioni fecali impiegati come inoculo, che per i campioni prelevati dal sistema di coltura in continuo.

Piastre di Wilkins-Chalgren (WC) medium sono state utilizzate per la stima degli anaerobi totali. L'enumerazione della popolazione di bifidobatteri è stata effettuata in piastre di terreno Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) (Hartemink *et al.*, 1996). Piastre di MacConkey sono state impiegate per la conta di coliformi; piastre di Schaedler Anaerobe medium, addizionate di sangue di cavallo defibrinato (50 g/l; Oxoid), vancomicina (28 mg/l), kanamicina (100 mg/l) e menadione (50 mg/ml) per la determinazione del genere *Bacteroides*.

Le piastre sono state inoculate con 20 µl della diluizione appropriata ed incubate a 37°C per 48 h, in una camera anaerobica con atmosfera composta da 10:10:80 CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

## Analisi FISH delle popolazioni batteriche

Ai campioni del sistema di coltura in continuo e agli inoculi fecali (2 x 375 µl), sono stati addizionati 3 volumi di paraformaldeide 4% ice-cold. Dopo incubazione a 4°C per 4 h, la sospensione è stata centrifugata a 13000 rpm per 5 min. Il pellet cellulare, lavato 2 volte con 1 ml di PBS 0.1 M filtrato, è stato risospeso in 150 µl dello stesso buffer. Dopo aggiunta di un medesimo volume di etanolo 96%, i campioni sono stati vortexati e conservati a -20°C.

L'analisi FISH è stata condotta come riportato da Daims *et al.* (2005). Un'aliquota dei campioni è stata diluita in PBS/SDS 10% (999:1, v/v) sterilizzato per filtrazione. Le sospensioni cellulari

diluite (6 x 20 µl) sono state applicate nei 6 pozzetti di un vetrino da microscopio, teflon- e poly-L-lysine-coated, con diametro di 10 mm, fornito da Tekdon. I campioni sono stati asciugati per 15 min a 46°C. Per consentire l'ibridazione della sonda Lab158, è stato necessario effettuare un pre-trattamento con lisozima 20 mg/ml (20 µl/well a RT per 15 min, e successivo lavaggio con H<sub>2</sub>O distillata per rimuovere la soluzione enzimatica) per garantire una sufficiente permeabilizzazione dell'envelope cellulare. I vetrini sono stati immersi in etanolo 50, 80 e 96% per 3 min per deidratare i campioni, e asciugati per 2 min a 46°C.

Sulla superficie di ciascun pozzetto è stata applicata la miscela probe/hybridization buffer (5 µl di probe stock 50 ng/µl e 50 µl di hybridization buffer). L'ibridazione è stata condotta in un forno ISO20 (Grant Boekel Instruments) per 4 h. Successivamente, i vetrini sono stati lavati con 50 ml di washing buffer contenente 20 µl di DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride; 50 ng/µl) per 15 min, immersi in H<sub>2</sub>O ice-cold per 2-3 s ed asciugati sotto flusso di aria compressa.

Cinque µl di reagente antifade (poly-vinyl alcohol mounting medium con Dabco<sup>TM</sup> antifading) sono stati addizionati a ciascun pozzetto, ed è stato applicato il coprivetrino. I vetrini sono stati conservati al buio a 4°C (per un massimo di 3 giorni) fino alla conta effettuata con il microscopio Nikon E400 Eclipse (Nikon). La colorazione DAPI è stata visualizzata mediante filtro DM 400; le sonde mediante filtro DM 575. La conta batterica è stata effettuata mediante impiego della seguente equazione:

$$\text{CFU/ml} = \text{DF} \times \text{ACC} \times 6732.42 \times 50 \times \text{DF}_{\text{sample}}$$

DF, fattore di diluizione del campione, corrispondente al rapporto tra volume prelevato (375 µl) e volume operativo (300 µl); ACC, average cell count, determinata su 15 campi di visione assumendo una distribuzione normale dei conteggi; 6732.42, valore corrispondente a area del pozzetto/area del campo di visione; 50, fattore di conversione per ottenere CFU/ml; DF<sub>sample</sub>, fattore di diluizione del campione utilizzato.

Tutte le sonde, marcate con Cy3, sono state sintetizzate da Sigma-Aldrich. In Tab. 1.1 sono riportate le caratteristiche principali delle sonde utilizzate in questo studio, ed i relativi gruppi target.

**Tab. 1.1.** Sonde oligonucleotidiche utilizzate in questo studio e condizioni di ibridazione.

Probe name	Target genus	Sequence (5' to 3')	Hybrid. Pre Treatment	Temperature (°C)		Reference
				Hybrid.	Washing	
Bac303	<i>Bacteroides</i> spp.	CCAATGTGGGGGACCTT	None	46	48	Harmsen <i>et al.</i> (2000)
Bif164	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CATCCGGCATTACCACCC	None	50	50	Manz <i>et al.</i> (1996)
Erec482	<i>E. rectale</i> / <i>Clostridium</i> cluster XIVa	GCTTCTTAGTCARGTACCG	None	50	50	Franks <i>et al.</i> (1998)
Lab158	<i>Lactobacillus</i> spp.	GTATTAGCAYCTGTTTCCA	Lysozyme	50	50	Harmsen <i>et al.</i> (1999)
Ato291	<i>Atopobium</i> / <i>Coriobacterium</i> / <i>Collinsella</i> spp.	GGTCGGTCTCTCAACC	None	50	50	Harmsen <i>et al.</i> (2000)
DSV567	Most species of σ-group of purple bacteria	GGACTGCGTCGCTGCGGC	None	46	48	Devereux <i>et al.</i> (1992)
EUB338†	Most Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	None	46	48	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338II†	Most Bacteria	GCAGCCACCCGTAGGTGT	None	46	48	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338III†	Most Bacteria	GCTGCCACCCGTAGGTGT	None	46	48	Daims <i>et al.</i> (1999)

## Estrazione del DNA genomico batterico

Le cellule batteriche, conservate in glicerolo 50%, sono state centrifugate a 13000 rpm per 5 min, lavate con 1 ml di PBS sterile, e risospese in 0.5 ml di TES buffer. Alla sospensione cellulare conservata in ghiaccio, sono stati aggiunti 8  $\mu$ l di lisozima (10 mg/ml) e 2  $\mu$ l di mutanolisina (1 mg/ml). Dopo incubazione a 37°C per 30 min, sono stati addizionati 10  $\mu$ l di proteinasi K (20 mg/ml) e 10  $\mu$ l di RNasi A (10 mg/ml), e la sospensione cellulare è stata incubata a 65°C per 1 h. Dopo ulteriore aggiunta di 100  $\mu$ l di SDS 10%, incubazione per 15 min a 65°C e successivamente in ghiaccio per almeno 30 min, sono stati addizionati al campione 620  $\mu$ l di soluzione fenolo/cloroformio/H<sub>2</sub>O (Applied Biosystem). I campioni sono stati mescolati per inversione per 2 min e centrifugati a 6500 rpm per 10 min. Un ml di etanolo ice-cold è stato aggiunto al layer acquoso trasferito in un nuovo eppendorf tube sterile. I campioni sono stati nuovamente mescolati per inversione ed incubati in ghiaccio per almeno 30 min. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 5 min e rimozione del surnatante, i pellet di DNA sono stati asciugati e risopsesi in 50  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile.

I campioni di DNA sono stati quantificati con lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) e conservati a -20°C.

## DNA fingerprinting del microbiota intestinale mediante PCR-DGGE

La regione V2-V3 del gene 16S rRNA è stata amplificata mediante impiego del set di primer universali eubatterici HDA1-GC/HDA2 e dei primer Bif164/Bif662-GC specifici per il genere *Bifidobacterium* (Tab. 1.2). I primer sono stati forniti da Bio-Fab Research.

**Tab. 1.2.** Set di primer utilizzati nell'analisi PCR-DGGE.

Primer	Target bacteria	Sequence (5' to 3')	Reference
HDA1-GC	Universal eubacterial primer	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAT	Walter <i>et al.</i> (2000)
HDA2	Universal eubacterial primer	GTATTACCGCGGCTGCTGGA	Walter <i>et al.</i> (2000)
Bif164	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CATCCGGCATTACCACCC	Kok <i>et al.</i> (1996)
Bif662- GC	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGCCACCGTTACACCGGGAA	Kok <i>et al.</i> (1996)

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in Biometra Thermal Cycler T Gradient (Biometra), con AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystem) come DNA polimerasi termostabile. La composizione della miscela di reazione (volume finale 50  $\mu$ L) è la seguente: 0.5  $\mu$ M di ciascun primer, dNTPs 200  $\mu$ M, 1X PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 1.25 U di DNA polimerasi, e 4  $\mu$ l di template di DNA genomico 20 ng/ $\mu$ l.

Il termociclo utilizzato per il set di primer HDA1-GC/HDA2 è il seguente: 95°C per 15 min; 30 cicli di 95°C per 30 s, 56°C per 30 s, 72°C per 60 s; e 72°C per 8 min. Per i primer Bif164/Bif662-GC è stato utilizzato il seguente termociclo: 95°C per 15 min; 30 cicli di 95°C per 30 s, 60°C per 30 s, 72°C per 40 s; e 72°C per 7 min.

I prodotti di amplificazione (200 bp con i primer universali eubatterici, e 500 bp con i primer del genere *Bifidobacterium*) sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%, utilizzando come marker il ladder 100 bp (Fermentas).

L'analisi DGGE è stata effettuata utilizzando l'apparato D-Code Universal Mutation System (Bio-Rad). La separazione sequenza-specifica dei frammenti amplificati è stata ottenuta in gel di poliacrilammide 8% (w/v) [acrylamide-N,N'-bisacrylamide, 40:3 (w/v)], 20 cm x 20 cm x 0.75 mm. Per il set di primer HDA1-GC/HDA2 è stato utilizzato un gradiente chimico di urea e formammide 30-60%, 45-55% per i primer Bif164/Bif662-GC. Una soluzione denaturante al 100% contiene urea 7 M e formammide 40% (v/v); il gradiente è stato generato mediante Gradient Maker ed Econo Pump (Bio-Rad). Un volume di campione compreso tra 8 e 16 µl, addizionato di loading dye (bromophenol blue 2%, xylene cyanol 2%, glicerolo 100%, H<sub>2</sub>O 25%) in rapporto 1:1, è stato caricato sulla superficie di uno stacking gel contenente poliacrilammide 8% (w/v).

La corsa elettroforetica è stata effettuata in 0.5X TAE buffer (Tris 20 mM, acido acetico glaciale 10 mM, EDTA 0.5 mM pH 8), a voltaggio costante di 90 V e alla temperatura di 60°C per 16-17 h. Per la detection dei fingerprinting, è stato utilizzato un protocollo di colorazione silver come descritto da Bassam *et al.* (1991).

Le immagini, acquisite mediante Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad), sono state analizzate con FPQuest Software v. 4.5 (Bio-Rad).

I frammenti di DNA di interesse sono stati excisi da gel, lavati in 1X PCR buffer, ed incubati o/n a 4°C in 20 µl di tampone. Quattro µl della soluzione di buffer sono stati utilizzati come template per la riamplicazione della regione V2-V3 mediante impiego degli stessi set di primer (HDA1/HDA2, Bif164/Bif662) privi di GC-clamp. Dopo purificazione dei frammenti mediante Wizard® SV Gel and PCR Clean up system (Promega), è stato effettuato il loro sequenziamento utilizzando lo strumento 377 sequencer (ABI-PerkinElmer). Il confronto, mediante algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997), con le sequenze geniche di rRNA depositate in GenBank, ha consentito l'identificazione dei frammenti.

## **Analisi HPLC di acidi grassi volatili**

L'analisi HPLC è stata condotta al fine di determinare la produzione di SCFA (acido acetico, propionico, butirrico e valerico), acido lattico e acidi grassi ramificati (iso-butyrico e iso-valerico).

Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 15 min, 20 µl di campione sono stati iniettati in HPLC. Il sistema HPLC utilizzato consiste di L-7100 Merck-Hitachi pressure pump, L-7200 Merck-Hitachi autosampler, L-7350 Merck-Hitachi column oven (Merck-Hitachi), ed RI detection. La colonna impiegata, ion-exclusion REZEX-ROA Organic acid column (Phenomenex), è stata mantenuta a 85°C. Acido solforico 0.0025 mM in HPLC-grade H<sub>2</sub>O è stato utilizzato come eluente, ed è stata impostata una flow rate di 0.5 ml/min.

I campioni sono stati quantificati sulla base di curve di calibrazione ottenute con standard a valori di concentrazione compresi tra 12.5 e 100 mM.

## **Analisi statistica**

I dati ottenuti mediante analisi FISH e HPLC, sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA), mediante impiego della procedura GLM di SAS (v. 9.1, SAS Instruments), in accordo al seguente modello:

$$Y_{ijkh} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijkh}.$$

$Y_{ijk}$ , variabile dipendente;  $\mu$ , valor medio;  $\alpha_i$ , effetto del trattamento;  $\beta_j$ , effetto del vessel;  $(\alpha\beta)_{ij}$ , interazione tra trattamento e vessel;  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2_\varepsilon)$ , errore random unexplained.

I valori medi per ciascun trattamento in condizioni di steady state sono stati valutati con LSD (least significant difference) test quando l'effetto globale del trattamento mostrava  $P < 0,05$ . I dati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di  $P < 0,05$ .

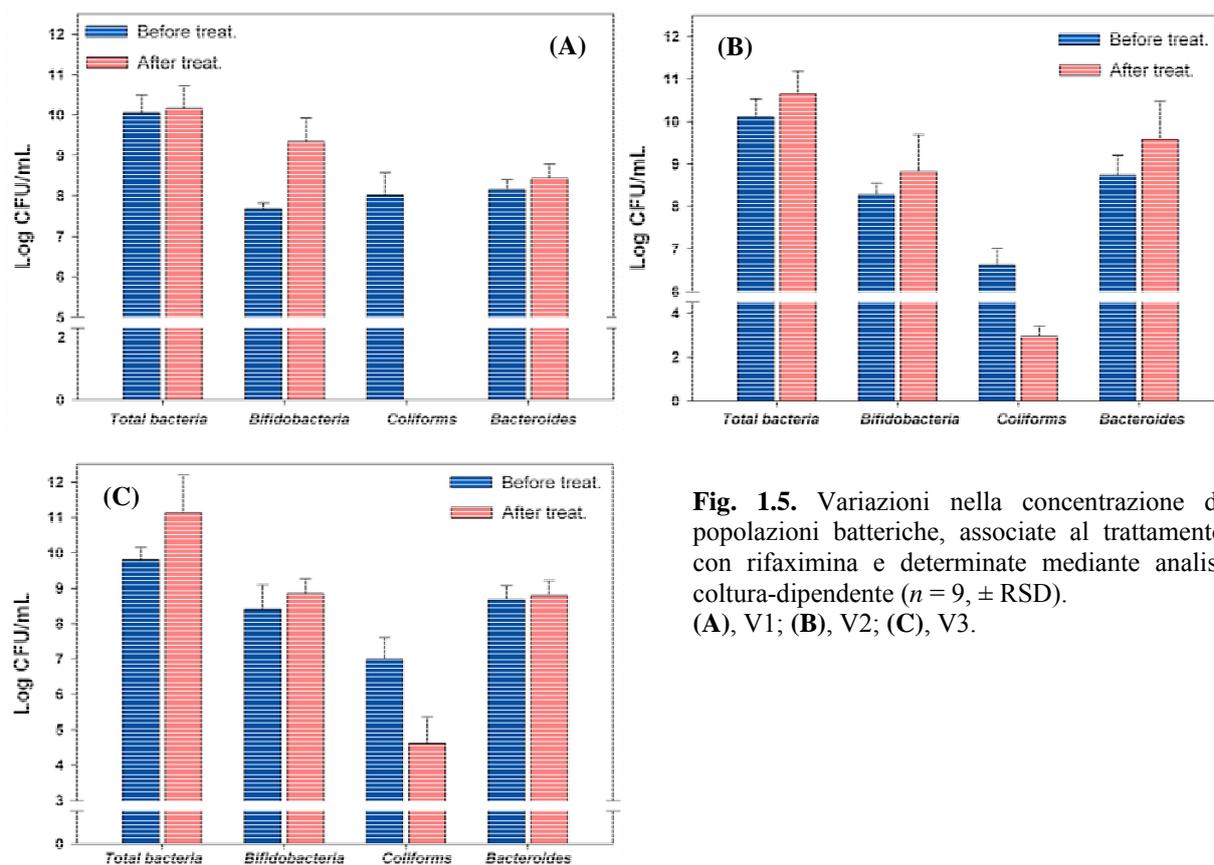
## Risultati

### Analisi coltura-dipendente

Mediante conte vitali in piastra su terreni selettivi, è stata determinata la concentrazione dei principali generi batterici, ed è stata condotta una preliminare analisi delle variazioni nella microflora intestinale associate ai diversi trattamenti.

#### Trattamento con rifaximina

In Fig. 1.5 sono riportate le variazioni, osservate dopo trattamento con 3 dosi giornaliere di rifaximina per 10 giorni, nel numero di batteri totali e a carico di alcune popolazioni batteriche. Non sono state riportate differenze significative nella concentrazione dei batteri totali e del genere *Bacteroides*. Al contrario, il trattamento antibiotico ha determinato un incremento di concentrazione di circa 1 log in V1 per il genere *Bifidobacterium*. Non sono state, invece, osservate variazioni significative nelle conte di bifidobatteri in V2 e V3. Per i coliformi, è stato riportato un decremento significativo a livello di V2 e V3; in V1 non è stata osservata alcuna crescita in piastre di MacConkey, dopo trattamento con rifaximina.

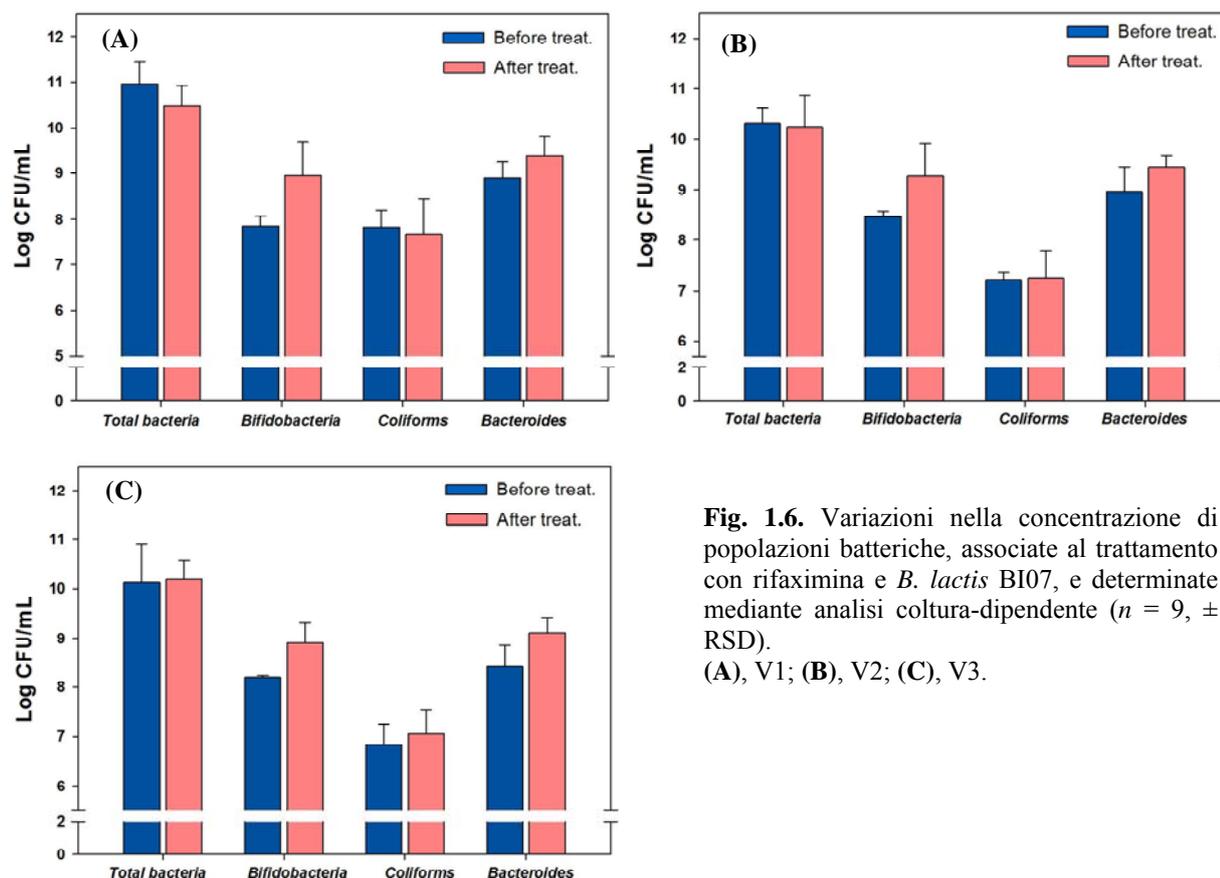


**Fig. 1.5.** Variazioni nella concentrazione di popolazioni batteriche, associate al trattamento con rifaximina e determinate mediante analisi coltura-dipendente ( $n = 9$ ,  $\pm$  RSD). (A), V1; (B), V2; (C), V3.

### Somministrazione combinata di rifaximina e probiotico *B. lactis* BI07

In Fig. 1.6 sono riportate le variazioni, osservate dopo trattamento con 3 dosi giornaliere di rifaximina e  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml/die di *B. lactis* BI07 per 10 giorni, nel numero di batteri totali e a carico di alcune popolazioni batteriche. Analogamente al trattamento con solo antibiotico, non sono state riportate differenze significative nella concentrazione dei batteri totali e del genere *Bacteroides*. Al contrario, la somministrazione combinata di antibiotico e probiotico ha determinato un incremento di concentrazione pari a 0.5-1 log in V1, V2, V3 per il genere *Bifidobacterium*. Non sono state osservate variazioni significative nelle conte di coliformi.

Nonostante i noti limiti degli approcci coltura-dipendenti nello studio dell'ecologia microbica (quali difficoltà nel riprodurre condizioni strettamente anaerobiche e nel soddisfare le richieste nutrizionali di numerose specie microbiche), i risultati preliminari evidenziano come il trattamento antibiotico così come la somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07 non determinino modificazioni drastiche nella composizione della microflora intestinale nei 3 vessel del colon model. In entrambi i casi, è stato osservato un incremento significativo nella concentrazione di *Bifidobacterium* spp.



**Fig. 1.6.** Variazioni nella concentrazione di popolazioni batteriche, associate al trattamento con rifaximina e *B. lactis* BI07, e determinate mediante analisi coltura-dipendente ( $n = 9$ ,  $\pm$  RSD).

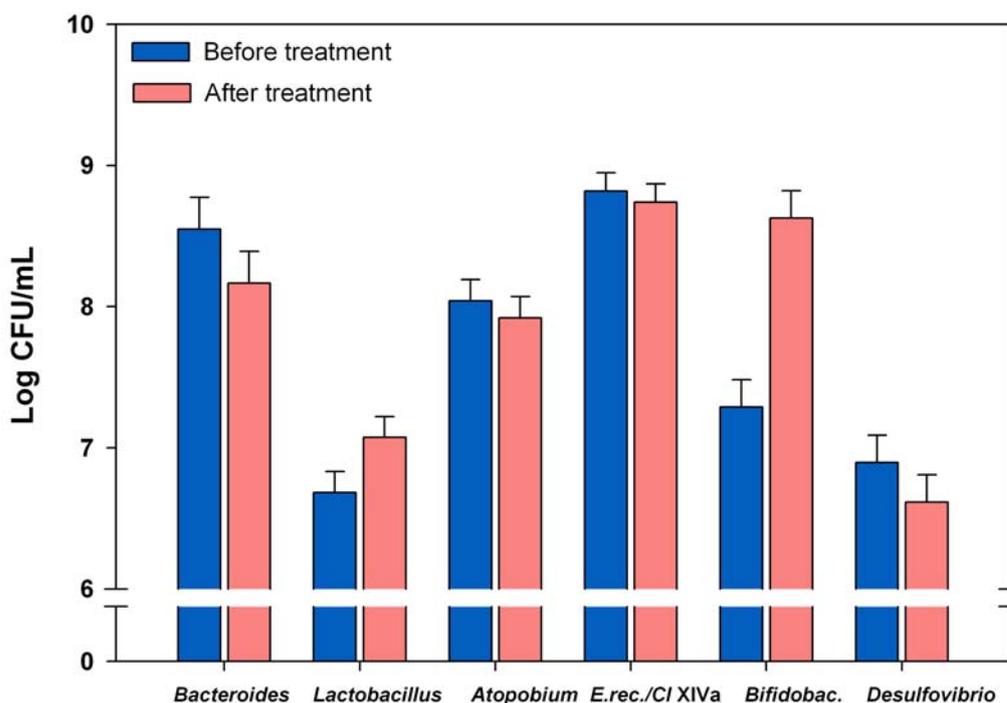
(A), V1; (B), V2; (C), V3.

## Analisi FISH

### Trattamento con rifaximina

In Fig. 1.7 e Tab. 1.3 sono riportati i risultati dell'analisi FISH, effettuata con 7 sonde oligonucleotidiche, caratterizzate da un ampio range di specie e gruppi batterici target.

Dopo trattamento con antibiotico, è stato osservato un incremento, rispettivamente di 1.34 e 0.39 log, nelle conte del genere *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* ( $P \leq 0.0001$ ). In particolare, i bifidobatteri sono risultati incrementati in tutti e 3 i vessel senza differenze significative tra V1, V2 e V3, sia in steady state 1 (SS1, prima del trattamento) che in steady state 2 (SS2, dopo trattamento) (Fig. 1.8A). Per i lattobacilli, l'incremento è risultato significativo a livello di V1 e V2; non sono state riportate, invece, modificazioni in V3 (Fig. 1.8B). Al contrario, è stato riportato un calo, rispettivamente di 0.38 ( $P = 0.004$ ) e 0.28 log ( $P = 0.01$ ), per *Bacteroides* spp. e batteri solfato-riduttori. Non sono state osservate variazioni significative a carico di *Atopobium*, *Eubacterium rectale*/*Clostridium* cluster XIVa e batteri totali.

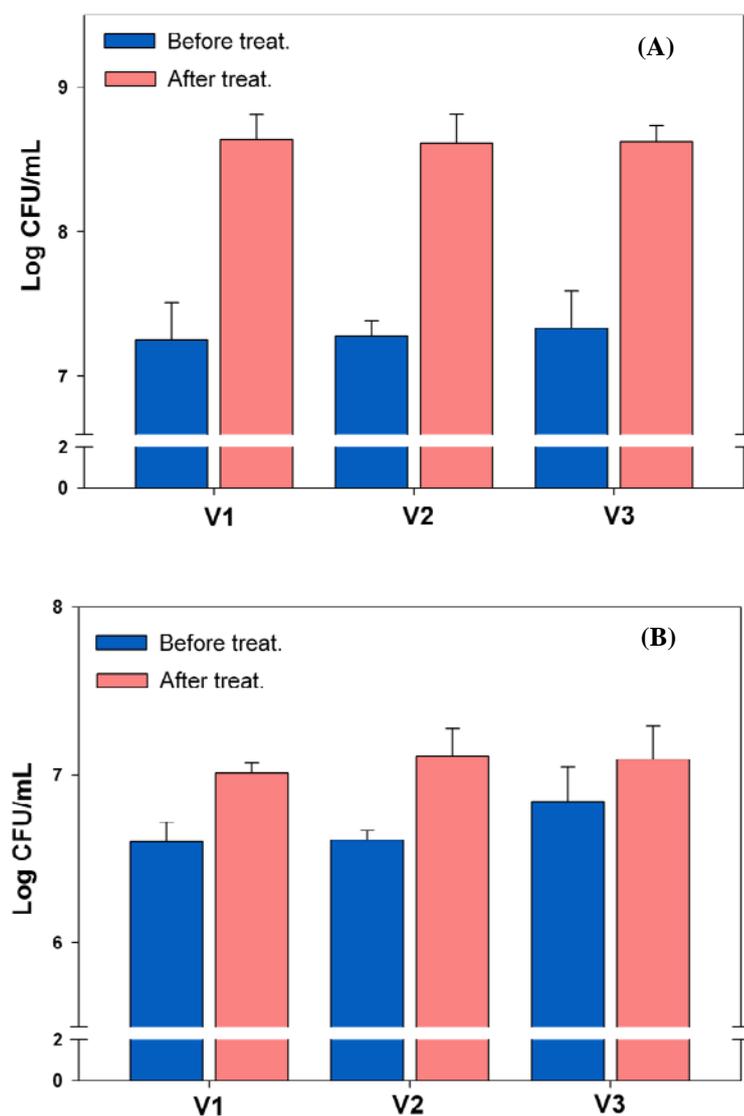


**Fig. 1.7.** Variazioni nella concentrazione di popolazioni batteriche, associate al trattamento con rifaximina, determinate mediante analisi FISH con impiego delle sonde riportate in Tab. 1.1. I risultati sono espressi come valori medi di concentrazione batterica nell'intero sistema fermentativo ( $n = 9$ ,  $\pm$  RSD).

**Tab. 1.3.** Effetto della somministrazione di rifaximina sulla composizione batterica del gut model in condizioni steady state (SS1 e SS2).

Probe	SS1		
	V1	V2	V3
Bac338	8.404 $\pm$ 0.056	8.594 $\pm$ 0.123	8.645 $\pm$ 0.097
Lab158	6.598 $\pm$ 0.117	6.607 $\pm$ 0.058	6.843 $\pm$ 0.208
Ato291	8.118 $\pm$ 0.259	8.010 $\pm$ 0.101	7.992 $\pm$ 0.139
Erec482	8.907 $\pm$ 0.155	8.852 $\pm$ 0.034	8.698 $\pm$ 0.071
Bif164	7.253 $\pm$ 0.257	7.281 $\pm$ 0.101	7.330 $\pm$ 0.263
Dsv687	7.035 $\pm$ 0.221	6.860 $\pm$ 0.067	6.789 $\pm$ 0.137
Probe	SS2		
	V1	V2	V3
Bac338	8.166 $\pm$ 0.410	8.348 $\pm$ 0.311	7.957 $\pm$ 0.097
Lab158	7.015 $\pm$ 0.060	7.113 $\pm$ 0.165	7.090 $\pm$ 0.199
Ato291	8.000 $\pm$ 0.138	7.861 $\pm$ 0.016	7.896 $\pm$ 0.149
Erec482	8.801 $\pm$ 0.228	8.725 $\pm$ 0.095	8.695 $\pm$ 0.100
Bif164	8.644 $\pm$ 0.168	8.613 $\pm$ 0.200	8.621 $\pm$ 0.113
Dsv687	6.517 $\pm$ 0.103	6.632 $\pm$ 0.250	6.695 $\pm$ 0.278

I risultati sono espressi come log CFU/ml  $\pm$  SD. I valori di concentrazione batterica sono stati ottenuti a 3 diversi tempi di campionamento, in SS1 e SS2.

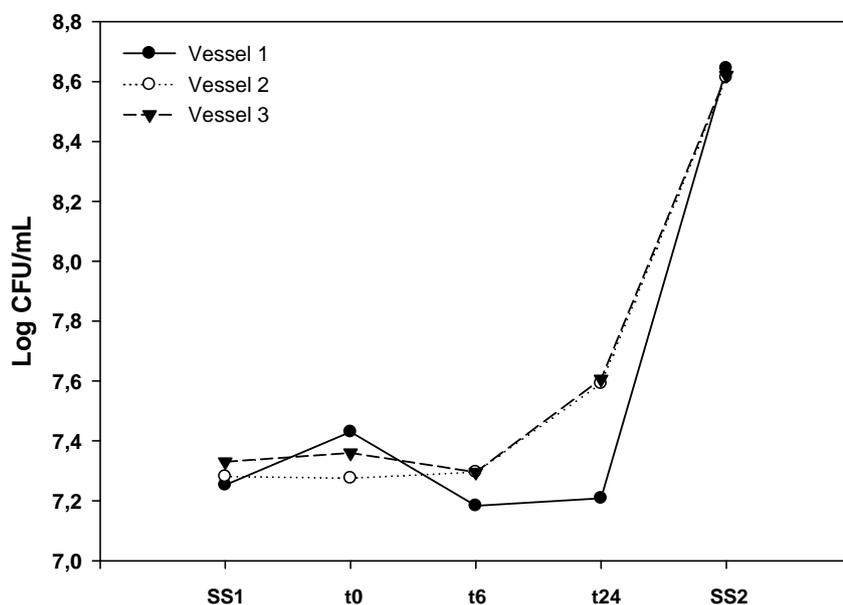


**Fig. 1.8.** Variazioni nella concentrazione di bifidobatteri (A) e lattobacilli (B), associate al trattamento con rifaximina. I risultati sono espressi come media dei valori di concentrazione batterica ottenuti a 3 diversi tempi di campionamento, prima e dopo trattamento antibiotico, in condizioni steady state, in V1, V2 e V3 (n = 6,  $\pm$  RSD).

In Fig. 1.9 è riportata la cinetica di crescita di *Bifidobacterium* spp. durante il trattamento antibiotico. Il campionamento è stato effettuato a 3 diversi time point in condizioni di steady state (SS1: day 12, 13 e 14; SS2: day 22, 23 e 24), al momento dell'aggiunta della prima dose di rifaximina ( $t_0$ ) e dopo 6 e 24 h dall'inizio del trattamento. In accordo alla definizione di steady state, non sono state osservate differenze tra i campionamenti in SS1, ed il valore di concentrazione raggiunto da *Bifidobacterium* in SS2 si è mantenuto costante indipendentemente dai 3 campionamenti effettuati. Dopo 6 h di trattamento antibiotico, è stato evidenziato un calo nella popolazione di bifidobatteri, in particolare a livello di V1, mentre dopo 24 h è stato osservato un incremento significativo di *Bifidobacterium* in V1 e V2. Non sono state riportate variazioni significative a livello di V3. I risultati ottenuti sono in accordo con i dati teorici di distribuzione di rifaximina all'interno del sistema fermentativo. Posto un retention time pari a 36 h, con flow rate di 24 ml/h, sono necessarie circa 25 h per ottenere la completa distribuzione dell'antibiotico a livello dell'intero sistema. Il valore di concentrazione finale raggiunto da *Bifidobacterium* spp. è risultato essere lo stesso in tutti e 3 i vessel.

Analogamente ai risultati ottenuti con metodi coltura-dipendenti, i dati dell'analisi FISH confermano l'incremento nei valori di concentrazione di *Bifidobacterium* nell'intero sistema di

coltura in continuo a 3 stadi dopo trattamento con rifaximina, e suggeriscono l'insorgenza di antibiotico resistenza in questo genere batterico.

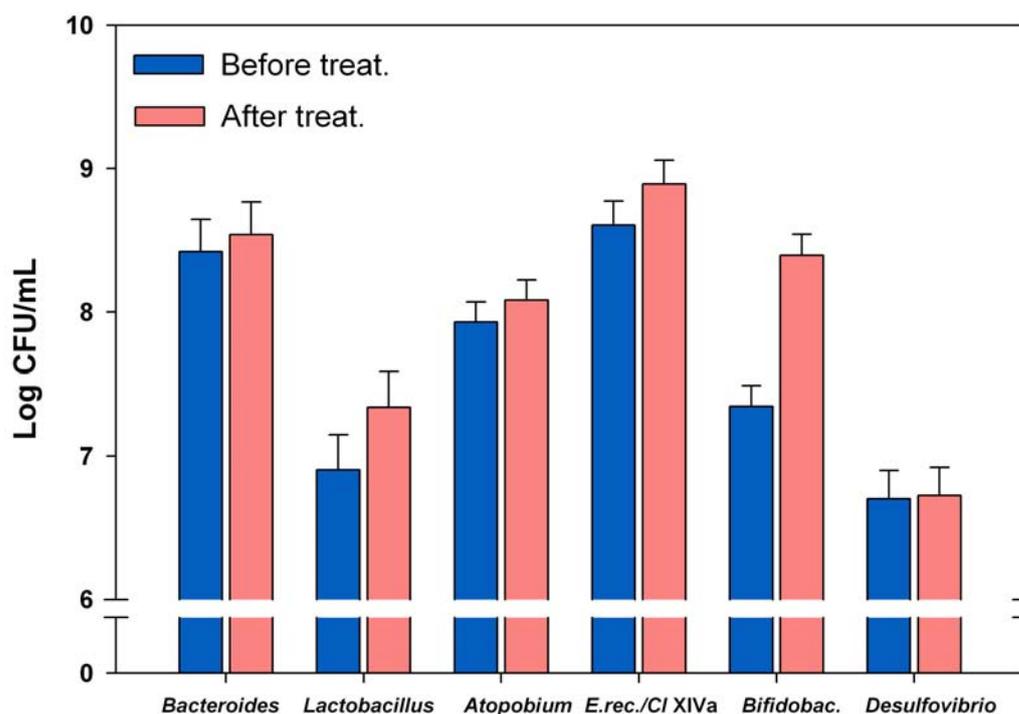


**Fig. 1.9.** Cinetica di crescita di *Bifidobacterium* spp. I risultati in SS1 e SS2 sono espressi come media dei valori di concentrazione batterica ottenuti a 3 diversi tempi di campionamento, prima e dopo trattamento antibiotico. I campionamenti sono stati effettuati all'inizio del trattamento (t0), dopo 6 h dalla somministrazione della prima dose di rifaximina (t6), e dopo 24 h (t24).

### Somministrazione combinata di rifaximina e probiotico *B. lactis* BI07

In Fig. 1.10 e Tab. 1.4 sono riportati i risultati dell'analisi FISH, effettuata con 7 sonde oligonucleotidiche, caratterizzate da un ampio range di specie e gruppi batterici target.

Dopo somministrazione combinata di antibiotico e probiotico, è stato osservato un incremento, rispettivamente di 1.05 ( $P < 0,0001$ ) e 0.44 ( $P = 0.003$ ) log, nelle conte del genere *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. In particolare, i bifidobatteri sono risultati incrementati in tutti e 3 i vessel senza differenze significative tra V1, V2 e V3, sia in SS1 che in SS2 (Fig. 1.11A). Per i lattobacilli, l'incremento è risultato significativo a livello di V2 e V3; non sono state riportate, invece, modificazioni in V1 (Fig. 1.11B). Un incremento significativo è stato riportato anche per *Atopobium* (0.15 log,  $P = 0.04$ ), ed *E. rectale*/*Clostridium* cluster XIVa (0.29 log,  $P = 0.004$ ). Non sono state osservate variazioni significative a carico di *Bacteroides* spp., batteri solfato-riduttori e batteri totali.



**Fig. 1.10.** Variazioni nella concentrazione di popolazioni batteriche, associate al trattamento con rifaximina e *B. lactis* BI07, determinate mediante analisi FISH con impiego delle sonde riportate in Tab. 1.1. I risultati sono espressi come valori medi di concentrazione batterica nell'intero sistema fermentativo ( $n = 9, \pm$  RSD).

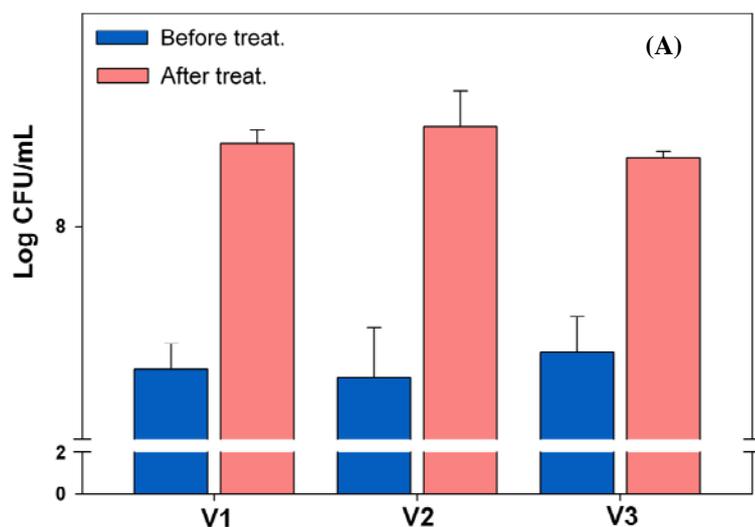
**Tab. 1.4.** Effetto della somministrazione di rifaximina e *B. lactis* BI07 sulla composizione batterica del gut model in condizioni steady state (SS1 e SS2).

Probe	SS1		
	V1	V2	V3
Bac338	8.451 ± 0.369	8.653 ± 0.092	8.155 ± 0.148
Lab158	6.995 ± 0.337	6.929 ± 0.176	6.782 ± 0.071
Ato291	7.999 ± 0.232	7.839 ± 0.026	7.948 ± 0.210
Erec482	8.531 ± 0.052	8.705 ± 0.037	8.582 ± 0.058
Bif164	7.328 ± 0.118	7.289 ± 0.232	7.414 ± 0.167
Dsv687	6.723 ± 0.102	6.669 ± 0.163	6.718 ± 0.247

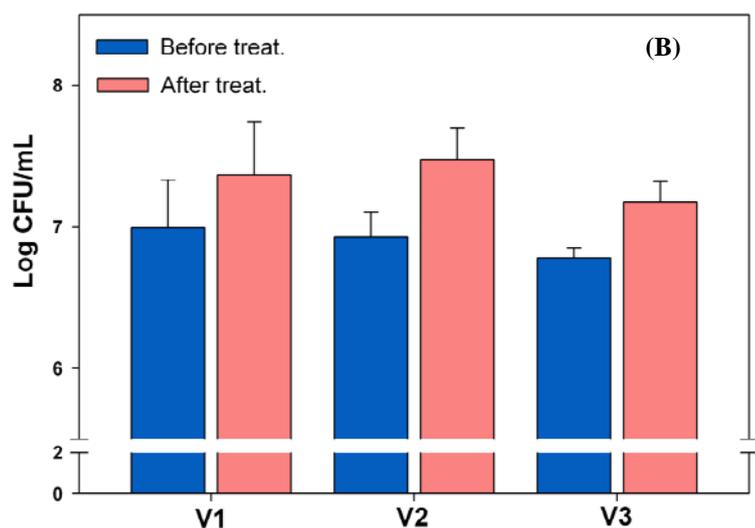
  

Probe	SS2		
	V1	V2	V3
Bac338	8.695 ± 0.086	8.753 ± 0.297	8.173 ± 0.218
Lab158	7.366 ± 0.376	7.478 ± 0.219	7.157 ± 0.146
Ato291	8.141 ± 0.082	8.089 ± 0.118	8.016 ± 0.042
Erec482	8.926 ± 0.196	8.881 ± 0.253	8.856 ± 0.239
Bif164	8.934 ± 0.062	8.470 ± 0.168	8.329 ± 0.031
Dsv687	6.782 ± 0.251	6.838 ± 0.071	6.551 ± 0.259

I risultati sono espressi come  $\log$  CFU/ml  $\pm$  SD. I valori di concentrazione batterica sono stati ottenuti a 3 diversi tempi di campionamento, in SS1 e SS2.



**Fig. 1.11.** Variazioni nella concentrazione di bifidobatteri (A) e lattobacilli (B), associate al trattamento con rifaximina e *B. lactis* BI07. I risultati sono espressi come media dei valori di concentrazione batterica ottenuti a 3 diversi tempi di campionamento, prima e dopo trattamento antibiotico e probiotico, in condizioni steady state, in V1, V2 e V3 (n = 6,  $\pm$  RSD).

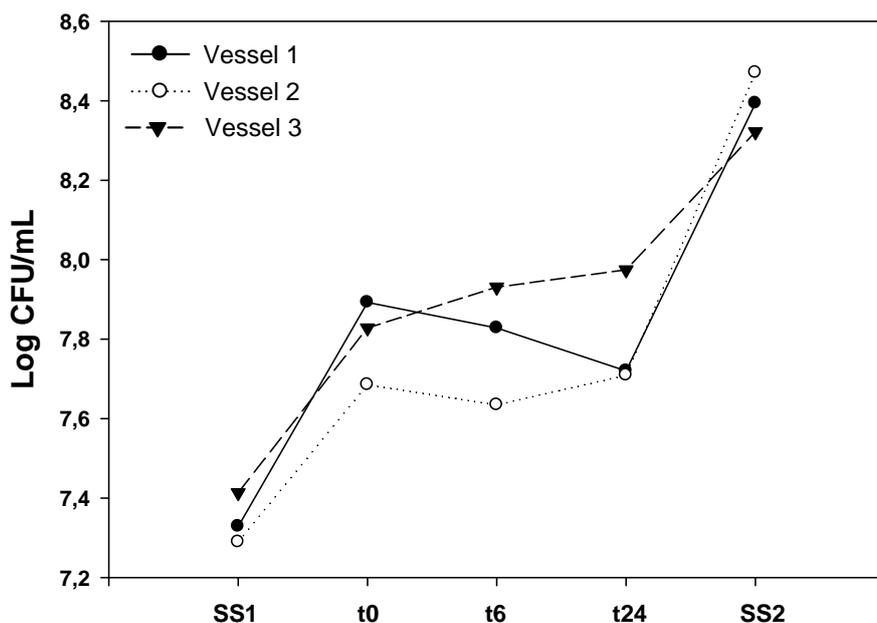


In Fig. 1.12 è riportata la cinetica di crescita di *Bifidobacterium* spp. durante la somministrazione combinata di antibiotico e probiotico. Il campionamento è stato effettuato analogamente a quanto già riportato nel caso di trattamento con solo antibiotico. In accordo alla definizione di steady state, non sono state osservate differenze tra i campionamenti in SS1, ed il valore di concentrazione raggiunto da *Bifidobacterium* in SS2 si è mantenuto costante indipendentemente dai 3 campionamenti effettuati. Le concentrazioni di bifidobatteri a t0 in V1, V2 e V3 riflettono l'aggiunta di  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml del ceppo probiotico *B. lactis* BI07. Dopo 6 h di somministrazione combinata di antibiotico e probiotico, è stato evidenziato un calo nella popolazione di bifidobatteri, in particolare a livello di V1 e V2, mentre dopo 24 h è stato osservato un incremento di *Bifidobacterium* in V2 e V3, ed un calo in V1. Le oscillazioni nei valori di concentrazione di *Bifidobacterium* nei 3 vessel del colon model, riflettono i dati teorici di distribuzione di rifaximina a livello dell'intero sistema. Il valore di concentrazione finale raggiunto da *Bifidobacterium* spp. è risultato essere lo stesso in tutti e 3 i vessel.

Analogamente a quanto già riportato nel caso di trattamento con solo antibiotico, i risultati ottenuti con metodi coltura-dipendenti sono coerenti con i dati dell'analisi FISH, che confermano un incremento significativo nei valori di concentrazione di *Bifidobacterium* nell'intero sistema di

coltura in continuo a 3 stadi dopo somministrazione combinata di rifaximina e probiotico, e suggeriscono l'insorgenza di antibiotico resistenza in questo genere batterico.

La somministrazione combinata di antibiotico e probiotico ha determinato un incremento significativo nei valori medi di concentrazione anche di *Atopobium* ed *E. rectale/Clostridium* cluster XIVa. *Atopobium* spp. sono ritenute commensali della cavità orale e del tratto vaginale, ma presenti anche nel microbiota intestinale di individui sani. Il gruppo *E. rectale/Clostridium* *coccoides*, target principale della sonda Erec482, è caratterizzato da ceppi batterici saccarolitici e produttori di butirrato, considerati health-promoting.

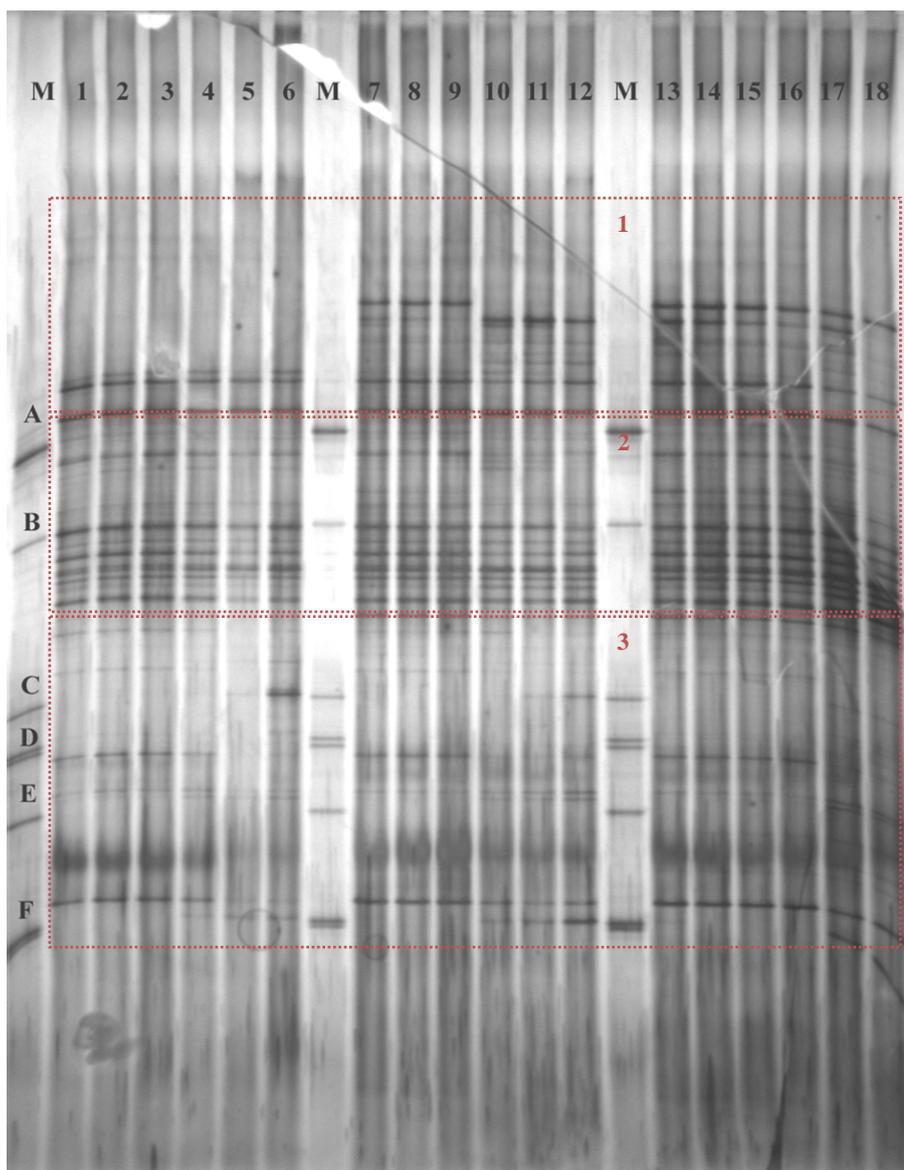


**Fig. 1.12.** Cinetica di crescita di *Bifidobacterium* spp. I risultati in SS1 e SS2 sono espressi come media dei valori di concentrazione batterica ottenuti a 3 diversi tempi di campionamento, prima e dopo trattamento antibiotico e probiotico. I campionamenti sono stati effettuati all'inizio del trattamento (t0), dopo 6 h dalla somministrazione della prima dose di rifaximina (t6), e dopo 24 h (t24).

## DNA fingerprinting del microbiota intestinale mediante PCR-DGGE

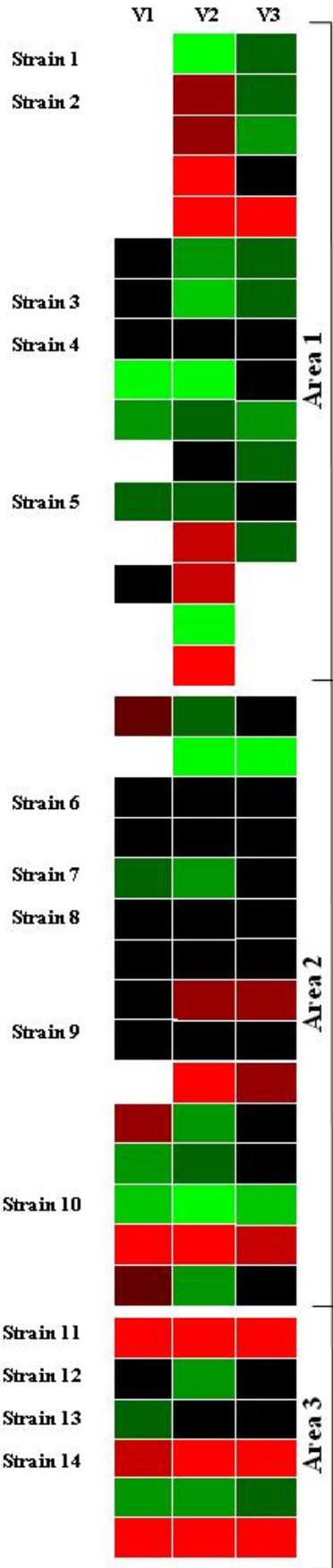
### Trattamento con rifaximina

In Fig. 1.13 sono riportati i profili DGGE di campioni prelevati dal colon model prima e dopo trattamento con rifaximina, ottenuti mediante impiego di primer universali eubatterici. Il gel è composto da 3 dataset, uno per ciascun vessel (V1, lane 1-6; V2, lane 7-12; V3, lane 8-18) e ciascuno suddiviso in 2 subset (SS1, day 12, 13 e 14; SS2, day 22, 23 e 24). Il pattern DGGE è stato confrontato con un sistema di riferimento esterno, rappresentato da un marker contenente le seguenti specie: *Bacteroides*, *Coriobacterium*, *E. faecalis*, *L. casei*, *B. bifidum*, *Acidaminococcus fermentans* (bande A-F, Fig. 1.13).

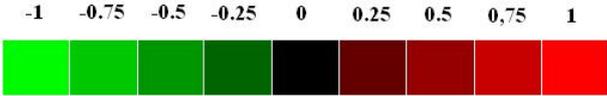


**Fig. 1.13.** Profili DGGE di campioni prelevati dal colon model prima e dopo trattamento con rifaximina, ottenuti mediante impiego di primer universali eubatterici. L'analisi è stata effettuata per ogni vessel (V1, lane 1-6; V2, lane 7-12; V3, lane 13-18) in SS1 (day 12, 13, 14) e SS2 (day 22, 23, 24). M, sistema di riferimento esterno.

Per monitorare le variazioni, associate al trattamento antibiotico, a livello di abbondanza relativa della popolazione eubatterica, all'analisi DGGE è stato applicato un metodo semi-quantitativo. L'abbondanza batterica è stata calcolata come band-related surface, sulla base delle curve densitometriche ottenute mediante analisi con software FPQuest. Variazioni nell'abbondanza batterica in seguito a trattamento con rifaximina, sono state determinate come logaritmo del rapporto tra valori di abbondanza dopo (SS2) e prima (SS1) del trattamento. In tal modo si ottengono valori compresi tra -1 e 1; -1 indica scomparsa di una banda dal gel in SS2, 0 assenza di variazioni tra SS2 e SS1, e 1 comparsa di una nuova banda, assente in SS1. In Fig. 1.14 sono riportate le modificazioni nell'abbondanza batterica relativa associate al trattamento antibiotico, in relazione alle 3 diverse aree in cui è stata suddivisa l'immagine del gel DGGE. Il sequenziamento dei frammenti di DNA recuperati dalle bande ha consentito l'identificazione di specie batteriche rappresentative del microbiota intestinale umano (Tab. 1.5).



**Fig. 1.14.** Modificazioni nell'abbondanza batterica relativa associate al trattamento antibiotico. L'abbondanza batterica è stata calcolata come band-related surface, sulla base delle curve densitometriche ottenute mediante analisi con software FPQuest. Le variazioni sono riportate come logarithmic fold change in V1, V2, e V3. Per la divisione in aree vedi Fig. 1.13. L'assenza di rettangolo colorato indica che il ceppo batterico è presente solo in determinati vessel del sistema fermentativo.



**Tab. 1.5.** Identificazione, mediante sequenziamento e tool bioinformatici, dei ceppi batterici presenti nei profili DGGE associati a trattamento con rifaximina. Per la divisione in aree vedi Fig. 1.13.

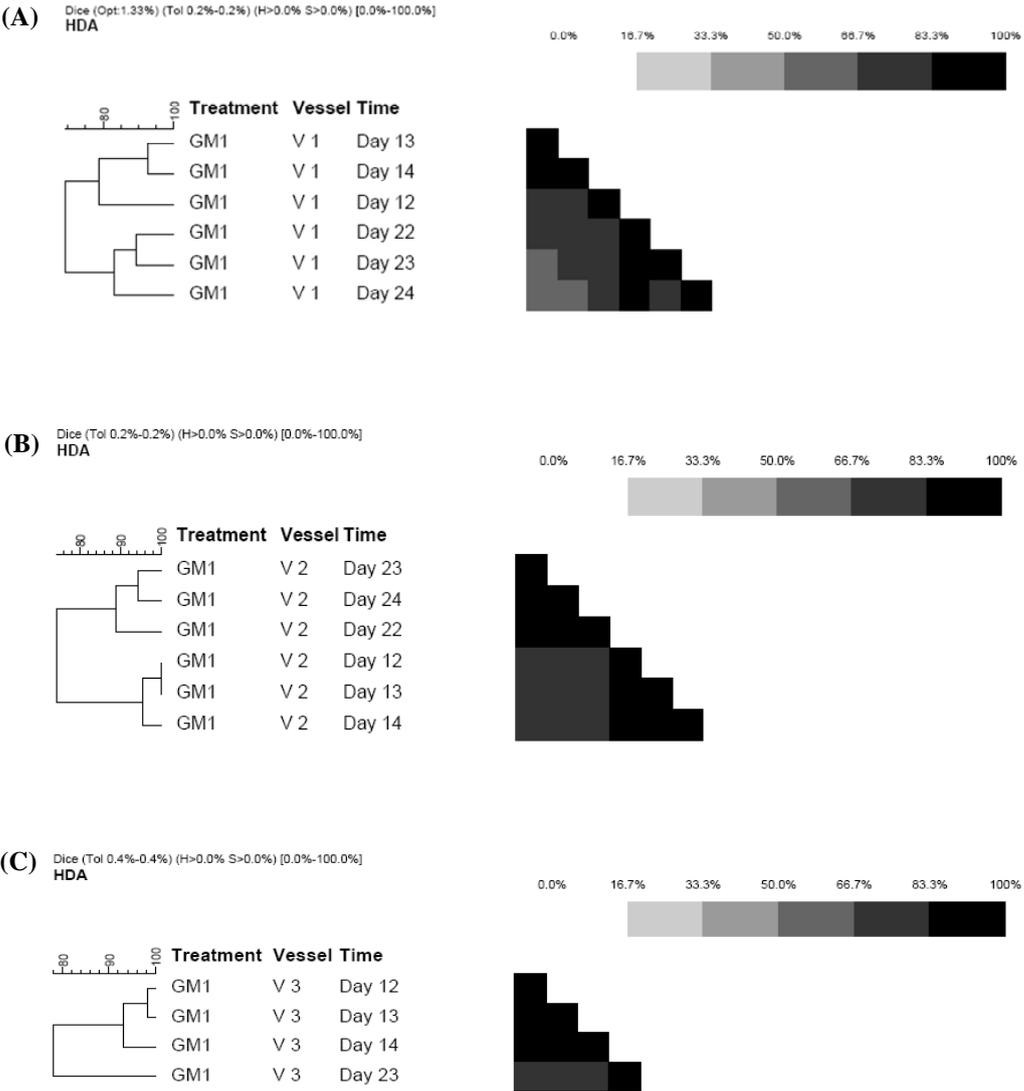
Strain	Area 1 Taxonomic classification	Strain	Area 2 Taxonomic classification	Strain	Area 3 Taxonomic classification
Strain 1	Unknown strain of <i>Bacteroidales</i> order	Strain 6	Unknown strain of <i>Roseburia</i> genus	Strain 11	Uncultured strain of <i>Prevotella</i> genus
Strain 2	Unknown strain of <i>Bacteroidales</i> order	Strain 7	Unknown strain of <i>Coprococcus</i> genus	Strain 12	Uncultured strain of <i>Bacillus</i> genus
Strain 3	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i> bacterium	Strain 8	Unknown strain of <i>Faecalibacterium</i> genus	Strain 13	Unknown strain of <i>Ruminococcus</i> genus
Strain 4	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i> bacterium	Strain 9	Unknown strain of <i>Ruminococcus</i> genus	Strain 14	Uncultured strain of <i>Collinsella</i> genus
Strain 5	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i> bacterium	Strain 10	Unknown strain of <i>Ruminococcus</i> genus		

La prima area del gel, principalmente composta da batteri appartenenti alle famiglie *Lachnospiraceae* e *Bacteroidaceae*, è risultata caratterizzata da un significativo decremento (0.25-0.5 log) nei suoi valori di concentrazione, in particolare a livello di V2 e V3.

Nella seconda area del gel, composta principalmente da gruppi altamente rappresentati nell'intestino crasso dell'uomo [membri del *Clostridium* cluster XIVa (*E. rectale/C. coccoides* subgroup), *Clostridium* cluster VI (*Clostridium leptum* subgroup) e gruppi batterici strettamente correlati], non sono state osservate significative variazioni associate al trattamento con rifaximina. Dopo somministrazione di antibiotico, è stato riportato un calo significativo in V1 e V3 e la scomparsa in V2 di un ceppo batterico appartenente al genere *Ruminococcus* (strain 10).

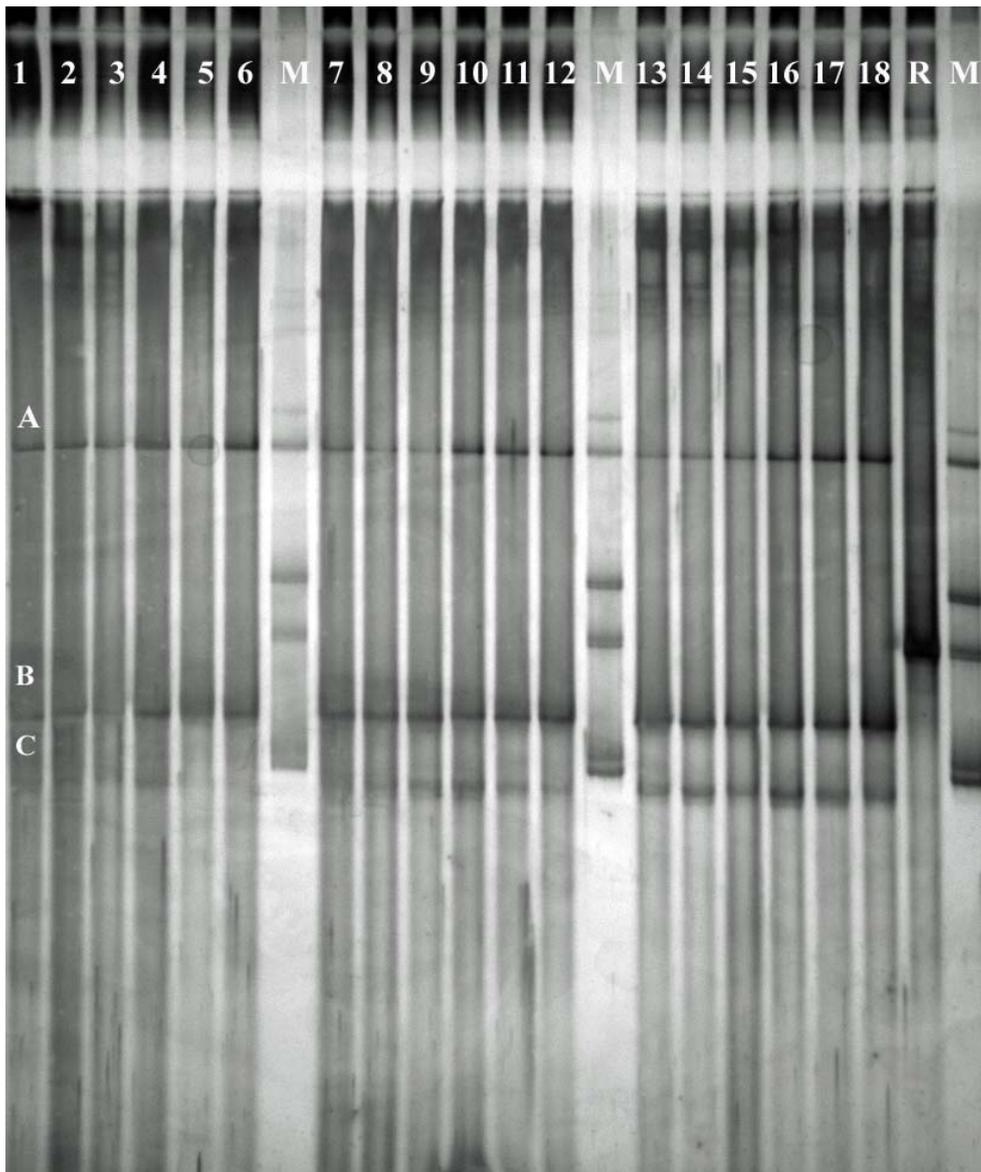
La terza area del gel è risultata caratterizzata da basse densità di popolazione e composizione eterogenea. Dopo trattamento con rifaximina, è apparso in tutti e 3 i vessel un ceppo uncultured appartenente al genere *Prevotella* (strain 11), ed un membro del genere *Collinsella* (strain 14). Non sono state osservate variazioni significative a carico di ceppi batterici di *Bacillus* e *Ruminococcus* (strain 12 e 13).

In Fig. 1.15 sono riportati i risultati di cluster analysis, effettuata mediante software FPQuest ed impiego di band based method Dice e dendogram type UPGMA. A conferma di quanto già verificato con metodi coltura-dipendenti e analisi FISH, i dati di fingerprinting relativi a SS1 clusterizzano insieme in V1, V2 e V3, così come i dati relativi a SS2, il che suggerisce come distribuzione lungo il colon model e supply di nutrienti siano forze determinanti nell'establishment della colonizzazione batterica.



**Fig. 1.15.** Cluster analysis dei profili DGGE, effettuata mediante software FPQuest ed impiego di band based method Dice e dendrogram type UPGMA. L'analisi è stata effettuata per ciascun vessel [(A), V1; (B), V2; (C), V3] in SS1 (day 12, 13, 14) e SS2 (day 22, 23, 24).

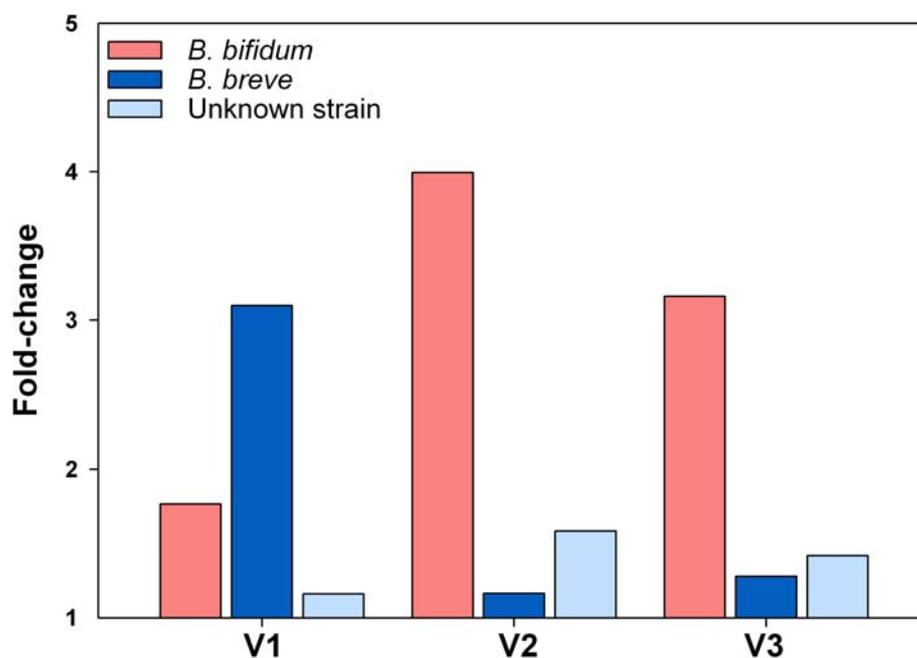
In Fig. 1.16 sono riportati i profili DGGE di campioni prelevati dal colon model prima e dopo trattamento con rifaximina, ottenuti mediante impiego di primer specifici per il genere *Bifidobacterium*. Il pattern DGGE è stato confrontato con un sistema di riferimento esterno, rappresentato da un marker contenente le seguenti specie: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*/*B. angulatum*, *B. longum*/*B. infantis*, *B. gallicum*/*B. pseudolongum*, ed un sistema di riferimento interno (*B. longum*), amplificato insieme ai campioni (Fig. 1.16). Le 3 bande principali visibili in Fig. 1.16, A, B e C sono state identificate, rispettivamente, come *B. bifidum*, *B. breve* e ceppo unknown di *Bifidobacterium*.



**Fig. 1.16.** Profili DGGE di campioni prelevati dal colon model prima e dopo trattamento con rifaximina, ottenuti mediante impiego di primer specifici per il genere *Bifidobacterium*. L'analisi è stata effettuata per ogni vessel (V1, lane 1-6; V2, lane 7-12; V3, lane 13-18) in SS1 (day 12, 13, 14) e SS2 (day 22, 23, 24). M, sistema di riferimento esterno; R, sistema di riferimento interno.

Prima del trattamento, *B. bifidum* (banda A) è risultato il più abbondante in V1, *B. breve* (banda B) il più abbondante in V2 e V3. Le variazioni nell'abbondanza relativa di *Bifidobacterium* in seguito a trattamento con antibiotico, sono state riportate come linear fold-change; 1-fold indica assenza di variazione, 0.5-fold un calo del 50%, 1.5-fold un incremento del 50%. Dopo trattamento con rifaximina, la banda A è risultata incrementata di 1.8-, 4.0- e 3.2-fold, rispettivamente in V1, V2 e V3; la banda B di 3.1-, 1.2- e 1.3-fold, rispettivamente in V1, V2 e V3; la banda C di 1.2-, 1.6- e 1.4-fold, rispettivamente in V1, V2 e V3 (Fig. 1.17).

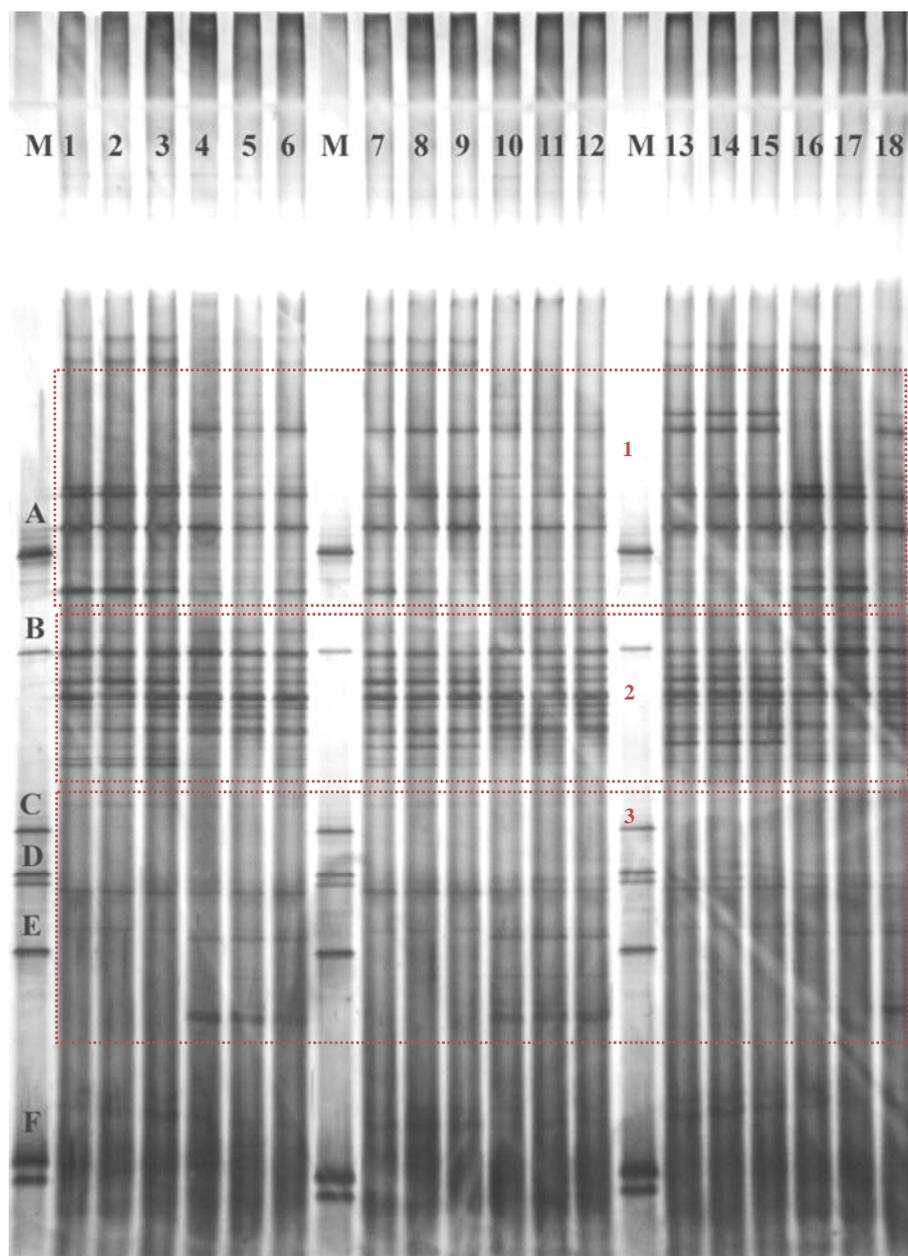
A conferma e verifica di quanto già evidenziato con le conte vitali in piastra e l'analisi FISH, il trattamento con rifaximina non ha determinato modificazioni drastiche nei valori di concentrazione di popolazioni batteriche, ma ha portato ad un significativo incremento di *Bifidobacterium* nel colon model. In particolare, i dati ottenuti mediante approccio DGGE, relativi ai cluster *C. coccoides* e *C. leptum* sono coerenti con i risultati relativi a *E. rectale/Clostridium* cluster XIVa ottenuti mediante analisi FISH. Nei pattern DGGE, non è stato possibile identificare *Bacteroides* spp., data la presenza di membri della famiglia *Lachnospiraceae* nella stessa area del gel, ma è stato dimostrato un significativo calo nei valori di concentrazione microbica in questa area, soprattutto in V2 e V3.



**Fig. 1.17.** Modificazioni nell'abbondanza batterica relativa di ceppi di *Bifidobacterium*, associate al trattamento con rifaximina. L'abbondanza batterica è stata calcolata come band-related surface, sulla base delle curve densitometriche ottenute mediante analisi con software FPQuest. Le variazioni sono riportate come linear fold-change per ciascuna banda in V1, V2, e V3.

### Somministrazione combinata di rifaximina e probiotico *B. lactis* BI07

In Fig. 1.18 sono riportati i profili DGGE di campioni prelevati dal colon model prima e dopo somministrazione combinata di antibiotico e probiotico, ottenuti mediante impiego di primer universali eubatterici. Il gel è composto da 3 dataset, uno per ciascun vessel (V1, lane 1-6; V2, lane 7-12; V3, lane 13-18) e ciascuno suddiviso in 2 subset (SS1, day 12, 13 e 14; SS2, day 22, 23 e 24). Il pattern DGGE è stato confrontato con un sistema di riferimento esterno, rappresentato da un marker contenente le seguenti specie: *Bacteroides*, *Coriobacterium*, *E. faecalis*, *L. casei*, *B. bifidum*, *A. fermentans* (bande A-F, Fig. 1.18).



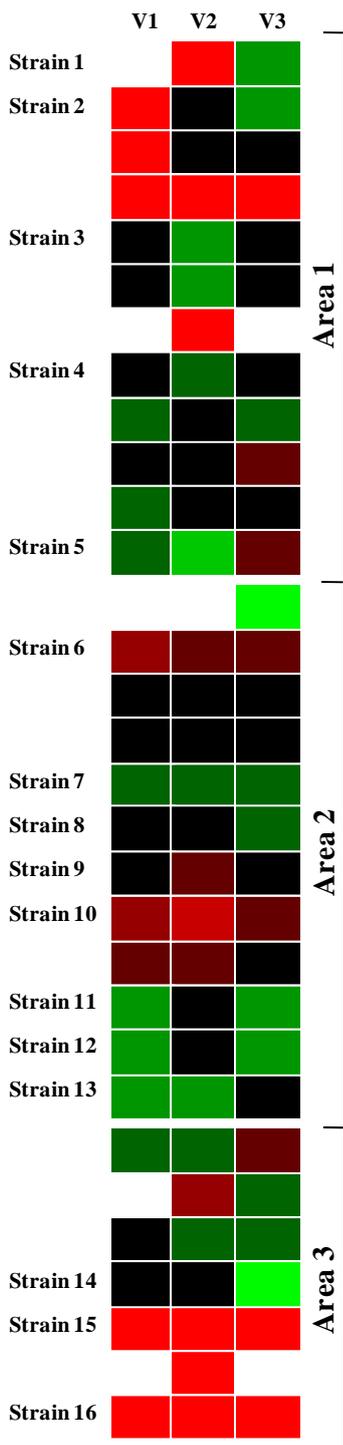
**Fig. 1.18.** Profili DGGE di campioni prelevati dal colon model prima e dopo somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07, ottenuti mediante impiego di primer universali eubatterici. L'analisi è stata effettuata per ogni vessel (V1, lane 1-6; V2, lane 7-12; V3, lane 13-18) in SS1 (day 12, 13, 14) e SS2 (day 22, 23, 24). M, sistema di riferimento esterno.

Per monitorare le variazioni, associate alla somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07, a livello di abbondanza relativa della popolazione eubatterica, all'analisi DGGE è stato applicato un metodo semi-quantitativo. Analogamente a quanto già riportato nel caso di trattamento solo con antibiotico, l'abbondanza batterica è stata calcolata come band-related surface, sulla base delle curve densitometriche ottenute mediante analisi con software FPQuest, e le variazioni nell'abbondanza batterica sono state espresse come logaritmo del rapporto tra valori di abbondanza dopo (SS2) e prima (SS1) del trattamento. In Fig. 1.19 sono riportate le modificazioni nell'abbondanza batterica relativa associate alla somministrazione combinata di antibiotico e probiotico, in relazione alle 3 diverse aree in cui è stata suddivisa l'immagine del gel DGGE. Il sequenziamento dei frammenti di DNA recuperati dalle bande ha consentito l'identificazione di specie batteriche rappresentative del microbiota intestinale umano (Tab. 1.6).

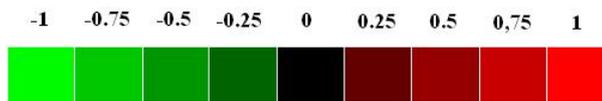
La prima area del gel, principalmente composta da batteri appartenenti alle famiglie *Lachnospiraceae* e *Bacteroidaceae*, non è risultata caratterizzata da modificazioni drastiche nei valori di concentrazione delle sue popolazioni batteriche. In particolare, è stato identificato *B. thetaiotaomicron* (strain 2), la cui banda appare in V1 in seguito a trattamento, non varia in abbondanza in V2, e mostra un calo di concentrazione in V3. Analogamente, la banda corrispondente ad una specie batterica unknown (strain 1), appartenente alla famiglia *Bacteroidaceae*, compare in V2 e mostra un calo in abbondanza in V3. Inoltre, dopo trattamento, è stato osservato un calo nell'abbondanza di un clone unknown del genere *Bacteroides* (strain 5) in V1, una riduzione significativa della sua concentrazione in V2, ed un incremento in V3.

Nella seconda area del gel, composta principalmente da gruppi altamente rappresentati nell'intestino crasso dell'uomo [membri del *Clostridium* cluster XIVa (*E. rectale*/*C. coccoides* subgroup), *Clostridium* cluster VI (*C. leptum* subgroup) e gruppi batterici strettamente correlati], sono state osservate complesse variazioni associate alla somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07. In particolare, nella parte superiore del gel, è stato evidenziato un significativo incremento in V1 nell'abbondanza di un ceppo unknown di *Roseburia* (strain 6), mentre nessuna variazione è stata riportata per le bande adiacenti. Inoltre, è stato osservato un calo in concentrazione per un ceppo unknown appartenente al genere *Coprococcus* (strain 7), assenza di drastiche variazioni nell'abbondanza di bande corrispondenti a membri del genere *Faecalibacterium* (strain 8) e *Butyrivibrio/Ruminococcus* (strain 9), un significativo incremento nella concentrazione di *Lactonifactor longoviformis* (strain 10), ed un significativo calo nell'abbondanza di specie batteriche appartenenti ai generi *Megasphaera* (strain 11) e *Ruminococcus* (strain 12 e 13).

La terza area del gel è risultata caratterizzata da basse densità di popolazione e composta principalmente da *Actinobacteria*. Dopo somministrazione combinata di antibiotico e probiotico, sono comparse nell'intero sistema fermentativo bande identificate come *B. bifidum* (strain 15) e un ceppo batterico uncultured appartenente alla classe *Actinobacteria* (strain 16), mentre è stato osservato un calo significativo in V3 ed assenza di variazioni in V1 e V2 per un altro membro di *Actinobacteria* (strain 14).



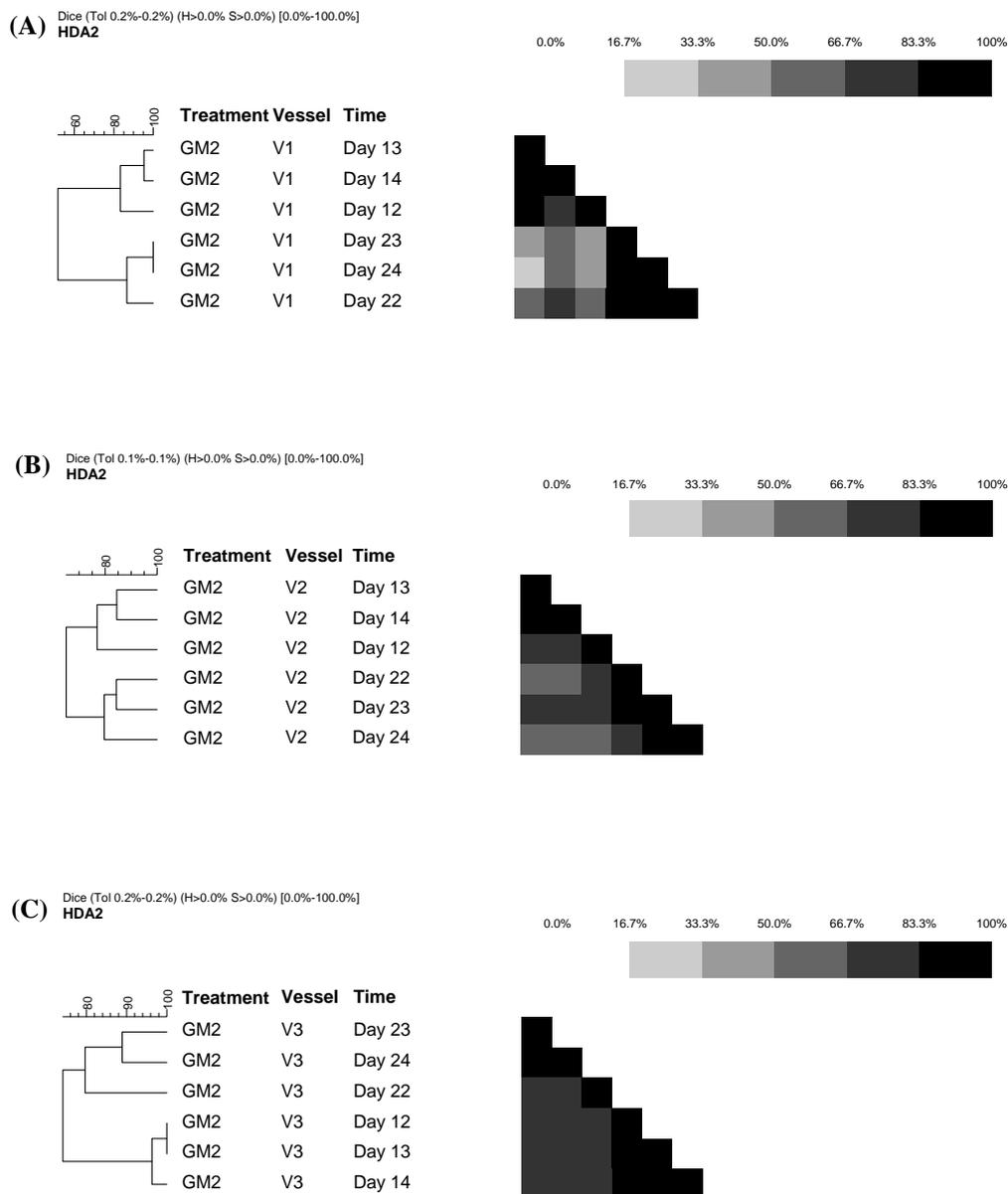
**Fig. 1.19.** Modificazioni nell'abbondanza batterica relativa associate alla somministrazione combinata di antibiotico e probiotico. L'abbondanza batterica è stata calcolata come band-related surface, sulla base delle curve densitometriche ottenute mediante analisi con software FPQuest. Le variazioni sono riportate come logarithmic fold change in V1, V2, e V3. Per la divisione in aree vedi Fig. 1.18. L'assenza di rettangolo colorato indica che il ceppo batterico è presente solo in determinati vessel del sistema fermentativo.



**Tab. 1.6.** Identificazione, mediante sequenziamento e tool bioinformatici, dei ceppi batterici presenti nei profili DGGE associati alla somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07. Per la divisione in aree vedi Fig. 1.18.

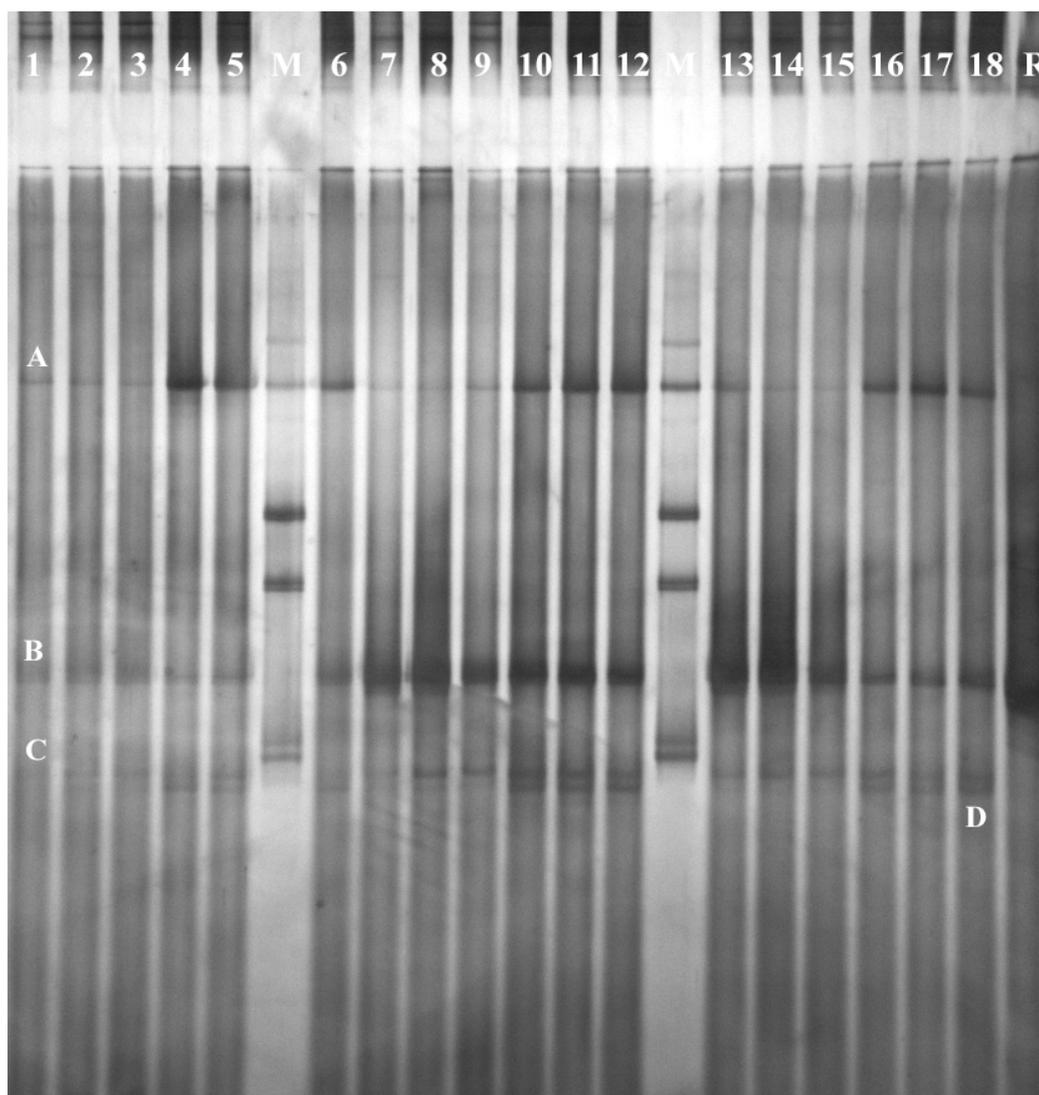
Strain	Area 1 Taxonomic classification	Strain	Area 2 Taxonomic classification	Strain	Area 3 Taxonomic classification
Strain 1	Unknown <i>Bacteroidaceae</i> bacterium	Strain 6	Unknown strain of <i>Roseburia</i> genus	Strain 14	Uncultured strain of <i>Actinobacteria</i> class
Strain 2	<i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i>	Strain 7	Unknown strain of <i>Coprococcus</i> genus	Strain 15	<i>B. bifidum</i>
Strain 3	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i> bacterium	Strain 8	Unknown strain of <i>Faecalibacterium</i> genus	Strain 16	Uncultured strain of <i>Actinobacteria</i> class
Strain 4	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i> bacterium	Strain 9	Unknown strain of <i>Butyrivibrio/</i> <i>Ruminococcus</i> genus		
Strain 5	Unknown strain of <i>Bacteroides</i> genus	Strain 10	<i>Lactonifactor</i> <i>longoviformis</i>		
		Strain 11	Unknown strain of <i>Megasphaera</i> genus		
		Strain 12	<i>Ruminococcus</i> spp.		
		Strain 13	Unknown strain of <i>Ruminococcus</i> genus		

In Fig. 1.20 sono riportati i risultati di cluster analysis, effettuata mediante software FPQuest ed impiego di band based method Dice e dendogram type UPGMA. A conferma di quanto già verificato con metodi coltura-dipendenti e analisi FISH, i dati di fingerprinting relativi a SS1 clusterizzano insieme in V1, V2 e V3, così come i dati relativi a SS2, il che suggerisce come distribuzione lungo il colon model e supply di nutrienti siano forze determinanti nell'establishment della colonizzazione batterica.



**Fig. 1.20.** Cluster analysis dei profili DGGE, effettuata mediante software FPQuest ed impiego di band based method Dice e dendrogram type UPGMA. L'analisi è stata effettuata per ciascun vessel [(A), V1; (B), V2; (C), V3] in SS1 (day 12, 13, 14) e SS2 (day 22, 23, 24).

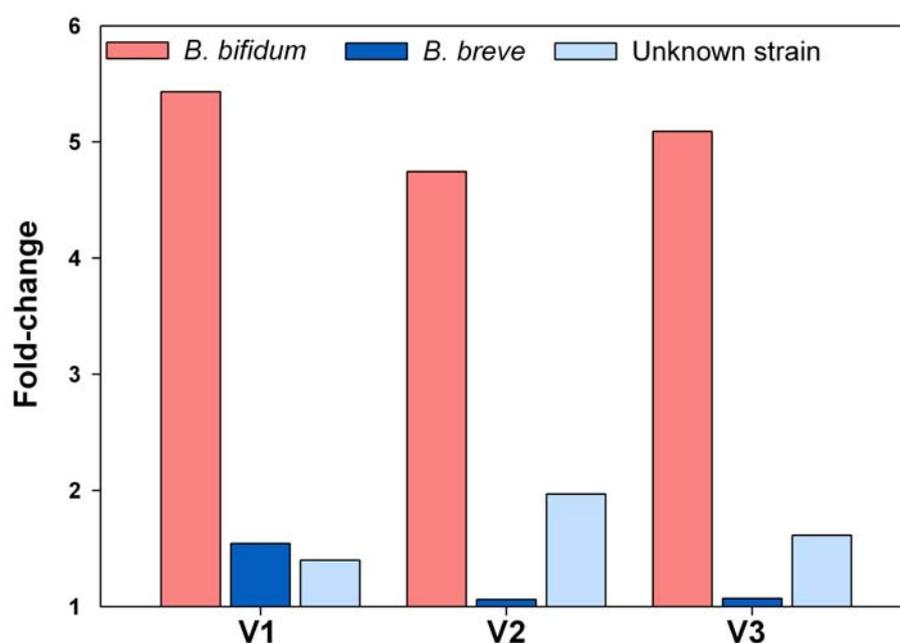
In Fig. 1.21 sono riportati i profili DGGE di campioni prelevati dal colon model prima e dopo somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07, ottenuti mediante impiego di primer specifici per il genere *Bifidobacterium*. Il pattern DGGE è stato confrontato con un sistema di riferimento esterno, rappresentato da un marker contenente le seguenti specie: *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum/B. angulatum*, *B. longum/B. infantis*, *B. gallicum/B. pseudolongum*, ed un sistema di riferimento interno (*B. breve*), amplificato insieme ai campioni (Fig. 1.21). Le 3 bande principali visibili in Fig. 1.21, A, B e C sono state identificate, rispettivamente, come *B. bifidum*, *B. breve* ed un ceppo unknown di *Bifidobacterium*; la banda D, che appare in seguito a trattamento, rappresenta presumibilmente il ceppo probiotico *B. lactis* BI07.



**Fig. 1.21.** Profili DGGE di campioni prelevati dal colon model prima e dopo somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07, ottenuti mediante impiego di primer specifici per il genere *Bifidobacterium*. L'analisi è stata effettuata per ogni vessel (V1, lane 1-6; V2, lane 7-12; V3, lane 13-18) in SS1 (day 12, 13, 14) e SS2 (day 22, 23, 24). M, sistema di riferimento esterno; R, sistema di riferimento interno.

Analogamente a quanto già riportato nel caso di trattamento solo con antibiotico, *B. bifidum* (banda A) è risultato il più abbondante in V1 e *B. breve* (banda B) il più abbondante in V2 e V3 prima della somministrazione di rifaximina e *B. lactis* BI07. Le variazioni nell'abbondanza relativa di *Bifidobacterium* in seguito a trattamento, sono state riportate come linear fold-change. Dopo somministrazione combinata di antibiotico e probiotico, la banda A è risultata incrementata di 5.4-, 4.7- e 5.1-fold, rispettivamente in V1, V2 e V3; la banda B di 1.5- e 1.1-fold, rispettivamente in V1 e V3 (non sono state riportate variazioni in V2); la banda C di 2.3-, 2.0- e 1.6-fold, rispettivamente in V1, V2 e V3 (Fig. 1.22). La banda D, apparsa nell'intero sistema fermentativo successivamente al trattamento, non ha mostrato significative variazioni nei valori di abbondanza tra i diversi vessel.

A conferma e verifica di quanto già evidenziato con le conte vitali in piastra e l'analisi FISH, la somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07, non ha determinato modificazioni drastiche nei valori di concentrazione di popolazioni batteriche, ma ha portato ad un significativo incremento di *Bifidobacterium* (in particolare *B. bifidum*) nel colon model. In particolare, i dati ottenuti mediante approccio DGGE, relativi ai cluster *C. coccoides* e *C. leptum*, a membri del genere *Roseburia*, a *L. longoviformis* e batteri strettamente correlati, sono coerenti con i risultati ottenuti mediante impiego della sonda Erec482 nell'analisi FISH. I membri del genere *Roseburia* e *L. longoviformis* sono batteri saccarolitici, produttori di butirrato, con potenziali effetti health-promoting. Inoltre, l'analisi DGGE con primer specifici per il genere *Bifidobacterium* ha evidenziato, successivamente al trattamento, la comparsa di una banda presumibilmente corrispondente al ceppo probiotico *B. lactis* BI07.



**Fig. 1.22.** Modificazioni nell'abbondanza batterica relativa di ceppi di *Bifidobacterium*, associate alla somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07. L'abbondanza batterica è stata calcolata come band-related surface, sulla base delle curve densitometriche ottenute mediante analisi con software FPQuest. Le variazioni sono riportate come linear fold-change per ciascuna banda in V1, V2, e V3.

## Analisi HPLC di acidi grassi volatili

### Trattamento con rifaximina

SCFA e acidi grassi a catena ramificata (BCFA) costituiscono i più importanti prodotti finali della fermentazione, ottenuti dal metabolismo microbico di carboidrati e amminoacidi. Al fine di indagare le relazioni tra variazioni nella composizione della microflora e modificazioni nei pattern metabolici, è stata effettuata un'analisi HPLC, mediante impiego di una colonna ion-exclusion ottimizzata per gli acidi organici così da consentire la detection di acido acetico, propionico, butirrico, valerico, lattico, e BCFA quali iso-butyrico e iso-valerico.

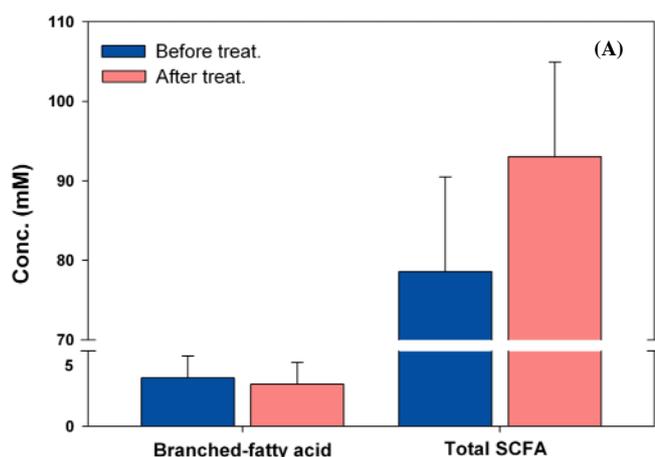
In Tab. 1.7 e Fig. 1.23 sono riportati i risultati dell'analisi HPLC effettuata prima e dopo trattamento con rifaximina. La somministrazione di antibiotico ha determinato un generale incremento nella concentrazione di SCFA totali ( $P = 0.024$ ) e, in particolare, di acido propionico ( $P = 0.002$ ) e valerico ( $P = 0.048$ ). Non sono state evidenziate variazioni significative nell'intero sistema fermentativo, relative ad acido acetico, butirrico e BCFA.

**Tab. 1.7.** Effetto di rifaximina sulla produzione di SCFA in SS1 e SS2.

SCFA	SS1			SS2		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
Acetate	15.5 (27.0) <sup>#</sup>	34.8 (41.6)	30.9 (36.6)	35.8 (46.0)	29.8 (34.0)	38.5 (33.9)
Propionate	7.7 (13.4)	10.8 (12.9)	16.5 (19.5)	14.5 (18.6)	18.4 (21.0)	22.4 (19.7)
Butyrate	31.6 (55.0)	23.5 (28.1)	30.9 (36.6)	20.5 (26.3)	29.0 (33.1)	37.9 (33.4)
Valerate	0.02 (0.03)	2.7 (3.2)	7.5 (8.9)	1.7 (2.2)	2.5 (2.8)	7.6 (6.7)
Iso-Butyrate	1.4	0.9	2.1	1.1	2.7	2.5
Iso-Valerate	1.4	2.7	4.7	1.5	1.9	4.6
Total	57.5	83.7	84.4	77.9	87.6	113.5

I risultati sono espressi come media dei valori di concentrazione (mM) ottenuti a 3 diversi tempi di campionamento in SS1 e SS2.

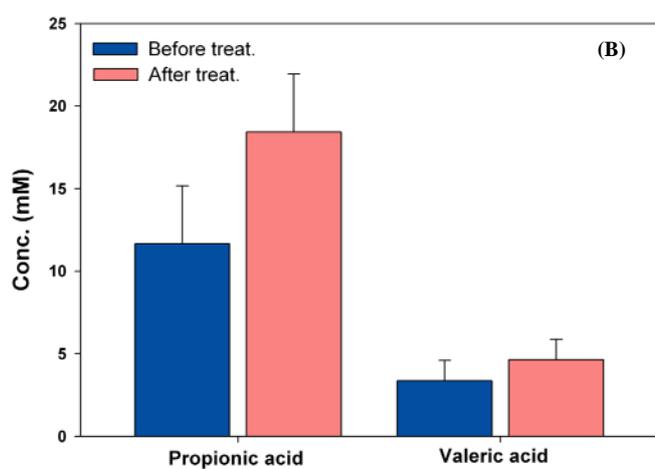
<sup>#</sup>, i valori in parentesi rappresentano i rapporti molari espressi come percentuale.



**Fig. 1.23.** Variazioni nei valori di concentrazione di acidi grassi volatili, associate al trattamento con rifaximina.

(A) Effetto di rifaximina su SCFA e BCFA

(B) Effetto di rifaximina su acido propionico e valerico. I risultati sono espressi come valori medi di concentrazione nell'intero sistema fermentativo ( $n = 9$ ,  $\pm$  RSD).



### Somministrazione combinata di rifaximina e probiotico *B. lactis* BI07

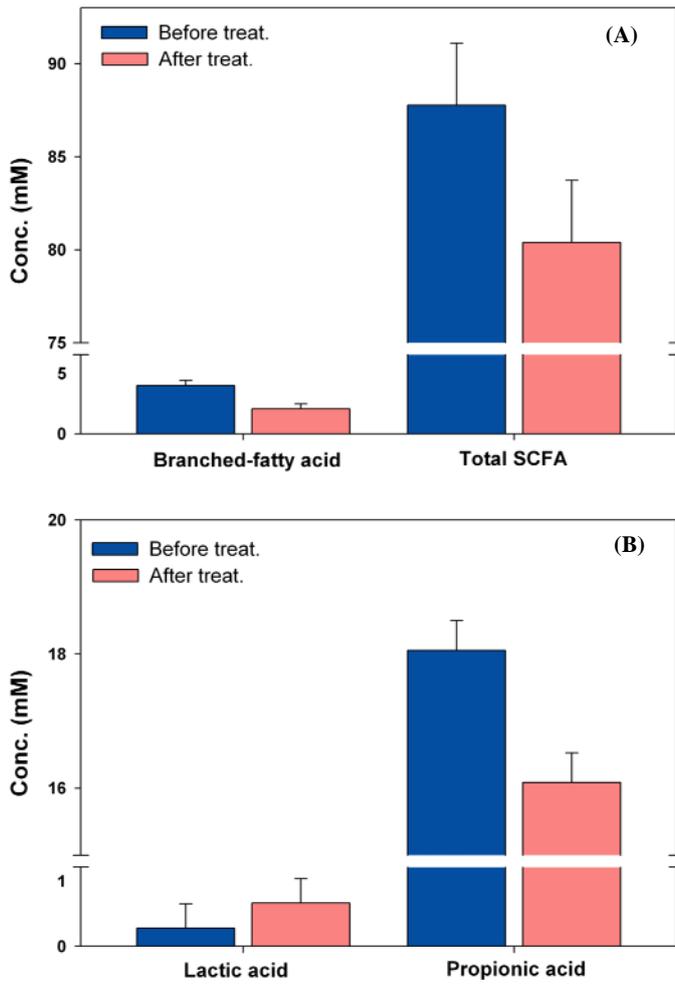
In Tab. 1.8 e Fig. 1.24 sono riportati i risultati dell'analisi HPLC effettuata prima e dopo somministrazione combinata di antibiotico e probiotico. Il trattamento ha determinato un generale decremento nella concentrazione di SCFA totali ( $P = 0.0005$ ) e BCFA ( $P < 0.0001$ ). In particolare, è stato osservato un calo nella concentrazione di acido propionico ( $P < 0.0001$ ) ed un incremento nei valori di acido lattico ( $P < 0.0001$ ). Non sono state evidenziate variazioni significative nell'intero sistema fermentativo, relative ad acido acetico, butirrico e valerico.

**Tab. 1.8.** Effetto della somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07 sulla produzione di SCFA in SS1 e SS2.

SCFA	SS1			SS2		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
Acetate	22.3 (29.8) <sup>#</sup>	27.1 (30.1)	32.8 (33.3)	22.5 (34.9)	27.3 (32.7)	29.7 (31.5)
Propionate	15.4 (20.6)	18.2 (20.2)	20.6 (20.9)	10.7 (16.6)	16.9 (20.3)	20.6 (21.8)
Butyrate	31.6 (42.2)	33.3 (37.0)	30.8 (31.3)	30.2 (46.9)	30.9 (37.0)	31.9 (33.8)
Valerate	1.3 (1.7)	5.4 (6.0)	6.1 (6.2)	0	5.2 (6.2)	5.8 (6.1)
Iso-Butyrate	1.7	2.3	3.5	0.2	0.7	2.6
Iso-Valerate	2.6	3.5	4.6	0.8	1.4	3.7
Total	74.8	89.9	98.5	64.4	83.4	94.4

I risultati sono espressi come media dei valori di concentrazione (mM) ottenuti a 3 diversi tempi di campionamento in SS1 e SS2.

<sup>#</sup>, i valori in parentesi rappresentano i rapporti molari espressi come percentuale.



**Fig. 1.24.** Variazioni nei valori di concentrazione di acidi grassi volatili, associate alla somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07. **(A)** Effetto del trattamento combinato di antibiotico e probiotico su SCFA e BCFA. **(B)** Effetto del trattamento combinato di antibiotico e probiotico su acido lattico e propionico. I risultati sono espressi come valori medi di concentrazione nell'intero sistema fermentativo (n = 9, ± RSD).

## Conclusioni

In questo studio è stato riportato l'impiego di un sistema fermentativo di coltura in continuo a 3 stadi, "the colon model", finalizzato a valutare l'impatto della somministrazione di rifaximina sulla microflora fecale di un soggetto sano, sia in termini di composizione batterica che di prodotti metabolici fermentativi. Rifaximina, antibiotico ad ampio spettro e basso assorbimento a livello della mucosa gastrointestinale, è un agente antibatterico particolarmente idoneo per il trattamento localizzato di disordini intestinali. Sono stati, inoltre, determinati per la prima volta in un modello *in vitro*, gli effetti sul microbiota intestinale associati alla somministrazione combinata di antibiotico e probiotico *B. lactis* BI07. Mediante analisi coltura-dipendente e tecniche molecolari coltura-indipendenti, quali FISH e PCR-DGGE, sono state valutate le principali variazioni a carico di determinati gruppi batterici, prima e dopo 10 giorni di trattamento. Modificazioni nei valori di concentrazione di SCFA e BCFA sono state analizzate mediante HPLC.

I dati riportati mostrano come il trattamento con rifaximina e la somministrazione combinata di antibiotico e probiotico non alterino drasticamente la composizione della microflora intestinale ma determinino un incremento significativo nella concentrazione di batteri appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, il che suggerisce una spontanea insorgenza di antibiotico resistenza. I risultati ottenuti sono in accordo con lo studio di Brigidi *et al.* (2002), in cui vengono riportate solo variazioni minori a carico della microflora intestinale in pazienti affetti da UC e trattati con rifaximina, e viene evidenziata un'alta frequenza di isolamento di mutanti di *Bifidobacterium* resistenti a rifaximina durante il trattamento e la loro scomparsa in wash-out parallelamente al ripristino della composizione del microbiota intestinale di ciascun individuo.

Inoltre, la somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07 ha determinato un incremento significativo nell'abbondanza di microrganismi con proprietà health-promoting quali *Atopobium* spp. e batteri appartenenti a *E. rectale*/*Clostridium* cluster XIVa.

L'assenza di modificazioni drastiche nella microflora intestinale, e l'incremento significativo nelle concentrazioni di batteri probiotici e health-promoting, dimostrano l'incapacità di rifaximina di promuovere disbiosi microbica in soggetti sani, e suggeriscono l'efficacia di una formulazione combinata di antibiotico e probiotico nel trattamento di disordini relativi al tratto gastrointestinale umano. Ulteriori studi *in vitro* sono, comunque, necessari al fine di valutare l'impatto di antibiotico e probiotico sul microbiota intestinale di pazienti affetti da patologie quali IBD.

## Capitolo 2

### **Caratterizzazione genetica e proteomica della resistenza a rifaximina in *B. lactis* BI07**

Vitali B, Turrone S, Dal Piaz F, Candela M, Wasinger V, Brigidi P (2007)  
Genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07.  
*Res Microbiol* 158, 355-362.  
Appendice 1

## Introduzione

Al fine di validare l'impiego di una formulazione combinata di rifaximina e probiotici nel trattamento di disordini a livello del tratto gastrointestinale umano, appare di fondamentale importanza chiarire i meccanismi molecolari alla base della resistenza all'antibiotico. In questo studio è riportata l'analisi molecolare della resistenza a rifaximina in *B. lactis* BI07. Sono stati selezionati mutanti spontanei di *Bifidobacterium* resistenti a 100 µg/ml di rifaximina, ed è stata valutata la stabilità del fenotipo antibiotico resistenza.

La caratterizzazione genetica e proteomica della resistenza a rifaximina è stata condotta nel ceppo modello *B. lactis* BI07. Sulla base delle informazioni disponibili in letteratura, che riportano come la resistenza all'analogo strutturale rifampicina in mutanti di *E. coli* e *M. tuberculosis* sia mediata da mutazioni nel gene codificante per la subunità beta della RNA polimerasi batterica, è stata determinata la sequenza del gene *rpoB* nel mutante resistente di *B. lactis* BI07. La combinazione di elettroforesi bidimensionale (2DE) e spettrometria di massa MALDI-TOF ha consentito la determinazione dei cambiamenti metabolici correlati all'acquisizione della resistenza a rifaximina. E' stata inoltre verificata l'ipotesi di inattivazione del farmaco per modificazione strutturale e/o degradazione del drug moiety.

## Proteomica

Il termine proteoma, coniato da Wilkins *et al.* (1997), indica l'insieme dei prodotti proteici espressi da un genoma. Si tratta di un'entità di notevoli dimensioni (sulla base di splicing differenziale dell'mRNA e modificazioni post-traduzionali, si stima che circa 1000000 proteine costituiscano il proteoma umano) e altamente dinamica, variabile in relazione a stadio di sviluppo, localizzazione tissutale e condizioni ambientali.

Obiettivo della proteomica è la precisa definizione delle funzioni di ogni proteina all'interno della cellula e l'analisi delle variazioni nei profili proteici, associate a stimoli di natura diversa.

## Proteoma e mappe 2D

### Elettroforesi bidimensionale

Al contrario di metodi separativi monodimensionali, quali isoelettrofocalizzazione (IEF), SDS-PAGE, e isotacoforesi, che difficilmente riescono a risolvere più di un centinaio di componenti in una miscela complessa ed eterogenea, l'elettroforesi bidimensionale (2DE), basandosi sulla combinazione di IEF (separazione in base alla carica) e SDS-PAGE (separazione in base al peso molecolare), consente di ottenere una distribuzione randomizzata di centinaia di proteine in un'unica mappa bidimensionale.

Kenrick e Margolis (1970) per la prima volta combinarono le separazioni monodimensionali IEF e SDS-PAGE a gradiente di porosità per separare le proteine del siero, e arrivarono alla conclusione che 2DE ha utili applicazioni nel tipizzare polimorfismi genetici, nel valutare l'eterogeneità proteica e nella risoluzione di miscele complesse. Nel 1975 O'Farrell dimostrò di poter risolvere 1100 proteine diverse da lisati di *E. coli* in una mappa 2D.

Anche se la forza dell'elettroforesi bidimensionale, come tecnica biochimica di separazione, è stata riconosciuta fin dalla sua introduzione, l'applicazione è divenuta significativa solo negli ultimi anni in conseguenza dei seguenti progressi: (i) introduzione di gradienti di pH immobilizzati che consentono di ottenere maggior risoluzione e riproducibilità (Görg *et al.*, 1988); (ii) nuove tecniche di spettrometria di massa, che permettono l'identificazione e la caratterizzazione di peptidi e proteine estratte da spot 2D; (iii) nuovi supporti informatici per l'analisi d'immagine, e database per l'interpretazione dei pattern proteici.

### **Preparazione del campione**

L'estrema diversità in tipologia e provenienza dei campioni, rende possibile fornire solo linee guida generali mentre la procedura ottimale di preparazione deve esser determinata empiricamente. Per l'analisi di proteine intracellulari, il metodo di rottura delle cellule dipende strettamente dalla loro provenienza (lisi osmotica per colture tissutali e cellule ematiche, lisi enzimatica, sonicazione od omogenizzazione con palline di vetro per microrganismi). Particolarmente critica è la composizione della soluzione di lisi che prevede l'impiego di agenti caotropici, surfattanti, e riducenti. I primi, come urea e tiourea, permettono alle proteine di destrutturarsi ed esporre il loro core idrofobico mediante modifica della struttura dei legami a idrogeno in soluzione, riduzione della costante dielettrica del solvente e del deficit energetico determinato dal contatto tra residui idrofobici in soluzione. Agenti surfattanti non-ionici o zwitterionici solubilizzano i residui idrofobici esposti; il più utilizzato è CHAPS (3-[(3-cholamidopropil) dimetilammonio]-1-propansulfonato). L'impiego di agenti riducenti determina la rottura completa di legami disolfuro intra- e inter-catena. Si usano generalmente composti con un gruppo tiolico libero, come DTT (ditiotreitolo) e  $\beta$ -mercaptoetanolo (Rabilloud, 1996). Tuttavia, tali reagenti, in quanto carichi, migrano al di fuori del gradiente di pH durante IEF, con conseguente perdita di solubilità di alcune proteine. La tributyl fosfina (TBP), agente riducente non carico che riduce le proteine con reazione stechiometrica a completamento e non all'equilibrio come DTT, incrementa la solubilità proteica e migliora il trasferimento alla seconda dimensione (Herbert *et al.*, 1998).

La presenza di acidi nucleici influenza negativamente la separazione proteica in IEF; i complessi di DNA, dissociati in condizioni denaturanti, aumentano la viscosità della soluzione con inibizione dell'ingresso delle proteine nel gel e rallentamento della loro migrazione, e possono legarsi alle proteine stesse generando streaking nella mappa 2D (Rabilloud, 1996). Lavorare a pH basici, dove la carica negativa delle proteine respinge gli acidi nucleici, od utilizzare anfiliti trasportatori, capaci di complessare gli acidi nucleici stessi, può consentire la risoluzione del problema. Altre impurità non proteiche in grado di interferire con la separazione e la successiva visualizzazione degli spot comprendono sali, responsabili principalmente dell'insufficiente focusing degli spot, lipidi, che legano le proteine modificandone pI e Mr, e polisaccaridi, che possono ostruire i pori del gel. Non è da sottovalutare l'eventuale presenza di proteasi in soluzione, disattivabili lavorando a pH non ottimali per la loro attività o tramite l'uso di inibitori naturali o sintetici.

**Prima dimensione:****Isoelettrofocalizzazione in gradiente di pH immobilizzato (IEF-IPG)**

Le proteine sono molecole anfotere, la cui carica netta è determinata dalla somma delle cariche parziali delle catene laterali degli amminoacidi che ne costituiscono la struttura, e dalla loro disposizione tridimensionale. La presenza di carica o la neutralità di gruppi amminici e carbossilici dipende strettamente dal pH dell'ambiente (Westermeyer, 1993). Esprimendo graficamente la variazione della carica netta di una proteina in funzione della variazione di pH dell'ambiente si ottiene una curva, caratteristica per ogni proteina, che interseca l'asse delle ascisse ad un determinato valore di pH. Il punto di intersezione viene definito punto isoelettrico (pI), e in sua corrispondenza la carica netta è pari a zero.

L'isoelettrofocalizzazione in gradiente di pH è una tecnica elettroforetica che consente la risoluzione di una miscela di proteine in funzione del loro pI. La separazione avviene su un gradiente di pH immobilizzato in una matrice poliacrilammidica, ai cui estremi viene applicato un campo elettrico: l'elettrodo carico positivamente (anodo) è a contatto con l'estremità acida del gradiente di pH, mentre l'elettrodo carico negativamente (catodo) è a contatto con quella alcalina. Le proteine della miscela, diversamente cariche, migrano per azione del campo elettrico verso il loro pI, a livello del quale si annullano carica netta e mobilità con conseguente focalizzazione sulla matrice poliacrilammidica. Il focusing delle proteine, in opposizione alla diffusione delle stesse, è direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione proteica in una determinata zona; per ogni proteina viene raggiunto uno stato stazionario in cui il trasporto elettrocinetico in una regione del gel è esattamente in equilibrio con la diffusione al di fuori di tale regione.

Sperimentalmente la strip viene reidratata con la soluzione contenente il campione, il che permette di caricare sulla matrice un maggior quantitativo di campione, di evitare di localizzare l'applicazione della soluzione, e ridurre la formazione di addotti proteici che potrebbero precipitare con perdita del materiale. Successivamente, le strip vengono equilibrate prima di essere interfacciate con il gel di poliacrilammide, al fine di garantire un buon trasferimento delle proteine ed evitare la diffusione del campione nella soluzione. L'equilibrating buffer contiene solitamente urea, SDS, glicerolo e Tris. Urea e glicerolo riducono l'effetto elettroosmotico determinato dalla ionizzazione dell'acqua, e aumentano la solubilità delle proteine; il Tris mantiene il pH della strip ad un valore appropriato per la corsa nella seconda dimensione (pH 8.8), mentre l' SDS complessa le molecole proteiche rendendone uniforme la carica per consentire la separazione in funzione della massa molecolare.

**Seconda dimensione:****SDS-PAGE**

Il principio separativo della seconda dimensione si basa sulla capacità del detergente anionico SDS di legarsi alle proteine e mascherarne la carica intrinseca così che possano assumere tutte la stessa densità di carica e mobilità elettroforetica in fase libera. L' SDS si lega secondo un rapporto costante, che corrisponde a circa 1.4 g di SDS per g di proteina (Pitt-Rivers e Impiombato, 1968).

La configurazione normalmente adottata per le corse elettroforetiche bidimensionali prevede il gel in posizione verticale con spessore e dimensioni variabili.

## Visualizzazione dei risultati

La visualizzazione delle proteine su una mappa 2D si basa sulla diversa reattività chimica di proteine e gel di poliacrilammide nei confronti di una molecola colorante, di un fluoroforo o di un amminoacido radioattivo (Miller *et al.*, 2006).

I metodi di detection devono consentire alta sensibilità, ampio range lineare per la successiva quantificazione degli spot, bassa tossicità e sicurezza per l'ambiente. Inoltre, devono essere chimicamente compatibili con la tecnica post-separativa di caratterizzazione proteica, quale spettrometria di massa e sequenziamento di Edman. I metodi più utilizzati per la visualizzazione degli spot di un gel 2D sono: autoradiografia e fluorografia (metodi di detection in assoluto più sensibili, fino a 200 fg di proteina), colorazione silver (il più sensibile tra i metodi non radioattivi, al di sotto di 1 ng) e colorazione Coomassie (da 50 a 100 volte meno sensibile del precedente ma relativamente semplice e quantitativo).

La colorazione degli spot può essere determinata dal legame non covalente di un colorante organico o mediante riduzione di uno ione metallico. Nel primo caso, il gel saturato con la soluzione di colorante viene poi decolorato (colorazione regressiva). Brilliant Blue G e R (Coomassie Blue) sono i coloranti più utilizzati per l'elevato coefficiente di estinzione e l'alta affinità per le proteine. Tuttavia, la colorazione regressiva, per quanto abbastanza uniforme, presenta una bassa riproducibilità. Neuhoff *et al.* (1988) hanno sviluppato un approccio progressivo basato su una colorazione di tipo colloidale, che comporta la formazione di microprecipitati esclusi dal gel di poliacrilammide in un mezzo acido contenente ammonio solfato. La concentrazione di colorante libero è molto bassa, il che riduce la colorazione di background, ma sufficiente per poter occupare tutti i siti di legame delle proteine. Nonostante i tempi di colorazione decisamente lunghi, tali da consentire il raggiungimento dello stato stazionario, il metodo garantisce buona riproducibilità e sensibilità per la presenza di ammonio solfato che aumenta la forza delle interazioni idrofobiche, rendendo possibile un limite di detection di circa 100 ng. Nel secondo caso, l'affinità delle proteine per il catione argento, ed il potere autocatalitico di riduzione dello ione metallico rendono la colorazione silver estremamente sensibile. La riduzione è consentita da una soluzione diluita di formaldeide (developer) e da una aldeide (sensitizer). Il sensitizer si lega alle proteine, reagisce con esse, e lega l'argento, avviando così la riduzione. L'impiego di aldeidi preclude tuttavia ogni successiva analisi sulle proteine, il che ha determinato lo sviluppo di diversi protocolli, in termini di sensibilità, riproducibilità, e compatibilità con tecniche di analisi post-separative.

## Software per l'analisi di gel bidimensionali

PDQuest (Bio-Rad) è sicuramente uno dei programmi più utilizzati, per l'allineamento ed il confronto di gel 2D. Il software consente la determinazione degli spot mediante un processo multistep, nel corso del quale l'immagine viene processata ed i centri delle macchie marcati in accordo coi parametri selezionati. Segue la creazione di match-set, meccanismo utilizzato dal PDQuest per effettuare analisi qualitative e quantitative.

## Analisi con spettrometria di massa

Una volta ottenuta la separazione, lo spot può essere exciso da gel e sottoposto ad estrazione della proteina intera, o digestione *in situ* con tripsina, enzima proteolitico comunemente utilizzato che taglia all'estremità C-terminale di Arg e Lys, con successiva estrazione dei peptidi e analisi MS.

Uno spettrometro di massa consiste in una sorgente ionica, un analizzatore di massa che misura il rapporto massa/carica ( $m/z$ ) degli analiti ionizzati, ed un rivelatore che registra il numero di ioni corrispondenti a ciascun valore di  $m/z$ . Electrospray ionization (ESI) e matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) costituiscono le due tecniche più comunemente utilizzate per volatilizzare e ionizzare proteine o peptidi, ed è stata proprio la loro introduzione, alla fine degli anni ottanta, che ha esteso l'uso della spettrometria di massa ad applicazioni di tipo biologico e biotecnologico (Karas *et al.*, 1988). La possibilità di ottenere una ionizzazione non distruttiva ha consentito l'analisi di macromolecole proteiche, fornendo una misura accurata della loro massa molecolare (Mr). Questo parametro rappresenta un elemento essenziale per l'identificazione proteica, e la sua determinazione costituisce il primo step per la conferma di sequenze peptidiche, per la ricerca di mutazioni, modifiche post-traduzionali, ossidazioni o deammidazioni, e per l'analisi di complessi molecolari.

La letteratura esistente (Patterson e Aebersold, 1995; Andersen *et al.*, 1996; Gooley e Packer, 1997) indica come la ionizzazione MALDI, che sublima mediante laser i campioni da una matrice cristallina disidratata, sia più tollerante nei confronti di impurezze, tamponi e componenti meno volatili presenti nella soluzione. La tecnica consente inoltre di analizzare miscele complesse di proteine, poiché genera spettri di facile interpretazione, dominati normalmente da specie a singola carica. Al contrario, in ESI Mr si ricava dalla deconvoluzione di picchi corrispondenti ad un'ampia distribuzione di specie cariche. La tecnica MALDI permette di analizzare un intervallo di Mr più ampio (fino a 400 kDa) rispetto alla tecnica ESI (fino a 130 kDa) ma, a differenza di questa, non può essere collegata direttamente a tecniche separative, quali elettroforesi capillare o cromatografia liquida.

L'analizzatore di massa è il cuore della tecnologia; i parametri chiave sono sensibilità, risoluzione, accuratezza, e capacità di generare spettri di massa ricchi di informazioni da frammenti peptidici (spettri MS/MS). Gli analizzatori di massa attualmente in uso nella ricerca proteomica sono: (i) ion trap, in cui gli ioni sono dapprima catturati e solo successivamente sottoposti ad analisi MS o MS/MS; (ii) time of flight (TOF) basato sul semplice principio per cui, fissata la distanza tra sorgente e rivelatore, il tempo impiegato da uno ione per raggiungere il rivelatore risulta direttamente proporzionale alla radice quadrata della massa dello ione stesso; (iii) quadrupole con tempi di risposta rapidissimi ma peggiore risoluzione, solitamente collegato ad HPLC o gas-cromatografia; (iv) Fourier transform ion cyclotron (FT-MS) analyser, in cui gli ioni vengono catturati sotto vuoto spinto in presenza di un forte campo magnetico. Questi analizzatori sono differenti in design e performance, e possono essere impiegati singolarmente o posti in tandem.

In spettrometria di massa MALDI-TOF, il campione viene miscelato ad un ugual volume di matrice (acido sinapinico o  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnammico) e lasciato cocristallizzare con essa. La miscela cristallizzata analita/matrice viene colpita da un raggio pulsante di fotoni UV o IR la cui energia, in massima parte, viene assorbita dalle molecole della matrice, determinando un'eccitazione elettronica e vibrazionale, parte della quale si trasferisce alle molecole di analita. La matrice contribuisce, inoltre, alla ionizzazione del campione attraverso scambio di protoni e

diminuisce le forze inter-molecolari tra le molecole di analita. Gli ioni desorbiti vengono successivamente estratti, focalizzati e accelerati verso il rivelatore.

La tecnica LC-MS/MS prevede la separazione dei frammenti peptidici in uno o più step di HPLC e l'analisi con spettrometria di massa ESI Q-TOF. La soluzione del campione viene finemente nebulizzata in goccioline cariche, in un capillare sottoposto ad elevato potenziale elettrico. Gli ioni dell'analita vengono volatilizzati per evaporazione del solvente e, attraverso un sistema di trasferimento ionico, raggiungono l'analizzatore di massa. La collisione degli ioni peptidici con gas inerte consente la generazione di spettri di frammentazione ionica [collision-induced (CID) spectra] di precursori selezionati. L'analisi degli spettri fornisce informazioni relative alla sequenza amminoacidica dei frammenti peptidici della proteina.

### **Identificazione di proteine attraverso l'interrogazione di banche dati**

Per poter identificare le proteine, è necessario definire uno o più attributi intrinseci della proteina in esame, con i quali verrà poi effettuata la ricerca in banca dati. Tali attributi, primari o secondari, sono in maggior parte correlati, direttamente o indirettamente, alla struttura primaria della proteina e si differenziano a seconda che interessino la molecola proteica nella sua interezza o frammenti derivanti da essa. Gli attributi primari comprendono specie d'origine, pI, massa apparente (derivata dall'analisi d'immagine dei gel), massa reale (ottenuta mediante spettrometria di massa MALDI-TOF), e sequenza proteica all'N- e al C-terminale; gli attributi secondari, invece, sono rappresentati da fingerprinting di masse peptidiche, dati di frammentazione peptidica e sequenziamento con spettrometria di massa, e composizione amminoacidica. Numerosi sono i programmi disponibili in rete per la caratterizzazione e l'identificazione di proteine, classificati sulla base degli attributi utilizzati per l'interrogazione di database: (i) massa molecolare di proteine intatte, PeptideSearch, TagIdent; (ii) fingerprinting di masse peptidiche, MassSearch, MS-Fit, PeptideSearch, ProFound; (iii) composizione amminoacidica, AACompident, PropSearch; (iv) composizione amminoacidica, tag di sequenze proteiche e fingerprinting di masse peptidiche, MultiIdent.

In caso di fingerprinting di masse peptidiche, i valori delle masse misurate, generalmente compresi tra 600 e 3000 Da, vengono confrontati con quelli di masse teoriche di proteine presenti in banca dati. L'outcome è una lista di proteine classificate sulla base del numero di peptidi condivisi con la proteina incognita.

La proteomica trova applicazioni in numerosi campi quali comprensione di patologie, sviluppo di nuovi composti dotati di attività terapeutica, e caratterizzazione di microrganismi.

Fondamentale è delineare i pattern di espressione proteica alterata, non solo a livello cellulare o tissutale ma anche in strutture subcellulari, in complessi proteici e in fluidi biologici, per poter sviluppare biomarker che consentano diagnosi e individuazione di patologie ad uno stadio precoce.

Il completo sequenziamento di un certo numero di genomi microbici ha fornito le basi per poter identificare le proteine codificate. Gli studi proteomici nel settore microbiologico comprendono: (i) caratterizzazione di proteomi submicrobiali (proteine secrete, proteine di superficie o immunogene) (Thomas *et al.*, 2006; Mujahid *et al.*, 2007); (ii) analisi comparativa di diversi ceppi (Caesar *et al.*, 2007; Encheva *et al.*, 2007); (iii) analisi comparativa in differenti condizioni ambientali (Sánchez *et al.*, 2005, 2007a, 2007b); (iv) identificazione di proteine correlate a patogenicità (Francois *et al.*,

2007; Callister *et al.*, 2008); (v) identificazione di proteine coinvolte nell'interazione con l'ospite (Wasinger *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2007); (vi) valutazione dei meccanismi d'azione di composti antimicrobici (Cordwell *et al.*, 2002; Bandow *et al.*, 2003; Bandow e Hecker, 2007).

Nonostante i recenti progressi compiuti nella tecnologia 2DE, quali sviluppo di un metodo fluorescente a due colori per uno screening differenziale dell'espressione proteica (DIGE), e di zoom gel che offrono maggiore sensibilità e potere di risoluzione, questa strategia mostra limitazioni intrinseche nel caso in cui si voglia effettuare un'analisi globale e sistematica del proteoma di un organismo. Utilizzando il proteoma di lievito come sistema modello, Gygi *et al.* (2000) hanno dimostrato che, persino in condizioni di massimo caricamento del campione ed estesa separazione elettroforetica, proteine non particolarmente abbondanti, rappresentanti circa la metà del proteoma di lievito, non sono rivelabili. Sono state, quindi, sviluppate metodologie alternative tra cui multidimensional protein identification technology (MudPIT), che prevede la separazione dei peptidi sulla base di carica elettrostatica e idrofobicità, e stable-isotope labeling che consente l'analisi quantitativa dell'abbondanza proteica, mediante marcatura selettiva, e fornisce informazioni sulla struttura delle proteine tramite l'uso di reagenti cross-linking.

## Materiali e metodi

### Ceppi batterici e condizioni di coltura

In Tab. 2.1 sono riportati i ceppi di *Bifidobacterium* utilizzati in questo studio. *B. lactis* BI07, *B. breve* BBSF e *B. longum* BL04 sono componenti della formulazione probiotica VSL#3 (VSL Pharmaceuticals). Tutti i bifidobatteri sono stati cresciuti in anaerobiosi in terreno MRS (Difco) addizionato dello 0.05% di L-cisteina HCl, a 37°C per 18-36 h. Le condizioni anaerobiche sono state ottenute mediante impiego di Anaerocult A (Merck).

### Selezione di mutanti spontanei resistenti a rifaximina

Mediante agar dilution method (National Committee for Clinical Laboratory Standards), è stata determinata la MIC di rifaximina nei confronti dei ceppi di *Bifidobacterium* riportati in Tab. 2.1. Per preparare piastre di MRS con concentrazioni scalari di antibiotico (0.031-32 µg/ml), è stata utilizzata una stock solution di rifaximina (Alfa Wassermann), 10 mg/ml in metanolo.

Mutanti spontanei, resistenti a 100 µg/ml di antibiotico, sono stati selezionati come descritto da Marchese *et al.* (2000). La stabilità del fenotipo resistente è stata verificata effettuando step sequenziali di coltura dei cloni resistenti in assenza di pressione selettiva, e determinando il numero di colonie in piastre di MRS con e senza rifaximina dopo 100, 200, 300 e 400 generazioni batteriche.

### Determinazione della sequenza del gene *rpoB*

Il DNA genomico è stato isolato da *B. lactis* BI07 wild-type (BI07-wt) e dal mutante resistente a rifaximina (BI07-res) mediante DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN), e utilizzato come template

per amplificare un core segment di 410 bp all'interno del gene *rpoB*. I primer *rpoB*-L (5'-CCAGGTCGGCGAGCTGAT-3') e *rpoB*-R (5'-TACGGGGTCTCGATGAAGC-3') sono stati progettati modificando i primer TR1 e TR2b di Telenti *et al.* (1993) sulla base della sequenza del gene *rpoB* di *B. longum* NCC2705 (Schell *et al.*, 2002). Le reazioni di amplificazione sono state condotte in Biometra Thermal Cycler T Gradient (Biometra), con Dynazyme II (Celbio) come DNA polimerasi termostabile. Oligonucleotidi e prodotti di PCR sono stati forniti da M-Medical.

Entrambi gli strand di DNA dei frammenti amplificati sono stati sequenziati mediante impiego del set di primer *rpoB*-L/*rpoB*-R. Le sequenze ottenute, comprendenti i codoni 508-550 secondo il sistema di numerazione descritto da Telenti *et al.* (1993), sono state depositate in DDBJ database con accession number AB198734 e AB198735, rispettivamente per BI07-wt e BI07-res. La ricerca di eventuali mutazioni nel gene *rpoB* di *B. lactis* BI07 resistente a rifaximina è stata effettuata mediante Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994).

## Analisi proteomica

L'analisi proteomica è stata effettuata per BI07-wt cresciuto in MRS, e BI07-res cresciuto sia in assenza di pressione selettiva che in MRS addizionato di 100 µg/ml di rifaximina. Campioni di brodo colturale, prelevati in fase di crescita logaritmica (5 h dall'inoculo) e stazionaria (24 h dall'inoculo), sono stati centrifugati a 9000 *g* per 5 min a 4°C. I pellet cellulari (20 mg), lavati con 1 ml di low salt washing buffer (KCl 3 mM, NaCl 68 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9 mM), sono stati risospesi in lysis solution [DTT 0.11 M, CHAPS 0.11 M, urea 8 M, tiourea 2 M, Tris 35 mM, e Complete Protease Inhibitor (Roche Molecular Biochemicals)]. La lisi cellulare è stata effettuata mediante cell shearing method come riportato da Vitali *et al.* (2005). Le proteine totali estratte sono state solubilizzate in IEF solution [urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, 2-mercaptoetanololo 0.005% (v/v)] e quantificate mediante PlusOne 2D Quant Kit (GE Healthcare). Per la prima dimensione, sono state utilizzate Immobiline DryStrip da 13 cm, con gradiente lineare pH 4-7 (GE Healthcare), e 100 µg di campione sono stati applicati mediante in gel rehydration (12 h) in una soluzione contenente urea 8 M, CHAPS 2%, DTT 10 mM, ampholine 2% (v/v), pH 4.0-6.5 (GE Healthcare), e bromophenol blue 0.8%. IEF è stata condotta in IPGphor (GE Healthcare) per un totale di 19 kVh. Le IPG strip sono state ridotte ed alchilate (Görg *et al.*, 1988), e successivamente caricate su gel di poliacrilammide al 15% (20 cm x 20 cm x 1 mm). La corsa elettroforetica è stata effettuata a 250 V per 7 h in Protean II xi Cell (Bio-Rad). Gli spot sono stati visualizzati mediante colorazione silver compatibile con tecniche di spettrometria di massa (Shevchenko *et al.*, 1996) o Coomassie colloidale G250. Le immagini dei gel, ottenute con GS-800 imaging densitometer (Bio-Rad), sono state analizzate mediante software PDQuest v. 6.2 (Bio-Rad). Per ciascun clone e condizione di crescita sono state ottenute 5 mappe 2D. La selezione degli spot con variazioni significative nei livelli di espressione (> 3-fold) è stata effettuata mediante Student's *t* test ( $P < 0.05$ ). Gli spot proteici di interesse sono stati excisi da gel e sottoposti a digestione triptica e successiva estrazione dei peptidi (Shevchenko *et al.*, 1996). I fingerprinting di massa dei peptidi estratti e purificati con ZipTip (Millipore), sono stati generati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, con Voyager-DE Pro Biospectrometry work station (Applied Biosystems). Tutti gli spettri sono stati ottenuti in modalità reflectron, con accelerating voltage pari a 20 kV e delayed extraction di 40 ns, e calibrati sulla base dei peptidi derivanti dall'autoproteolisi della tripsina. Per l'identificazione delle proteine, le masse peptidiche determinate sperimentalmente sono state confrontate, mediante ProFound

program (<http://129.85.19.192/index.html>) con le masse teoriche disponibili in NCBI non-redundant protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sono stati considerati solo protein hit con almeno 3 matching peptide.

L'identificazione, ottenuta mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, è stata verificata per 4 proteine con LC-MS/MS. Il sistema HPLC utilizzato consiste di CapLC capillary HPLC (Waters Corporation). La separazione cromatografica è stata effettuata su colonna C<sub>18</sub> Vydac (100 mm x 0.3 mm) (Dionex Corporation), con flow rate pari a 300 nl/min. I peptidi sono stati eluiti con gradiente lineare (40 min) da 10% (v/v) di solvente A [acido formico 2% (v/v) e acido trifluoroacetico 0.1% (v/v)] a 60% (v/v) di solvente B [acetonitrile contenente acido formico 2% (v/v) e acido trifluoroacetico 0.1% (v/v)]. Gli spettri di massa sono stati ottenuti con Q-TOF micro (Micromass, Waters) con sorgente nanospray; le acquisizioni sono state effettuate in modalità positive e nel range  $m/z$  400-1800. Il sequenziamento peptidico degli ioni più intensi (data dependent scan) è stato ottenuto nel range  $m/z$  200-1800 mediante software Masslynx (Waters).

## **Analisi MS di modificazioni strutturali di rifaximina**

In spettrometria di massa sono state analizzate eventuali modificazione del drug moiety indotte da attività enzimatiche dei batteri resistenti. Campioni di brodo colturale, prelevati in fase di crescita esponenziale e stazionaria, sono stati centrifugati a 9000 g per 5 min. I pellet cellulari sono stati trattati con lysis buffer [Tris/HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, TritonX-100 1.2% (v/v), lisozima 20 mg/ml] a 37°C per 30 min. Rifaximina è stata estratta dal surnatante colturale e dal lisato cellulare mediante aggiunta di un ugual volume di acetato di etile (Sigma-Aldrich), e sottoposta ad analisi LC-MS/MS. Il sistema HPLC utilizzato consiste di System Gold (Beckman Coulter), con microflow binary pump. La separazione cromatografica è stata ottenuta su colonna C<sub>18</sub> Jupiter (250 mm x 2.1 mm) (Phenomenex) e l'eluizione è stata effettuata a 0.2 ml/min con gradiente lineare (20 min) da 40% (v/v) di solvente A [acido trifluoroacetico 0.1% (v/v)] a 80% (v/v) di solvente B [acetonitrile contenente acido trifluoroacetico 0.1% (v/v)]. Gli spettri di massa sono stati ottenuti con Q-TOF micro (Micromass, Waters), e le acquisizioni sono state effettuate in modalità positive e nel range  $m/z$  400-1800. Per ottenere un'identificazione certa ed una caratterizzazione completa di rifaximina, sono stati acquisiti anche spettri tandem MS, in dependent scan mode.

## **Risultati**

### **Sviluppo di resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium***

L'attività antibatterica di rifaximina è stata determinata nei confronti di specie di *Bifidobacterium* rappresentative a livello intestinale (*B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentis* e *B. bifidum*), e per 3 bifidobatteri componenti della formulazione probiotica VSL#3 (*B. lactis* BI07, *B. breve* BBSF, *B. longum* BL04). Tutti i ceppi di *Bifidobacterium* analizzati sono risultati sensibili all'antibiotico, come evidenziato dai valori di MIC compresi tra < 0.0625 e 0.5 µg/ml (Tab. 2.1).

L'insorgenza di resistenza a rifaximina è stata valutata in esperimenti *in vitro*, selezionando mutanti spontanei resistenti in piastre di MRS contenenti concentrazioni crescenti del farmaco. Il

fenotipo antibiotico resistenza è stato facilmente acquisito da tutti i bifidobatteri analizzati. Per ciascun ceppo batterico è stato selezionato un mutante resistente a 100 µg/ml di rifaximina. La persistenza del fenotipo resistente per più di 400 generazioni batteriche in assenza di pressione selettiva, ha dimostrato la stabilità della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*.

**Tab. 2.1.** MIC di rifaximina nei confronti dei ceppi di *Bifidobacterium* utilizzati in questo studio.

Strain <sup>a</sup>	MIC (µg/ml)
<i>B. infantis</i> ATCC 15697 <sup>T</sup>	0.25
<i>B. breve</i> ATCC 15700 <sup>T</sup>	0.5
<i>B. longum</i> ATCC 15707 <sup>T</sup>	0.125
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521 <sup>T</sup>	0.25
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 <sup>T</sup>	0.5
<i>B. lactis</i> BI07	0.5
<i>B. breve</i> BBSF	<0.0625
<i>B. longum</i> BL04	0.5

<sup>a</sup>ATCC, American Type Culture Collection; <sup>T</sup>Type strain; *B. lactis* BI07, *B. breve* BBSF e *B. longum* BL04 sono componenti della formulazione probiotica VSL#3.

### Analisi del gene *rpoB* in *B. lactis* BI07

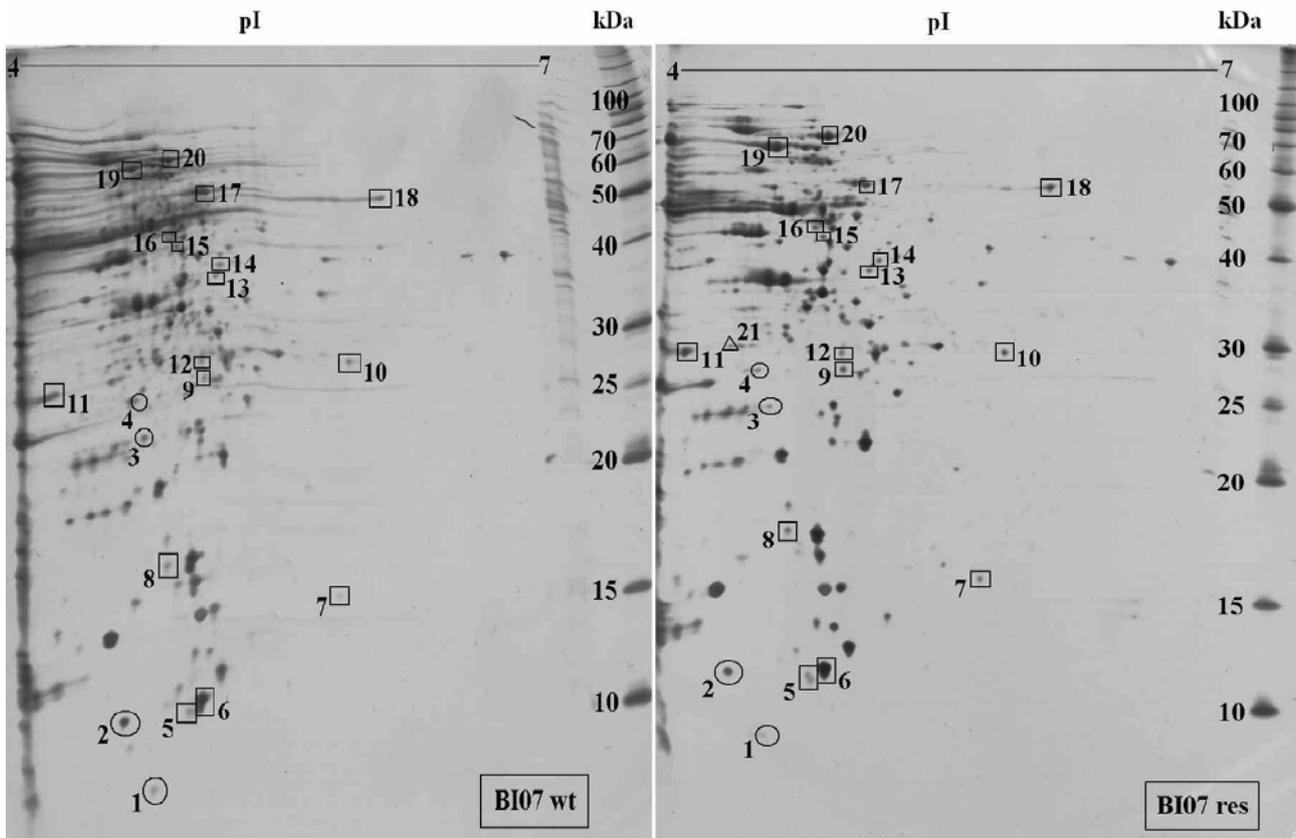
Eventuali mutazioni nucleotidiche del gene *rpoB* sono state valutate nel ceppo modello *B. lactis* BI07. E' stata analizzata una core region di 129 bp (codoni 508-550), contenente il segmento da 81 bp dove è stata mappata la maggior parte delle mutazioni associate alla resistenza a rifampicina in *E. coli* e *M. tuberculosis* (Jin e Gross, 1988; Telenti *et al.*, 1993; Yuen *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2003). A livello del codone 513, è stata evidenziata una sostituzione puntiforme (CAG/CGG). La transizione è risultata una mutazione miss-sense che determina la sostituzione di Gln con Arg nella sequenza primaria della subunità beta della RNA polimerasi batterica. La posizione 513 era già stata caratterizzata come codone hot spot correlato alla resistenza a rifampicina in *M. tuberculosis* (Yuen *et al.*, 1999).

### Variazioni nei pattern proteomici associate alla resistenza a rifaximina in *B. lactis* BI07

Per valutare i cambiamenti metabolici correlati al fenotipo antibiotico resistenza in *B. lactis* BI07, è stato utilizzato un approccio proteomico basato sulla combinazione di 2DE e MALDI-TOF. L'analisi proteomica è stata condotta in BI07-wt e BI07-res (cresciuto sia in assenza che in presenza di pressione selettiva), in fase di crescita esponenziale e stazionaria.

In Fig. 2.1 e Tab. 2.2 sono riportate 21 proteine, identificate mediante MS, i cui livelli di espressione variano significativamente tra BI07-wt e BI07-res in fase esponenziale di crescita. Tali proteine costituiscono il 65% delle proteine totali risultate differenzialmente espresse in queste condizioni. Tra le 4 proteine downregolate in BI07-res, è stata identificata una putativa ferredoxin (spot 1) ed una proteina simile alla catena beta dell'ATP sintasi (spot 3). Entrambe sono già state correlate a fenomeni di antibiotico resistenza: una ridotta trascrizione del gene ferredoxin è stata osservata in *Trichomonas vaginalis* resistente a metronidazolo (Quon *et al.*, 1992), ed alterazioni strutturali nell'enzima ATP sintasi sono state riportate in diversi batteri resistenti (Humbert e Altendorf, 1989). Le 16 proteine risultate sovraespresse in BI07-res comprendono 3 proteine da

stress (spot 6, 7 e 19), 8 enzimi del metabolismo (spot 5, 8, 10, 13, 14, 15, 16 e 21), e 3 fattori di regolazione (spot 11, 17 e 20). Un ruolo nella risposta cellulare a stress è stato ipotizzato in *E. coli* anche per S-adenosylmethionine synthetase (spot 13) ed elongation factor G (spot 20) (Ferianc *et al.*, 1998; Caldas *et al.*, 2000). Tra le proteine del metabolismo cellulare, putative cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase (spot 5) e acetyl-CoA acetyltransferase (spot 15) sono coinvolte, rispettivamente, in pathway di biodegradazione di idrocarburi aromatici polinucleari e catabolismo di xenobiotici (Andreoni *et al.*, 2000). D-2-hydroxy-acid dehydrogenase (spot 21), enzima correlato alla biosintesi di prolina in condizioni di stress in *Corynebacterium* (Ankri *et al.*, 1996), è stato identificato solo in BI07-res.



**Fig. 2.1.** Mappe 2DE silver-stained delle proteine totali estratte da *B. lactis* BI07-wt e -res in fase esponenziale di crescita. BI07-res è stato cresciuto in presenza di rifaximina (100 µg/ml). Le proteine sono state separate mediante IEF nel range di pH 4-7 in prima dimensione, e SDS-PAGE 15% nella seconda dimensione. Cerchi e quadrati indicano rispettivamente proteine down e upregolate in BI07-res. Il triangolo indica uno spot visualizzato solo in BI07-res.

**Tab. 2.2.** Proteine differenzialmente espresse in *B. lactis* BI07-wt e -res in fase esponenziale di crescita. Student's *t* test,  $P = 0.05$ . Le proteine sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Sono stati considerati solo protein hit con almeno 3 matching peptide. BI07-res è stato cresciuto in presenza di rifaximina (100 µg/ml).

Spot no. <sup>a</sup>	Homologous protein	Microorganism (Accession no. <sup>b</sup> )	Observed migration (pI/kDa)	Theoretic migration (pI/kDa)	No. of peptides matched	Coverage (%)	Score
Proteins downregulated in BI07-res							
1	Putative ferredoxin	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) (gi 21222275)	4.8/8	5.2/7.4	3	34	9.9e-001
2	Hypothetical protein	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (gi 23335834)	4.6/9.5	4.9/8.5	4	33	1.0e+000
3	Protein with similarity to ATP synthase B chain	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23464960)	4.7/21.5	5.2/18.8	3	21	9.7e-001
4	Hypothetical protein	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (gi 23335579)	4.7/24	4.4/25.1	3	25	8.7e-001
Proteins upregulated in BI07-res							
5	Putative cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase	<i>Rhodococcus</i> sp. 1BN (gi 10933942)	4.8/11.5	4.7/13.7	4	43	1.0e+000
6	Co-chaperonin GroES (HSP10)	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (gi 23336432)	4.9/12	5.1/10.6	3	22	5.6e-001
7	Universal stress protein family	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 (gi 15841091)	5.7/15.5	5.5/15.3	3	20	4.1e-001
8	Phospho-2Dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	<i>Streptomyces lividans</i> (gi 2492971)	4.7/17.5	4.9/16.7	4	31	2.1e-001
9	Manganese-stabilizing protein precursor	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120 (gi 17231346)	5/28	4.9/29.9	4	27	1.0e+000
10	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (gi 15609362)	5.8/29	5.6/29.4	5	24	1.0e+000
11	Segregation and condensation protein B	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 (gi 15841170)	4.2/29	4.5/25.3	4	27	1.0e+000
12	Hypothetical protein	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (gi 23335524)	5/29	4.8/33.5	3	18	7.5e-001
13	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23466330)	5.1/39	4.8/43.9	3	18	1.8e-001
14	Ketosynthase	<i>Streptomyces tauricus</i> (gi 7209612)	5.2/40	5.3/41	3	22	3.0e-001
15	Acetyl-CoA acetyltransferase	<i>Deinococcus radiodurans</i> (gi 15807466)	4.9/42	5.1/41.1	3	19	9.6e-001
16	Adenosine deaminase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (gi 15610449)	4.8/45	5.3/40.1	5	25	8.9e-001
17	Glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 (gi 21324061)	5.1/54.6	4.9/55.8	4	24	1.0e+000
18	Hypothetical protein Rv2097c	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (gi 15609234)	6/55	6.3/51.7	3	22	6.1e-002
19	60 kDa chaperonin (GroEL)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (gi 29839413)	4.6/68.6	5/61.2	6	28	1.0e+000
20	Elongation factor G	<i>Tropheryma whipplei</i> TW08/27 (gi 28572835)	4.9/71	5.2/77.5	5	24	1.0e+000
Proteins expressed only in BI07-res							
21	D-2-hydroxy-acid dehydrogenase homolog unkdh	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (gi 11356550)	4.4/30	4.7/33	3	20	1.0e+000

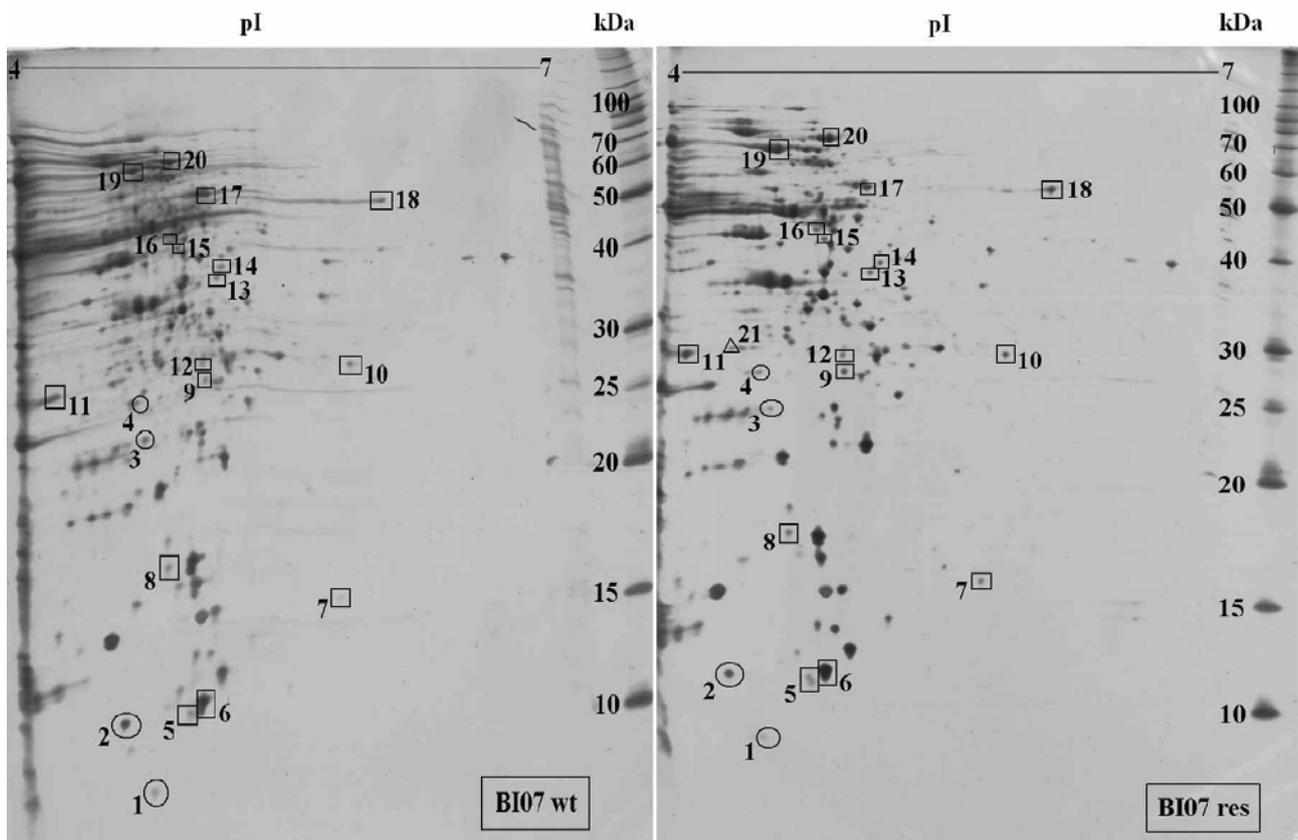
<sup>a</sup>Vedi Fig. 2.1.

<sup>b</sup>gi no. di NCBI nr.

In Fig. 2.2 e Tab. 2.3 sono riportate 18 proteine, identificate mediante MS, i cui livelli di espressione variano significativamente tra BI07-wt e BI07-res in fase stazionaria di crescita. Tali proteine costituiscono il 70% delle proteine totali risultate differenzialmente espresse in queste condizioni. Tra le 3 proteine downregolate in BI07-res, sono stati identificati 2 fattori di regolazione (spot 1 e 2) e l'enzima 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (spot 3), coinvolto nella biosintesi di terpenoidi e isoprenoidi, componenti della membrana plasmatica responsabili della modulazione della permeabilità (Takahashi *et al.*, 1998). Analogamente a quanto già riportato in fase esponenziale di crescita, le 15 proteine risultate sovraespresse in BI07-res comprendono hsp (spot 8 e 15), enzimi con attività acetiltrasferasica (spot 11 e 12) e putative cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase (spot 4). SufE protein (spot 7), hypothetical protein with a possibile ssDNA binding domain (spot 16) e alpha beta hydrolase (spot 17) possono essere incluse nella famiglia di proteine da stress per il ruolo svolto nella protezione cellulare contro stress ossidativo e/o energetico. In particolare, alpha beta hydrolase coopera con la fosfatasi RsbP nel determinare defosforilazione di anti-anti-sigma factor RsbV con conseguente attivazione del fattore trascrizionale  $\sigma^B$ . In *B. subtilis*,  $\sigma^B$  e RsbP controllano la risposta generale a stress e sono stati associati a fenotipi di resistenza a rifampicina (Bandow *et al.*, 2002). Anti-anti-sigma factor (spot 9) e RNA polymerase sigma factor rpoD (spot 18) costituiscono altri regolatori trascrizionali positivi, upregolati in BI07-res in fase stazionaria di crescita.

Il confronto delle mappe 2D di BI07-res cresciuto in assenza di pressione selettiva e in presenza di 100  $\mu\text{g/ml}$  di rifaximina, ha consentito la discriminazione tra differenze nei livelli di espressione geneticamente determinate o indotte da pressione selettiva. In particolare, l'esposizione all'antibiotico ha indotto la sovraespressione di putative cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase, S-adenosylmethionine synthetase, 65 kDa hsp, e putative acetyltransferase (data not shown).

I risultati dell'analisi MALDI-TOF sono stati verificati e confermati, mediante LC-MS/MS, per 4 proteine, 2 della fase esponenziale di crescita (spot 6 e 20), e 2 della fase stazionaria (spot 8 e 17) (data not shown).



**Fig. 2.2.** Mappe 2DE silver-stained delle proteine totali estratte da *B. lactis* BI07-wt e -res in fase stazionaria di crescita. BI07-res è stato cresciuto in presenza di rifaximina (100 µg/ml). Le proteine sono state separate mediante IEF nel range di pH 4-7 in prima dimensione, e SDS-PAGE 15% nella seconda dimensione. Cerchi e quadrati indicano rispettivamente proteine down e upregolate in BI07-res. Il triangolo indica uno spot visualizzato solo in BI07-res.

**Tab. 2.3.** Proteine differenzialmente espresse in *B. lactis* BI07-wt e -res in fase stazionaria di crescita. Student's *t* test, *P* = 0.05. Le proteine sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Sono stati considerati solo protein hit con almeno 3 matching peptide. BI07-res è stato cresciuto in presenza di rifaximina (100 µg/ml).

Spot no. <sup>a</sup>	Homologous protein	Microorganism (Accession no. <sup>b</sup> )	Observed migration (pI/kDa)	Theoretic migration (pI/kDa)	No. of peptides matched	Coverage (%)	Score
Proteins down-regulated in BI07-res							
1	Elongation factor P	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23464692)	5.1/21	5/20.7	3	22	1.0e+000
2	Transcriptional regulator, putative	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 (gi 15839642)	6.8/39	6.6/40.7	4	20	3.8e-001
3	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23464723)	5.3/40	5.2/42.1	3	21	4.0e-001
Proteins up-regulated in BI07-res							
4	Putative cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase	<i>Rhodococcus</i> sp. 1BN (gi 10933942)	4.8/10.5	4.7/13.7	4	40	1.0e+000
5	Oxygenase	<i>Streptomyces argillaceus</i> (gi 3334823)	4.7/11	4.7/10.8	3	20	6.7e-001
6	Hypothetical protein SCC75A.34c	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) (gi 21220757)	5/12.5	4.6/12.2	3	28	9.2e-001
7	SufE protein probably involved in Fe-S center assembly	<i>Cytophaga hutchinsonii</i> (gi 48854817)	5.8/14.5	5.4/16	5	33	1.0e+000
8	65 kDa heat shock protein	<i>Mycobacterium chelonae</i> (gi 602177)	4.3/15	4.7/12.4	3	58	1.0e+000
9	Anti-anti-sigma factor	<i>Chlamydia muridarum</i> (gi 15835322)	4.9/15	5.3/12.6	3	33	5.1e-001
10	Protein-tyrosine-phosphatase	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120 (gi 17228562)	4.8/15.5	5.2/16.5	3	26	5.6e-001
11	Putative acetyltransferase	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 (gi 29830647)	5/16.5	5.2/19.9	3	21	7.2e-001
12	Hypothetical protein with acyl transferase domain	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23464756)	4.6/17	4.6/18.9	3	22	8.9e-002
13	Phospho-2Dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	<i>Streptomyces lividans</i> (gi 2492971)	4.6/17.5	4.9/16.7	3	20	2.6e-002
14	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23466229)	4.6/18	4.7/20.6	3	23	2.6e-002
15	Heat shock protein 60	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (gi 24850347)	4.6/18.5	4.5/20.6	3	25	5.3e-001
16	Narrowly conserved hypothetical protein with possible ssDNA binding domain	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23465228)	4.9/22	4.5/20.1	3	26	9.5e-002
17	Possible alpha beta hydrolase	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23466334)	4.3/25	4.5/25.7	3	20	2.5e-001
18	RNA polymerase sigma factor rpoD	<i>Streptomyces aureofaciens</i> (gi 133468)	6.1/39	6.3/35.7	3	24	1.8e-001

<sup>a</sup>Vedi Fig. 2.2.

<sup>b</sup>gi no. di NCBIInr.

## Modificazioni di rifaximina, indotte da *B. lactis* BI07-res

Mediante LC-MS/MS sono state analizzate eventuali modificazioni strutturali nel drug moiety di rifaximina, indotte dal mutante *B. lactis* BI07-res. Non sono state osservate modificazioni chimiche né derivati di degradazione dell'antibiotico. Il recupero quantitativo di rifaximina (100 µg/ml) nelle frazioni colturali ha consentito l'esclusione di un pattern di biodegradazione (data not shown).

## Conclusioni

In questo lavoro, sono stati utilizzati approcci molecolari per indagare i meccanismi alla base della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*. Tutti i bifidobatteri analizzati hanno acquisito spontaneamente resistenza in presenza di antibiotico, e mantenuto il fenotipo in assenza di pressione selettiva. L'esclusione di fenomeni di reversione suggerisce come elementi genetici immobili e stabili codifichino la resistenza, e come il drug moiety non agisca da induttore del fenotipo ma determini la selezione dei mutanti resistenti.

Ulteriori analisi, di carattere genetico e proteomico, sono state condotte in *B. lactis* BI07, componente della formulazione probiotica VSL#3. La scelta di questo microrganismo come ceppo modello è stata determinata dalla sua capacità di sopravvivere e persistere a livello intestinale (Brigidi *et al.*, 2000; Gionchetti *et al.*, 2003) e dalla disponibilità di un'overview proteomica (Vitali *et al.*, 2005).

Il sequenziamento di una core region di 129 bp in BI07-wt e -res, ha consentito l'identificazione di una mutazione miss-sense a livello del codone 513, già identificato come hot spot in mutanti di *E. coli* e *M. tuberculosis* resistenti a rifampicina (Jin *et al.*, 1988; Telenti *et al.*, 1993; Yuen *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2003).

L'analisi dei profili proteomici ha rivelato come la maggior parte delle differenze nei livelli di espressione proteica siano geneticamente determinate più che indotte dall'esposizione all'antibiotico. In particolare, in BI07-res è stata evidenziata la sovraespressione di proteine da stress, che rappresentano una risposta non specifica, comune a diverse condizioni di shock quali esposizione a metalli pesanti, ossidanti, acidi, sali biliari e antibiotici (O'Toole e Williams, 2003; Sánchez *et al.*, 2005). L'upregolazione in BI07-res di regolatori trascrizionali positivi ha suggerito come *Bifidobacterium* possa attivare meccanismi compensatori per assistere il processo di trascrizione in presenza di inibitori dell'RNA polimerasi batterica. Le variazioni riportate nei livelli di espressione di enzimi del metabolismo centrale potrebbero determinare uno svantaggio metabolico dei mutanti resistenti rispetto a bifidobatteri sensibili in assenza di pressione selettiva, e giustificare quindi la loro scomparsa in wash-out, dalle feci di pazienti affetti da UC e trattati con rifaximina (Brigidi *et al.*, 2002).

Risultati analoghi sono stati riportati da Shaw *et al.* (2003). Mediante DNA microarray è stato valutato l'impatto di agenti battericidi, compresa rifampicina, sull'espressione genica globale in *E. coli*, ed è stato osservato un incremento significativo nell'espressione di geni del metabolismo centrale, coinvolti in recupero di nucleotidi e biosintesi di purine. La stimolazione con rifampicina ha, inoltre, determinato elevati livelli trascrizionali del gene *rpoB*.

I dati riportati in questo studio dimostrano la natura cromosomica della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*, il che minimizza il rischio di trasmissione orizzontale tra specie microbiche

intestinali. La caratterizzazione proteomica del fenotipo resistente suggerisce come la mutazione a livello del gene *rpoB* sia associata ad una riduzione nel fitness di *B. lactis* BI07-res. La scomparsa dei mutanti resistenti osservata *in vivo* in assenza di pressione selettiva, consente di escludere l'insorgenza di mutazioni compensatorie con stabilizzazione della resistenza, e suggerisce pertanto l'efficacia di una formulazione combinata di antibiotico e probiotico nel trattamento di disordini relativi al tratto gastrointestinale umano.

## Capitolo 3

### **Tratti molecolari e fenotipici di mutanti di *Bifidobacterium*, selezionati *in vitro*, resistenti a rifaximina**

Vitali B, Turrone S, Serina S, Sosio M, Vannini L, Candela M, Guerzoni ME, Brigidi P (2008)  
Molecular and phenotypic traits of *in vitro*-selected mutants of *Bifidobacterium* resistant to rifaximin.  
*Int J Antimicrob Agents*, in press.  
Appendice 2

## Introduzione

In questo studio, è stata caratterizzata la sequenza del gene *rpoB* di numerosi ceppi di *Bifidobacterium*, rappresentativi del microbiota intestinale e ampiamente utilizzati come probiotici, e delle loro controparti resistenti a rifaximina, selezionate spontaneamente a 100 µg/ml di antibiotico.

Ulteriori aspetti della resistenza a rifaximina sono stati valutati nel ceppo modello *B. lactis* BI07. In particolare, mediante cell-free transcription assay, è stata analizzata la funzionalità dell'enzima RNA polimerasi in BI07-wt e BI07-res. Il coinvolgimento di proprietà di superficie e permeabilità di membrana nell'acquisizione del fenotipo resistente è stato determinato mediante analisi LC-MS/MS della distribuzione dell'antibiotico nei diversi compartimenti cellulari di BI07-res, e analisi delle variazioni in composizione di acidi grassi di membrana durante la crescita di mutanti resistenti e ceppi sensibili.

## Materiali e metodi

### Agente antimicrobico, ceppi batterici e condizioni di coltura

Rifaximina, fornita da Alfa Wassermann, è stata utilizzata per preparare una stock solution 10 mg/ml in metanolo. In Tab. 3.1 sono riportati i ceppi di *Bifidobacterium* impiegati in questo studio. Mutanti spontanei resistenti a 100 µg/ml di rifaximina sono stati selezionati *in vitro* come descritto da Vitali *et al.* (2007). Tutti i bifidobatteri sono stati cresciuti in anaerobiosi in terreno MRS (Difco) addizionato dello 0.05% di L-cisteina HCl, a 37°C per 18-36 h. Le condizioni anaerobiche sono state ottenute mediante impiego di Anaerocult A (Merck).

### Analisi del gene *rpoB*

L'estrazione del DNA genomico ed il sequenziamento del gene *rpoB* dei cloni sensibili e dei mutanti resistenti di *Bifidobacterium*, riportati in Tab. 3.1, sono stati effettuati come descritto da Vitali *et al.* (2007). Le sequenze ottenute, comprendenti i codoni 508-550 secondo il sistema di numerazione riportato da Telenti *et al.* (1993), sono state depositate in DDBJ database con gli accession number di Tab. 3.1. La ricerca di eventuali mutazioni nel gene *rpoB* di ceppi di *Bifidobacterium* resistenti a rifaximina è stata effettuata mediante Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994).

### Cell-free transcription assay

Gli estratti enzimatici di *B. lactis* BI07-wt e BI07-res sono stati preparati secondo la procedura descritta da Gross *et al.* (1976), leggermente modificata al fine di incrementare l'efficienza di lisi cellulare. La concentrazione di lisozima è stata incrementata a 15 mg/ml, ed è stato introdotto uno step di sonicazione, costituito da 5 cicli, power level 3 e duty 30% per 30 sec (Branson Sonifier W-250). L'inibizione dell'attività enzimatica della RNA polimerasi batterica è stata determinata mediante cell-free transcription assay. La composizione della miscela di reazione (volume finale 50 µl) è la seguente: Tris-acetato 20 mM pH 7.9, EDTA 0.1 mM, KCl 50 mM, Mg-acetato 16 mM,

DTT 5 mM, bovine serum albumin (BSA) 100 µg/ml, ATP 2 mM, CTP 2 mM, GTP 2 mM, UTP 4 µM, calf thymus DNA 40 µg/ml, 2 µCi [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] UTP, 10 µl di estratto enzimatico, e 0.5 µl di rifaximina, disciolta in DMSO 10%, a concentrazioni comprese tra 0.016 µg/ml e 100 µg/ml. Dopo incubazione a 37°C per 45 min, la reazione enzimatica è stata bloccata mediante aggiunta di 150 µl di TCA 10% (w/v) ice-cold e successiva incubazione a 4°C per 30 min. I prodotti di reazione sono stati raccolti su filtri glass-fibre (UniFilters 96 GF/B, PerkinElmer) mediante impiego di un 96 well harvester (PerkinElmer), e lavati con H<sub>2</sub>O per eliminare [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] UTP non incorporato. La radioattività incorporata nelle molecole di RNA è stata misurata con Top Count scintillation counter (PerkinElmer). ATP, CTP, GTP, UTP sono stati forniti da Roche; [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] UTP (10 µCi/µL) e calf thymus DNA da GE Healthcare. Le soluzioni utilizzate per cell-free transcription assay sono state trattate con DEPC (diethylpirocarbonate) 0.1% (Sigma-Aldrich).

### **Binding/uptake di rifaximina in *B. lactis* BI07-res**

Al fine di valutare il binding e/o uptake di rifaximina, è stata condotta una fermentazione batch di BI07-res in terreno MRS addizionato di 100 µg/ml di antibiotico. Campioni di brodo colturale prelevati ogni h per le prime 4 h, e a 24 h dall'inoculo, sono stati centrifugati a 9000 g per 5 min. La frazione di rifaximina presente nel surnatante e legata al pellet cellulare è stata estratta con 300 µl di acetato di etile (Sigma-Aldrich). Il pellet cellulare è stato successivamente incubato con lysis buffer [Tris/HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, TritonX-100 1.2 % (v/v), lisozima 20 mg/ml] a 37°C per 30 min. La frazione di rifaximina presente nel lisato cellulare è stata estratta con 300 µl di acetato di etile. Gli estratti ottenuti sono stati analizzati mediante LC-MS/MS (Vitali *et al.*, 2007).

### **Analisi gas-cromatografica degli acidi grassi di membrana**

Gli acidi grassi di membrana di BI07-wt e BI07-res in fase di crescita esponenziale e stazionaria sono stati analizzati mediante gas-cromatografia. I cloni sensibile e resistente sono stati coltivati rispettivamente in MRS e MRS addizionato di 100 µg/ml di rifaximina. I pellet cellulari, raccolti per centrifugazione a 10000 g per 10 min, e lavati 2 volte con Tris/HCl 70 mM pH 7, sono stati conservati a -80°C fino all'analisi. L'estrazione dei lipidi è stata effettuata come descritto da Suutari *et al.* (1990). Esteri metilici degli acidi grassi sono stati ottenuti mediante incubazione dei lipidi estratti a 45°C per 15 min in trifluoruro di boro-metanolo, e successivamente estratti con esano.

Il sistema gas-cromatografico HRGR 5660 MEGA Series (Carlo Erba Instrument), equipaggiato con flame ionization detector, è stato utilizzato per separare gli ester metilici degli acidi grassi su fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm ID) ricoperta da un film di Carbowax, come fase stazionaria, di 0.2 µm di spessore (Supelco). I parametri di lavoro sono i seguenti: injector temperature, 220°C; detector temperature, 220°C; gas carrier (He) flow rate, 3 ml/min; splitting ratio, 1:45 (v/v). La temperatura del forno è stata programmata per equilibrare a 60°C all'inizio del ciclo, e raggiungere 220°C a 4°C/min. Gli acidi grassi sono stati identificati mediante confronto degli spettri di massa dei campioni con spettri di massa di soluzioni standard.

## Risultati

### Analisi genetica di mutanti di *Bifidobacterium* resistenti a rifaximina

Mutazioni nucleotidiche nel gene *rpoB*, codificante per la catena  $\beta$  della RNA polimerasi batterica, target farmacologico di rifaximina, sono state identificate in tutti i ceppi di *Bifidobacterium* analizzati. In Tab. 3.1 sono riportate le mutazioni, miss-sense e silenti, mappate a livello della core region di 129 bp (codoni 508-550), contenente il segmento da 81 bp dove è stata identificata la maggior parte delle mutazioni associate alla resistenza a rifampicina in *E. coli* e *M. tuberculosis* (Jin e Gross, 1988; Telenti *et al.*, 1993; Yuen *et al.*, 1999; Mani *et al.*, 2001; Cavusoglu *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2003). I 5 diversi tipi di mutazioni miss-sense osservati in *Bifidobacterium* sono sostituzioni puntiformi a livello dei codoni 513, 516, 522 e 529. A differenza delle posizioni 513, 516 e 522, già caratterizzate come codoni hot spot in mutanti di *M. tuberculosis* resistenti a rifampicina (Yuen *et al.*, 1999; Mani *et al.*, 2001), il codone 529 rappresenta un nuovo sito di mutazione. Il pattern di mutazione che coinvolge il codone 522 è risultato eterogeneo, caratterizzato da sostituzioni double point, che comprendono sia transizioni che trasversioni.

**Tab. 3.1.** Mutazioni nel gene *rpoB* identificate in mutanti di *Bifidobacterium* resistenti a rifaximina.

Strain <sup>a</sup> ( <i>rpoB</i> sequence accession no.)	Codon position <sup>b</sup>	Nucleotide change <sup>c</sup>	Amino acid change <sup>d</sup>
<i>B. infantis</i> ATCC 15697 <sup>T</sup> (wt: <b>AB198724</b> ; res: <b>AB198725</b> )	529	CGT/CAT	<b>Arg/His</b>
	530	CTG/CTT	Leu/Leu
	532	GCT/GCA	Ala/Ala
	533	TTG/CTG	Leu/Leu
<i>B. breve</i> ATCC 15700 <sup>T</sup> (wt: <b>AB198726</b> ; res: <b>AB198727</b> )	522	TCC/GCT	<b>Ser/Ala</b>
	546	GAG/GAA	Glu/Glu
	548	CGC/CGA	Arg/Arg
<i>B. longum</i> ATCC 15707 <sup>T</sup> (wt: <b>AB198728</b> ; res: <b>AB198729</b> )	529	CGT/CAT	<b>Arg/His</b>
	530	CTC/CTT	Leu/Leu
	532	GCT/GCA	Ala/Ala
	541	GAT/GAC	Asp/Asp
	547	GTC/GTG	Val/Val
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 <sup>T</sup> (wt: <b>AB198732</b> ; res: <b>AB198733</b> )	508	ACC/ACT	Thr/Thr
	522	GCT/TCC	<b>Ala/Ser</b>
	523	GGC/GGT	Gly/Gly
	536	GGT/GGC	Gly/Gly
	546	GAA/GAG	Glu/Glu
<i>B. lactis</i> BI07 (wt: <b>AB198734</b> ; res: <b>AB198735</b> )	513	CAG/CGG	<b>Gln/Arg</b>
<i>B. breve</i> BBSF (wt: <b>AB198736</b> ; res: <b>AB198737</b> )	516	GAC/TAC	<b>Asp/Tyr</b>
<i>B. longum</i> BL04 (wt: <b>AB198738</b> ; res: <b>AB198739</b> )	508	ACG/ACT	Thr/Thr
	511	CTC/CTG	Leu/Leu
	512	TCG/TCC	Ser/Ser
	521	TTG/CTG	Leu/Leu
	522	GCG/TCT	<b>Ala/Ser</b>
	524	GTC/GTG	Val/Val
	525	ACG/ACC	Thr/Thr
	528	CGC/CGT	Arg/Arg
	530	CTC/CTG	Leu/Leu
	532	GCG/GCT	Ala/Ala
	539	TCG/TCC	Ser/Ser
546	GAG/GAA	Glu/Glu	

<sup>a</sup>ATCC, American Type Culture Collection; <sup>T</sup>Type strain; *B. lactis* BI07, *B. breve* BBSF e *B. longum* BL04 sono componenti della formulazione probiotica VSL#3.

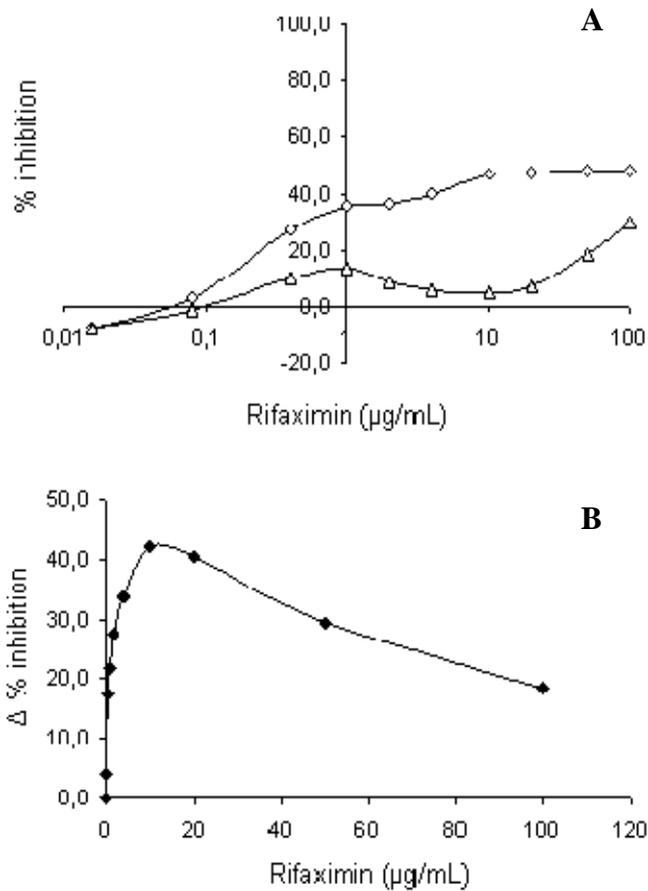
<sup>b</sup>Sistema di numerazione dei codoni riportato da Telenti *et al.* (1993).

<sup>c</sup>Sequenza nucleotidica wild-type/resistente. La base mutata è indicata in grassetto.

<sup>d</sup>Sequenza amminoacidica wild-type/resistente. L'amminoacido mutato è indicato in grassetto.

## Analisi funzionale della RNA polimerasi in *B. lactis* BI07

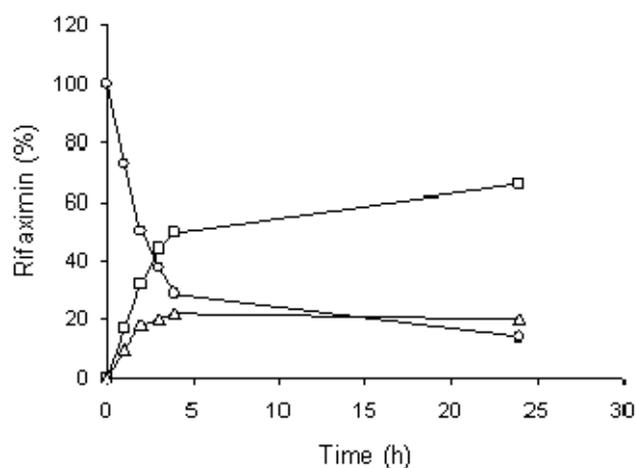
Gli effetti inibitori esercitati da rifaximina sulla trascrizione *in vitro* degli estratti enzimatici di BI07-wt e BI07-res, sono rappresentati in Fig. 3.1. Come riportato in Fig. 3.1A, dove la percentuale di inibizione viene correlata alla concentrazione di antibiotico, BI07-wt e BI07-res rispondono diversamente alla presenza di rifaximina. In particolare, la percentuale di inibizione per BI07-wt aumenta all'incrementare della concentrazione di antibiotico, suggerendo come l'enzima RNA polimerasi wild-type sia sensibile a rifaximina. Al contrario, la percentuale di inibizione per BI07-res si mantiene relativamente costante fino a 20  $\mu\text{g/ml}$  di antibiotico, per poi incrementare parallelamente all'aumento della dose di rifaximina applicata. Le maggiori percentuali di inibizione per BI07-wt (47%) e BI07-res (29%) sono state determinate rispettivamente a 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$  di antibiotico. La percentuale di inibizione non ha raggiunto il valore teorico 100% in corrispondenza della massima concentrazione di rifaximina applicata, similmente a quanto già riportato per GE23077, un nuovo potente e selettivo inibitore della RNA polimerasi batterica (data not shown) (Sarubbi *et al.*, 2004). La presenza, negli estratti enzimatici di *Bifidobacterium*, di composti capaci di interferire con questi inibitori, o una debole attività trascrizionale basale potrebbero giustificare le cinetiche osservate. In Fig. 3.1B sono riportate le differenze nelle percentuali di inibizione degli estratti enzimatici di BI07-wt e BI07-res, calcolate per ogni concentrazione di rifaximina applicata. L'inibizione differenziale aumenta all'aumentare della dose di antibiotico fino a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Il declino osservato a concentrazioni maggiori di rifaximina suggerisce una resistenza parziale dell'enzima RNA polimerasi mutato. Poiché cellule intere di BI07-res sono risultate resistenti a concentrazioni di rifaximina  $> 100 \mu\text{g/ml}$  (Vitali *et al.*, 2007), *in vivo* potrebbero verificarsi meccanismi supplementari di resistenza.



**Fig. 3.1.** Effetti inibitori di rifaximina sulla trascrizione *in vitro* degli estratti enzimatici di *B. lactis* BI07 (10 µl). (A), percentuale di inibizione (%) della RNA polimerasi di *B. lactis* BI07-wt (□) e -res (Δ) a diverse concentrazioni di rifaximina (µg/ml). (B), inibizione differenziale tra RNA polimerasi di *B. lactis* BI07-wt e RNA polimerasi di *B. lactis* BI07-res a diverse concentrazioni di rifaximina (µg/ml).

## Barriera di membrana per l'uptake di rifaximina in BI07-res

Poiché il colore del pellet cellulare di BI07-res cresciuto in presenza di rifaximina è arancione come il colore dell'antibiotico, e rifaximina non precipita in terreno MRS, sono stati valutati, mediante LC-MS/MS, binding e/o uptake dell'antibiotic moiety in BI07-res (Fig. 3.2). La quantità di rifaximina presente nel surnatante colturale diminuisce esponenzialmente nelle prime 4 h di fermentazione fino al 29% del valore iniziale (100 µg/ml), e raggiunge il 14% dopo 24 h. La cinetica di decremento della concentrazione di rifaximina nel surnatante colturale riflette il time course di binding e uptake dell'antibiotico, come evidenziato dalla porzione legata al pellet cellulare e presente nel lisato di BI07-res. In particolare, la quantità di rifaximina legata al pellet cellulare aumenta esponenzialmente fino al 49% nelle prime 4 h di crescita batterica e raggiunge il valore di 66% dopo 24 h. La percentuale di antibiotico presente all'interno delle cellule di BI07-res incrementa leggermente nelle prime 4 h fino al 22%, e rimane costante fino al termine del processo fermentativo. La porzione decisamente maggiore di rifaximina legata al pellet cellulare suggerisce come il meccanismo di resistenza all'antibiotico in BI07-res coinvolga modificazioni a livello di permeabilità e proprietà di superficie, capaci di prevenire l'import dell'agente antibatterico.



**Fig. 3.2.** Cinetica di binding/uptake di rifaximina in *B. lactis* BI07-res, valutata mediante LC-MS/MS.

(○), rifaximina presente nel surnatante colturale; (□) rifaximina legata al pellet cellulare; (Δ) rifaximina presente nel lisato cellulare. I valori sono espressi come percentuale.

Al fine di comprendere il meccanismo di barriera di membrana in BI07-res, sono state determinate variazioni nella composizione degli acidi grassi di membrana (FA), associate all'acquisizione della resistenza a rifaximina. In Tab. 3.2 sono riportati i risultati dell'analisi gascromatografica di FA in BI07-wt e BI07-res in fase di crescita esponenziale e stazionaria. Sono state riscontrate differenze nel rapporto percentuale di FA saturi e insaturi tra i cloni sensibile e resistente. In particolare, in BI07-res è stato osservato un incremento maggiore in FA saturi (C12:0, C14:0, C16:0) in fase stazionaria, mentre l'FA insaturo C18:1Δ11 è stato accumulato nella fase stazionaria di BI07-wt, e si è mantenuto costante nelle 2 fasi di crescita di BI07-res. In fase esponenziale di crescita in entrambi i cloni di *B. lactis* BI07, sono state determinate alte percentuali di acidi grassi ciclopropanici (CFA) quali lattobacillico (cis-11,12-methyleneoctadecanoic) e diidrosterculico (cis-9,10-methyleneoctadecanoic); solo in BI07-res in fase stazionaria è stata misurata una significativa percentuale di acido diidrosterculico accompagnata da tracce di C17:0cy.

**Tab. 3.2.** Analisi gas-cromatografica degli acidi grassi di membrana in *B. lactis* BI07-wt e -res in fase di crescita esponenziale e stazionaria. La quantità di acidi grassi è riportata come percentuale (%). I dati sono le medie di tre esperimenti replicati. Il coefficiente di variabilità è risultato compreso tra 2 e 5%.

Fatty acid <sup>a</sup> (%)	BI07-wt		BI07-res	
	Exponential	Stationary	Exponential	Stationary
C12:0	- <sup>b</sup>	0.09	-	1.25
C14:0	2.22	5.08	0.71	8.84
C15:0	0.11	0.14	-	0.17
C16:0	21.89	33.33	15.13	35.62
C16:1	1.76	0.45	1.42	2.83
C17:0cy	-	-	0.41	0.4
C17:1	-	-	0.38	-
C18:0	1.86	8.58	2.35	5.86
C18:1Δ9	14.09	18.16	19.25	18.45
C18:1Δ11	4.36	16.05	7.89	8.26
C18:2	-	1.93	-	1.06
Lactobacillic acid (C19:0cy)	44.73	8.76	38.64	4.60
Dihydrosterculic acid (C19:1cy)	1.35	-	0.51	3.55
Saturated	26.08	47.22	18.19	51.74
Unsaturated	20.21	36.59	28.94	30.60

<sup>a</sup>C12:0, dodecanoic acid; C14:0, tetradecanoic acid; C15:0, pentadecanoic acid; C16:0, hexadecanoic acid; C16:1, cis-9-hexadecenoic acid; C17:0cy, cis-9,10-methylenehexadecanoic acid; C17:1, cis-10-heptadecenoic acid; C18:0, octadecanoic acid; C18:1Δ9, cis-9-octadecenoic acid; C18:1Δ11, cis-11-octadecenoic acid; C18:2, cis-9, cis-12-octadecenoic acid; lactobacillic acid, cis-11,12-methyleneoctadecanoic acid; dihydrosterculic acid, cis-9,10-methyleneoctadecanoic acid.

<sup>b</sup>not detected.

## Conclusioni

In questo studio, sono stati valutati ulteriori aspetti molecolari e fisiologici associati all'acquisizione della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*.

L'analisi di sequenza di una core region del gene *rpoB* di 129 bp, in diversi ceppi di bifidobatteri wild-type e resistenti all'antibiotico, ha rivelato la presenza di 5 differenti tipi di mutazioni miss-sense a livello dei codoni 513, 516, 522 e 529. In particolare, la posizione 529 rappresenta un nuovo sito di mutazione, e la posizione 522 appare interessante sia per le sostituzioni double point che per il profilo eterogeneo di cambiamento nucleotidico. In *B. breve* ATCC 15700, è stata osservata la sostituzione di Ser con Ala, mentre la sostituzione amminoacidica inversa è stata riscontrata in *B. adolescentis* ATCC 15703 e *B. longum* BL04. A livello del codone 522 è stato evidenziato un elevato polimorfismo di sequenza tra i cloni di *Bifidobacterium* wild-type utilizzati in questo studio: Ser è presente in *B. infantis* ATCC 15697, *B. breve* ATCC 15700, *B. longum* ATCC 15707, *B. breve* BBSF, mentre in *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. lactis* BI07 e *B. longum* BL04 è codificata Ala. *B. longum* NCC2705, di cui è stata determinata la sequenza genomica completa (Schell *et al.*, 2002), mostra Ser in posizione 522, così come i ceppi wild-type di *E. coli* e *M. tuberculosis*, utilizzati come riferimento per lo studio di mutazioni nel gene *rpoB* di mutanti resistenti a rifampicina (Telenti *et al.*, 1993; Yuen *et al.*, 1999; Cavusoglu *et al.*, 2002). L'eterogeneità di sequenza del codone 522 in *Bifidobacterium* suggerisce un ruolo indiretto dell'amminoacido codificato nel binding con rifaximina.

Ulteriori caratteri fisiologici della resistenza a rifaximina sono stati analizzati nel ceppo modello *B. lactis* BI07. Al fine di confermare il ruolo principale svolto dalla mutazione nella catena  $\beta$  della RNA polimerasi batterica nell'acquisizione del fenotipo resistente, è stata valutata l'attività trascrizionale degli estratti enzimatici di BI07. Benché gli effetti inibitori di rifaximina siano risultati decisamente maggiori nei confronti di BI07-wt rispetto a BI07-res, le differenze nelle percentuali di inibizione tra clone sensibile e resistente suggeriscono una resistenza parziale della RNA polimerasi mutata a concentrazioni di antibiotico  $> 10 \mu\text{g/ml}$ . Poiché cellule intere di BI07-res sono resistenti a concentrazioni di rifaximina  $> 100 \mu\text{g/ml}$ , *in vivo* potrebbero verificarsi meccanismi supplementari di resistenza.

La maggiore porzione di antibiotico legata al pellet cellulare in BI07-res, ha portato ad ipotizzare un meccanismo di barriera di membrana, con alterazioni nella permeabilità cellulare che impediscano l'uptake di rifaximina. Hui *et al.* (1977) hanno dimostrato il coinvolgimento di proprietà di superficie e permeabilità cellulare nell'acquisizione del fenotipo rifampicina resistenza in micobatteri con RNA polimerasi sensibile all'antibiotico.

Al fine di comprendere i meccanismi di barriera di membrana, sono state determinate le variazioni nelle percentuali di FA saturi e insaturi e dei loro prodotti di metilazione in BI07-wt e BI07-res. Mentre FA saturi conferiscono rigidità alla membrana e resistenza a stress quali antibiotici, alti livelli di insaturazione lipidica sono stati associati a fluidità di membrana e sensibilità ad agenti di stress (Dunnick e O'Leary, 1970). L'elevata percentuale di FA saturi in fase stazionaria di crescita in BI07-res potrebbe quindi rappresentare un meccanismo di difesa delle cellule mutate nei confronti di rifaximina. CFA, presenti nelle membrane cellulari di diversi batteri, sono sintetizzati da FA insaturi dei fosfolipidi di membrana mediante CFA sintasi che aggiunge un ponte di metilene al doppio legame. Gli acidi lattobacillico e diidrosterculico, che derivano dalla metilazione post-trascrizionale rispettivamente di C18:1 $\Delta$ 11 (cis-11-octadecenoic acid) e C18:1 $\Delta$ 9

(cis-9-octadecenoic acid), costituiscono i principali CFA in numerose specie batteriche compresi lactic acid bacteria (Suutari e Laakso, 1992; Dionisi *et al.*, 1999). Benché non sia ancora stato chiarito il ruolo di CFA nelle membrane cellulari, la ciclizzazione riduce la fluidità di membrana e previene la penetrazione di molecole esterne (Brown *et al.*, 1997). E' stato suggerito che diverse attività e specificità caratterizzino acido lattobacillico e diidrosterculico (Guerzoni *et al.*, 2001). Chang e Cronan (1999) hanno mostrato come l'incorporazione di C18:1 $\Delta$ 9, precursore dell'acido diidrosterculico, ripristini la resistenza a stress acido in *E. coli*, mentre la conversione di C18:1 $\Delta$ 11 ad acido lattobacillico non determina il ripristino della tolleranza a pH acidi in *Salmonella typhimurium* (Kim *et al.*, 2005). Grogan e Cronan (1997) hanno ipotizzato che CFA modifichino le proprietà chimiche delle membrane senza indurre variazioni nelle proprietà fisiche. L'incremento di acido diidrosterculico in fase stazionaria di crescita in BI07-res suggerisce come tale acido sia presumibilmente responsabile dell'interazione con rifaximina e prevenga l'import di molecole esogene.

Questo studio riporta come la resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium* sia determinata principalmente dalla combinazione di 2 meccanismi: mutazione nella catena beta dell'enzima RNA polimerasi, target molecolare dell'antibiotico, e ridotta penetrazione di rifaximina in cellule resistenti in seguito a variazioni specifiche nella composizione di acidi grassi di membrana e conseguente alterazione della permeabilità cellulare.

## Capitolo 4

### **Attività immunomodulante di rifaximina associata ad un mutante resistente di *B. lactis***

*Manuscript in preparation*

## Introduzione

L'assenza di assorbimento gastrointestinale e la buona attività antibatterica di rifaximina, hanno generato un notevole interesse nel suo impiego per il trattamento di disordini intestinali. Attualmente le terapie prevedono la somministrazione combinata di antibiotici e immunomodulanti per ridurre il numero di batteri patogeni ed ottenere e protrarre la remissione clinica.

Batteri probiotici possono esercitare un effetto positivo in disordini intestinali mediante interazione diretta con il sistema immune dell'ospite (Nova *et al.*, 2007). In particolare, ceppi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* hanno mostrato un ruolo significativo nella prevenzione e trattamento di infezioni gastrointestinali acute e IBD (Sullivan e Nord, 2005). I loro effetti benefici dipendono presumibilmente dalla capacità di regolare differenzialmente la produzione di citochine anti- e pro-infiammatorie e determinare risposte Th1/Th2 (Corthésy *et al.*, 2007).

In questo studio sono riportati gli effetti *in vitro* sul sistema immunitario dell'ospite, associati al trattamento con rifaximina e *B. lactis* BI07.

## Materiali e metodi

### Ceppi batterici e condizioni di coltura

In questo studio sono stati utilizzati il ceppo *B. lactis* BI07 (BI07-wt) ed un mutante spontaneo, resistente a 100 µg/ml di rifaximina (BI07-res) (Vitali *et al.*, 2007). BI07-wt è stato cresciuto in anaerobiosi in terreno MRS (Difco) addizionato dello 0.05% di L-cisteina HCl, a 37°C per 18-36 h. Le condizioni anaerobiche sono state ottenute mediante impiego di Anaerocult A (Merck). BI07-res è stato coltivato nelle stesse condizioni di BI07-wt, con aggiunta di rifaximina 100 µg/ml. E' stata preparata una stock solution di antibiotico, fornito da Alfa Wassermann, 10 mg/ml in metanolo.

### Colture cellulari

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) sono state isolate da 10 volontari sani mediante centrifugazione in gradiente di densità (1.077 g/ml) (Lymphoprep, Nycomed Pharma). Le cellule sono state risospese in RPMI 1640 culture medium (Life Technologies) addizionato di siero bovino fetale inattivato al calore (56°C, 1 h) 10% (v/v), e piruvato di sodio 0.23 mM (Sigma-Aldrich) (complete medium). PBMC sono state coltivate in complete medium ad una concentrazione pari a  $1 \times 10^6$  cell/ml in piastre 24-well tissue culture (Falcon multiwall TM 24 well, Beckton Dickinson) in incubatore umidificato con CO<sub>2</sub> 5% a 37°C.

### Esperimenti di stimolazione

Rifaximina, alla concentrazione di 10 e 100 µg/ml, BI07-wt ( $10^8$  CFU/ml) e BI07-res ( $10^8$  CFU/ml) in presenza o assenza di antibiotico (10 µg/ml e 100 µg/ml), sono stati applicati ai monolayer di PBMC. LPS (lipopolisaccaride) (Sigma-Aldrich) è stato utilizzato come controllo positivo alla concentrazione di 2 ng/ml; come controllo negativo, non sono stati applicati né antibiotico né ceppi batterici. Dopo incubazione per 24 h, i surnatanti colturali sono stati

centrifugati e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino alla determinazione delle citochine prodotte [interleuchina 1 beta (IL-1  $\beta$ ), interleuchina 6 (IL-6), interleuchina 10 (IL-10) e tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )]. Sono stati condotti esperimenti separati in duplicato.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  sono stati determinati mediante R&D Systems DUOSET. La concentrazione di IL-6 e IL-10 è stata misurata mediante impiego di anticorpi “capture” monoclonali anti-human contro IL-6 (18871D) e IL-10 (18551A), e specifici anticorpi “detection” monoclonali anti-human biotinilati, contro IL-6 (18882D) e IL-10 (18562D) (Pharmingen). Come substrato è stato utilizzato 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solubile (Sigma-Aldrich). Extravidin-perossidase (Sigma-Aldrich) è stata applicata 1:1000. I valori di densità ottica dei campioni sono stati determinati a 450 nm su lettore di piastre ELISA. I limiti di detection del saggio sono i seguenti: 15.7 pg/ml per IL-1 $\beta$ , 31 pg/ml per IL-6 e IL-10, e 20 pg/ml per TNF- $\alpha$ .

## **Risultati**

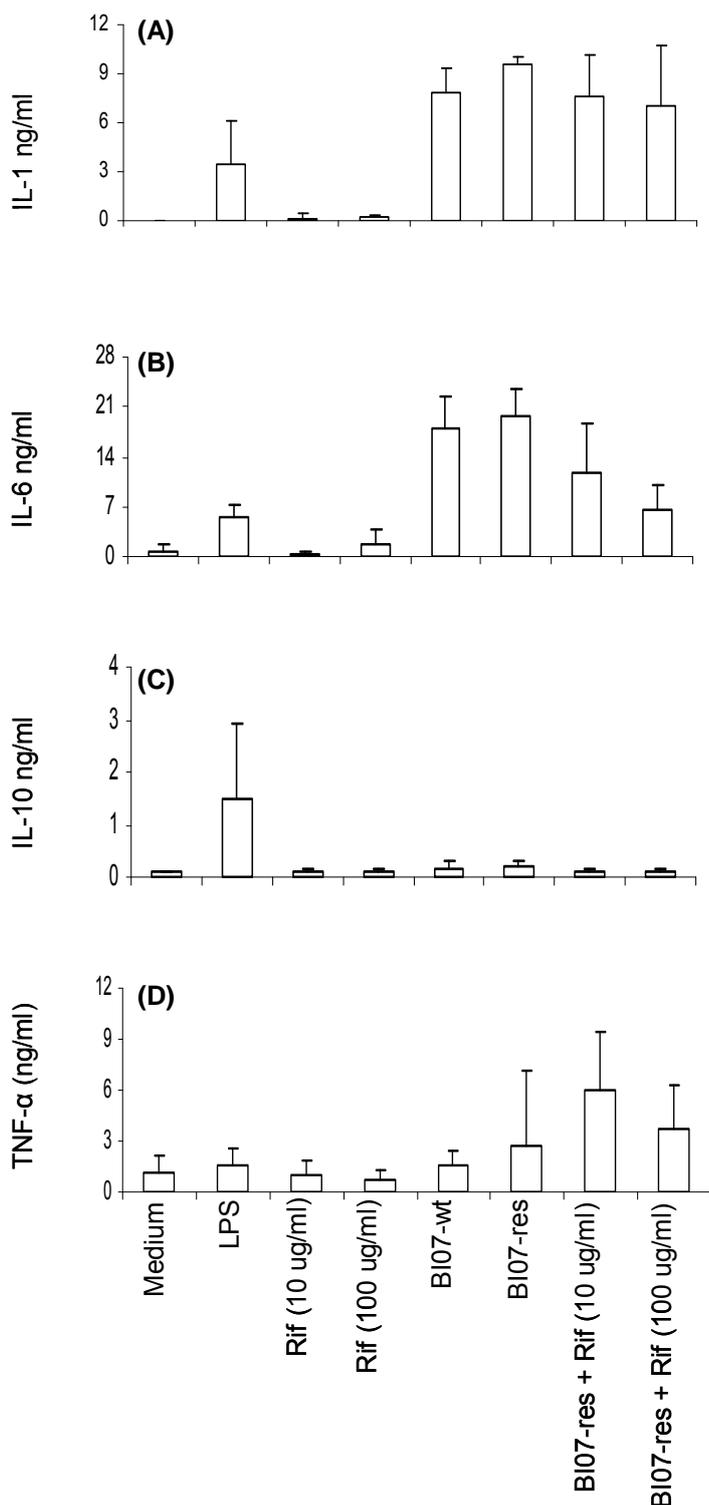
### **Effetti di rifaximina e *B. lactis* BI07 sulla produzione di citochine da parte di PBMC**

In Fig. 4.1 sono riportati gli effetti esercitati da rifaximina, BI07-wt, BI07-res, e rifaximina associata a BI07-res, sulla produzione da parte di PBMC, di citochine pro-infiammatorie IL-1 $\beta$  (Fig. 4.1A), IL-6 (Fig. 4.1B), TNF- $\alpha$  (Fig. 4.1D), e regolatorie IL-10 (Fig. 4.1C).

La stimolazione di PBMC con rifaximina 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$  ha determinato la produzione di piccole quantità di IL-1 $\beta$  (10  $\mu\text{g/ml}$ : 0.16 ng/ml; 100  $\mu\text{g/ml}$ : 0.19 ng/ml). Al contrario, la somministrazione di BI07-wt e BI07-res ha indotto una produzione di IL-1 $\beta$  superiore rispetto al controllo positivo LPS (LPS: 3.50 ng/ml; BI07-wt: 7.88 ng/ml; BI07-res: 9.59 ng/ml). Il trattamento combinato di antibiotico e BI07-res ha ridotto gli effetti stimolatori dei batteri ma i livelli di IL-1 $\beta$  si sono mantenuti al di sopra dei valori osservati nel caso di stimolazione con LPS (BI07-res e rifaximina 10  $\mu\text{g/ml}$ : 7.57 ng/ml; BI07-res e rifaximina 100  $\mu\text{g/ml}$ : 6.99 ng/ml).

Risposte simili sono state osservate relativamente alla produzione di IL-6 e IL-10 in PBMC, dopo stimolazione con rifaximina, BI07-wt, e BI07-res. La somministrazione di antibiotico ha determinato la produzione di piccole quantità di IL-6 (10  $\mu\text{g/ml}$ : 0.026 ng/ml; 100  $\mu\text{g/ml}$ : 1.66 ng/ml); al contrario, la stimolazione con BI07-wt e BI07-res ha indotto una produzione di IL-6 superiore rispetto al controllo positivo LPS (LPS: 5.7 ng/ml; BI07-wt: 17.87 ng/ml; BI07-res: 19.54 ng/ml). Il trattamento combinato di antibiotico e BI07-res ha ridotto significativamente gli effetti stimolatori dei batteri (BI07-res e rifaximina 10  $\mu\text{g/ml}$ : 11.6 ng/ml; BI07-res e rifaximina 100  $\mu\text{g/ml}$ : 6.42 ng/ml). Analogamente, nel caso di IL-10, la stimolazione sia con rifaximina che con batteri ha determinato la produzione di bassi livelli di citochina rispetto a LPS (LPS: 1.5 ng/ml; rifaximina 10  $\mu\text{g/ml}$ : 0.10 ng/ml; rifaximina 100  $\mu\text{g/ml}$ : 0.12 ng/ml; BI07-wt: 0.17 ng/ml; BI07-res: 0.21 ng/ml), mentre la somministrazione combinata di rifaximina e BI07-res ha ridotto la concentrazione di IL-10 in maniera dose-dipendente (BI07-res e rifaximina 10  $\mu\text{g/ml}$ : 0.12 ng/ml; BI07-res e rifaximina 100  $\mu\text{g/ml}$ : 0.083 ng/ml).

Un pattern differente di stimolazione è stato riportato per TNF- $\alpha$ , unica citochina la cui produzione è stata indotta anche da rifaximina (LPS: 1.56 ng/ml; rifaximina 10  $\mu$ g/ml: 1.04 ng/ml; rifaximina 100  $\mu$ g/ml: 0.76 ng/ml). BI07-wt e BI07-res hanno stimolato la produzione di TNF- $\alpha$ , ma gli effetti riportati sono risultati decisamente inferiori rispetto a quanto osservato per la secrezione di IL-1 $\beta$  e IL-6 (BI07-wt: 1.58 ng/ml; BI07-res: 2.75 ng/ml). La somministrazione combinata di antibiotico e BI07-res ha mostrato un'azione sinergica sulla produzione di TNF- $\alpha$  (BI07-res e rifaximina 10  $\mu$ g/ml: 5.94 ng/ml; BI07-res e rifaximina 100  $\mu$ g/ml: 3.78 ng/ml). **Fig.1** Interleukins production by stimu



**Fig. 4.1.** Produzione di interleuchine mediante stimolazione di PBMC. (A) IL-1 $\beta$ ; (B) IL-6; (C) IL-10; (D) TNF- $\alpha$ .

## Conclusioni

In questo studio sono riportati gli effetti esercitati da rifaximina sulle funzioni regolatorie del sistema immunitario dell'ospite. Un possibile effetto anti-infiammatorio di rifaximina, con riduzione nella secrezione di IFN- $\gamma$ , è stato suggerito da Fiorucci *et al.* (2002) in modelli murini di colite. Effetti simili con un calo significativo nei livelli di chemochine IL-8, MCP-1, MCP-3 e IL-10 sono stati riportati in pazienti affetti da paucite, sottoposti a terapia combinata di rifaximina e ciprofloxacina (Helwig *et al.*, 2004).

Poiché il trattamento con l'antibiotico determina la selezione di mutanti di *Bifidobacterium* resistenti (Brigidi *et al.*, 2002 e capitolo 1 di questa tesi), sono state valutate le attività immunomodulanti anche della somministrazione combinata di rifaximina e mutanti resistenti di *B. lactis* BI07.

I dati ottenuti, relativi alla stimolazione di PBMC, mostrano come: (i) rifaximina non alteri il pattern di secrezione di IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, ma eserciti un debole effetto stimolatorio sulla produzione di TNF- $\alpha$ ; (ii) *B. lactis* sia un buon induttore di IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ; (iii) la somministrazione combinata di BI07-res e rifaximina determini una riduzione dell'effetto stimolatorio del microrganismo, specialmente per IL-6.

I risultati confermano l'effetto anti-infiammatorio di rifaximina, e sono in accordo con diversi studi che mostrano come la somministrazione di batteri probiotici sia in grado di attivare una transiente risposta pro-infiammatoria (Ruiz *et al.*, 2005; Reilly *et al.*, 2007).

Questo studio suggerisce il potenziale ruolo di mutanti di *Bifidobacterium* resistenti a rifaximina nella regolazione di citochine pro- e anti-infiammatorie in caso di disordini intestinali, durante trattamento antibiotico.

## Conclusioni

In questa tesi di dottorato è riportato l'impiego di un sistema fermentativo di coltura in continuo a 3 stadi, "the colon model", finalizzato a valutare l'impatto della somministrazione di rifaximina sulla microflora fecale di un soggetto sano, sia in termini di composizione batterica che di prodotti metabolici fermentativi. Sono stati, inoltre, determinati per la prima volta in un modello *in vitro*, gli effetti sul microbiota intestinale associati alla somministrazione combinata di antibiotico e probiotico *B. lactis* BI07. Mediante analisi coltura-dipendente e tecniche molecolari coltura-indipendenti, quali FISH e PCR-DGGE, sono state valutate le principali variazioni a carico di determinati gruppi batterici. L'analisi HPLC ha consentito la determinazione degli outcome metabolici, in termini di profili di SCFA.

I dati riportati mostrano come il trattamento con rifaximina e la somministrazione combinata di antibiotico e probiotico non alterino drasticamente la composizione della microflora intestinale ma determinino un incremento significativo nella concentrazione di batteri appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, il che suggerisce una spontanea insorgenza di antibiotico resistenza. I risultati ottenuti sono in accordo con lo studio di Brigidi *et al.* (2002), in cui vengono riportate solo variazioni minori a carico della microflora intestinale in pazienti affetti da UC e trattati con rifaximina, e viene evidenziata un'alta frequenza di isolamento di mutanti di *Bifidobacterium* resistenti a rifaximina durante il trattamento e la loro scomparsa in wash-out parallelamente al ripristino della composizione del microbiota intestinale di ciascun individuo.

La somministrazione combinata di rifaximina e *B. lactis* BI07 ha determinato, inoltre, un incremento significativo nell'abbondanza di microrganismi con proprietà health-promoting quali *Atopobium* spp. e batteri appartenenti a *E. rectale/Clostridium* cluster XIVa.

L'assenza di modificazioni drastiche nella microflora intestinale, e l'incremento significativo nella concentrazione di batteri probiotici e health-promoting, dimostrano l'incapacità di rifaximina di promuovere disbiosi microbica in soggetti sani, e suggeriscono l'efficacia di una formulazione combinata di antibiotico e probiotico nel trattamento di disordini relativi al tratto gastrointestinale umano.

Al fine di validare l'impiego di una formulazione combinata di rifaximina e probiotici, appare di fondamentale importanza chiarire i meccanismi alla base della resistenza all'antibiotico. In questa tesi di dottorato, sono stati utilizzati approcci molecolari per indagare i meccanismi associati all'insorgenza della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*. Tutti i ceppi di bifidobatteri analizzati, specie rappresentative a livello intestinale e componenti della formulazione probiotica VSL#3, hanno acquisito spontaneamente resistenza in presenza di antibiotico, e mantenuto il fenotipo in assenza di pressione selettiva. L'esclusione di fenomeni di reversione suggerisce come elementi genetici immobili e stabili codifichino la resistenza, e come il drug moiety non agisca da induttore del fenotipo ma determini la selezione dei mutanti resistenti.

Sulla base delle informazioni disponibili in letteratura, che riportano come la resistenza all'analogo strutturale rifampicina in mutanti di *E. coli* e *M. tuberculosis* sia mediata da mutazioni nel gene codificante per la subunità  $\beta$  della RNA polimerasi batterica (Jin e Gross, 1988; Telenti *et al.*, 1993; Yuen *et al.*, 1999; Mani *et al.*, 2001; Cavusoglu *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2003), è stata determinata la sequenza del gene *rpoB* nei cloni wild-type di *Bifidobacterium* e nei mutanti resistenti a 100  $\mu\text{g/ml}$  di rifaximina. L'analisi di una core region di 129 bp ha rivelato la presenza di 5 differenti tipi di mutazioni miss-sense a livello dei codoni 513, 516, 522 e 529. In particolare, la

posizione 529 rappresenta un nuovo sito di mutazione, e la posizione 522 appare interessante sia per le sostituzioni double point che per il profilo eterogeneo di cambiamento nucleotidico, il che suggerisce un ruolo indiretto dell'amminoacido codificato nel binding con rifaximina. I dati riportati dimostrano la natura cromosomica della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*, il che minimizza il rischio di trasmissione orizzontale tra specie microbiche intestinali.

Ulteriori analisi, di carattere proteomico e fisiologico, sono state condotte in *B. lactis* BI07, componente della formulazione probiotica VSL#3. La scelta di questo microrganismo come ceppo modello è stata determinata dalla sua capacità di sopravvivere e persistere a livello intestinale (Brigidi *et al.*, 2000; Gionchetti *et al.*, 2003) e dalla disponibilità di un'overview proteomica (Vitali *et al.*, 2005).

La combinazione di elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa MALDI-TOF ha consentito la determinazione dei cambiamenti metabolici correlati all'acquisizione della resistenza a rifaximina. L'analisi dei profili proteomici ha rivelato come la maggior parte delle differenze nei livelli di espressione proteica siano geneticamente determinate più che indotte dall'esposizione all'antibiotico. In particolare, in BI07-res è stata evidenziata la sovraespressione di proteine da stress, che rappresentano una risposta non specifica, comune a diverse condizioni di shock quali esposizione a metalli pesanti, ossidanti, acidi, sali biliari e antibiotici (O'Toole e Williams, 2003; Sánchez *et al.*, 2005). L'upregolazione in BI07-res di regolatori trascrizionali positivi ha suggerito come *Bifidobacterium* possa attivare meccanismi compensatori per assistere il processo di trascrizione in presenza di inibitori dell'RNA polimerasi batterica. Le variazioni riportate nei livelli di espressione di enzimi del metabolismo centrale potrebbero determinare uno svantaggio metabolico dei mutanti resistenti rispetto ai bifidobatteri sensibili in assenza di pressione selettiva, e giustificare quindi la loro scomparsa in wash-out, dalle feci di pazienti affetti da UC e trattati con rifaximina (Brigidi *et al.*, 2002).

Le differenze nei pattern proteomici di BI07-wt e BI07-res, così come l'alta frequenza di mutazioni silenti riportata nei mutanti resistenti di *Bifidobacterium* potrebbero essere determinate da un'incrementata frequenza di mutazione, meccanismo che consentirebbe ai batteri resistenti di persistere nella popolazione. Tuttavia, la scomparsa dei mutanti resistenti osservata *in vivo* in assenza di pressione selettiva, consente di escludere l'insorgenza di mutazioni compensatorie con stabilizzazione della resistenza. Inoltre, la caratterizzazione proteomica del fenotipo resistente suggerisce come la mutazione a livello del gene *rpoB* sia associata ad una riduzione nel fitness di *B. lactis* BI07-res, supportando l'ipotesi di un costo biologico della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*.

E' stata inoltre verificata l'ipotesi di inattivazione del farmaco per modificazione strutturale e/o degradazione del drug moiety. Il recupero quantitativo di rifaximina nelle frazioni colturali di BI07-res mediante LC-MS/MS, ha consentito di escludere un pattern di biodegradazione.

Al fine di confermare il ruolo principale svolto dalla mutazione nella catena  $\beta$  della RNA polimerasi batterica nell'acquisizione del fenotipo resistente, è stata valutata l'attività trascrizionale degli estratti enzimatici di BI07. Benché gli effetti inibitori di rifaximina siano risultati decisamente maggiori nei confronti di BI07-wt rispetto a BI07-res, le differenze nelle percentuali di inibizione tra clone sensibile e resistente suggeriscono una resistenza parziale della RNA polimerasi mutata a concentrazioni di antibiotico  $> 10 \mu\text{g/ml}$ . Poiché cellule intere di BI07-res sono resistenti a concentrazioni di rifaximina  $> 100 \mu\text{g/ml}$ , *in vivo* potrebbero verificarsi meccanismi supplementari di resistenza.

La maggiore porzione di antibiotico legata al pellet cellulare in BI07-res, ha portato ad ipotizzare un meccanismo di barriera di membrana, con alterazioni nella permeabilità cellulare che impediscano l'uptake di rifaximina. Hui *et al.* (1977) hanno dimostrato il coinvolgimento di proprietà di superficie e permeabilità cellulare nell'acquisizione del fenotipo rifampicina resistenza in micobatteri con RNA polimerasi sensibile all'antibiotico.

Al fine di comprendere i meccanismi di barriera di membrana, sono state determinate le variazioni nelle percentuali di FA saturi e insaturi e dei loro prodotti di metilazione in BI07-wt e BI07-res. Mentre FA saturi conferiscono rigidità alla membrana e resistenza a stress quali antibiotici, alti livelli di insaturazione lipidica sono stati associati a fluidità di membrana e sensibilità ad agenti di stress (Dunnick e O'Leary, 1970). L'elevata percentuale di FA saturi in fase stazionaria di crescita in BI07-res potrebbe quindi rappresentare un meccanismo di difesa delle cellule mutate nei confronti di rifaximina. Inoltre, l'incremento di CFA quali acido diidrosterculico in fase stazionaria di crescita in BI07-res suggerisce come tale acido sia presumibilmente responsabile dell'interazione con rifaximina e prevenga l'import di molecole esogene.

Infine, in questa tesi di dottorato, sono riportati gli effetti esercitati da rifaximina sulle funzioni regolatorie del sistema immunitario dell'ospite. Un possibile effetto anti-infiammatorio di rifaximina, con riduzione nella secrezione di IFN- $\gamma$  è stato suggerito da Fiorucci *et al.* (2002) in modelli murini di colite. Effetti simili con un calo significativo nei livelli di chemiochine IL-8, MCP-1, MCP-3 e IL-10 sono stati riportati in pazienti affetti da paucite, sottoposti a terapia combinata di rifaximina e ciprofloxacina (Helwig *et al.*, 2004).

Poiché il trattamento con l'antibiotico determina la selezione di mutanti di *Bifidobacterium* resistenti (Brigidi *et al.*, 2002 e capitolo 1 di questa tesi), sono state valutate le attività immunomodulanti anche della somministrazione combinata di rifaximina e mutanti resistenti di *B. lactis* BI07.

I dati ottenuti, relativi alla stimolazione di PBMC, mostrano come: (i) rifaximina non alteri il pattern di secrezione di IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, ma eserciti un debole effetto stimolatorio sulla produzione di TNF- $\alpha$ ; (ii) *B. lactis* sia un buon induttore di IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ; (iii) la somministrazione combinata di BI07-res e rifaximina determini una riduzione dell'effetto stimolatorio del microrganismo, specialmente per IL-6.

I risultati confermano il potenziale effetto anti-infiammatorio di rifaximina, e sono in accordo con diversi studi che mostrano come la somministrazione di batteri probiotici sia in grado di attivare una transiente risposta pro-infiammatoria (Ruiz *et al.*, 2005; Reilly *et al.*, 2007).

I dati riportati in questa tesi di dottorato relativi alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della resistenza a rifaximina in *Bifidobacterium*, assumono un significato applicativo a livello medico e farmaceutico, e rappresentano la base scientifica per giustificare la somministrazione combinata di rifaximina e bifidobatteri probiotici nel trattamento clinico di disordini intestinali.

**Bibliografia**

- Aatourri N, Bouras M, Tome D, Marcos A, Lemonnier D (2002) Oral ingestion of lactic acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- $\gamma$  production. *Br J Nutr* 87, 367-373.
- Abdelali H, Cassand P, Soussotte V, Daubeze M, Bouley C *et al.* (1995) Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 24, 121-132.
- Abdelrazeq AS, Kelly SM, Lund JN, Leveson SH (2005) Rifaximin-ciprofloxacin combination therapy is effective in chronic active refractory pouchitis. *Colorectal Dis* 7, 182-186.
- Achkar JP, Al-Haddad M, Lashner B, Remzi FH, Brzezinski A *et al.* (2005) Differentiating risk factors for acute and chronic pouchitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3, 60-66.
- Acinas SG, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Pharino C, Ceraj I *et al.* (2004) Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430, 551-554.
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-87.
- Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, Edwards CA, Goulet O *et al.* (2003) Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol* 36, 329-337.
- Ahmed M, Prasad J, Gill H, Stevenson L, Gopal P (2007) Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. *J Nutr Health Aging* 11, 26-31.
- Ait-Belgnaoui A, Han W, Lamine F, Eutamene H, Fioramonti J *et al.* (2006) *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. *Gut* 55, 1090-1094.
- Akira S, Hemmi H (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85, 85-98.
- Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L (1998) PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13108-13113.
- Alam M, Midtvedt T, Uribe A (1994) Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* 29, 445-451.
- Alm L (1991) The therapeutic effects of various cultures-an overview. In: Robinson RK, ed. Therapeutic properties of fermented milks. Barking, England: Elsevier Science, pp. 45-64.
- Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C (2004) Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *BMJ* 328, 1046.
- Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL *et al.* (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3906-3912.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Alvarez-Martin P, Florez AB, Mayo B (2006) Screening for plasmids among human bifidobacteria species: sequencing and analysis of pBC1 from *Bifidobacterium catenulatum* L48. *Plasmid* 57, 165-174.

- Alvisi V, D'Ambrosi A, Onofri W *et al.* (1984) Treatment of secretory diarrhoeas. A double-blind trial of the effectiveness of rifaximin (L 105) and neomycin. *Clin Trials J* 21, 215-223.
- Amaravadi R, Thompson CB (2005) The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest* 115, 2618-2624.
- Amenta M, Dalle Nogare ER, Colomba C, Prestileo TS, Di Lorenzo F *et al.* (1999) Intestinal protozoa in HIV-infected patients: effect of rifaximin in *Cryptosporidium parvum* and *Blastocystis hominis* infections. *J Chemother* 11, 391-395.
- Andersen JS, Svensson B, Roepstorff P (1996) Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. *Nat Biotechnol* 14, 449-457.
- Anderson HW (1917) Yeast-like fungi of the human intestinal tract. *J Infect Dis* 21, 341-386.
- Andersson JO, Andersson SG (2001) Pseudogenes, junk DNA, and the dynamics of *Rickettsia* genomes. *Mol Biol Evol* 18, 829-839.
- Andreoni V, Bernasconi S, Colombo M, van Beilen JB, Cavalca L (2000) Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN. *Environ Microbiol* 2, 572-577.
- Andresen L, Jorgensen VL, Perner A, Hansen A, Eugen-Olsen J *et al.* (2005) Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis. *Gut* 54, 503-509.
- Ankri S, Serebrijski I, Reyes O, Leblon G (1996) Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of the proA step. *J Bacteriol* 178, 4412-4419.
- Anonymous (1981) The pioneers of pediatric medicine: Teodor Escherich. *Eur J Pediatr* 137, 131.
- Antonopoulos DA, Nelson KE, Morrison M, White BA (2004) Strain-specific genomic regions of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 as revealed by combinatorial random-phase genome sequencing and suppressive subtractive hybridization. *Environ Microbiol* 6, 335-346.
- Apajalahti JHA, Kettunen A, Nurminen PH, Jatila H, Wolben WE (2003) Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. *Appl Environ Microbiol* 69, 5731-5735.
- Apostolou E, Kirjavainen PV, Saxelin M, Rautelin H, Valtonen V *et al.* (2001) Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *FEMS Immunol Med Microbiol* 31, 35-39.
- Araya M, Morelli L, Reid G, Sanders ME, Stanton C (2006) Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. FAO/WHO Report. [On line] (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>)
- Argnani A, Leer RJ, van Luijk N, Pouwels PH (1996) A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology* 142, 109-114.
- Artsimovitch I, Vassylyeva MN, Svetlov D, Svetlov V, Perederina A *et al.* (2005) Allosteric modulation of the RNA polymerase catalytic reaction is an essential component of transcription control by rifamycins. *Cell* 122, 351-363.
- Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK (2000) Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr* 54, 263-267.
- Arvola T, Laiho K, Torkkeli S, Mykkanen H, Salminen S *et al.* (1999) Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* 104, e64.
- Atlas R (1997) Principles of microbiology. WCB McGrill-Hill, New York, NY.

- Axelrod PE, Chow ML, Radomski CC, McDermott JM, Davies J (2002) Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia rain forest soils subjected to disturbance. *Can J Microbiol* 48, 655-674.
- Azcarate-Peril MA, Bruno-Barcena JM, Hassan HM, Klaenhammer TR (2006) Transcriptional and functional analysis of oxalyl-Coenzyme A (CoA) decarboxylase and formyl-CoA transferase genes from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 72, 1891-1899.
- Baba E, Nagaishi S, Fukata T, Arakawa A (1991) The role of intestinal microflora on the prevention of *Salmonella* colonization in gnotobiotic chickens. *Poultry Sci* 70, 1902-1907.
- Bach JF (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347, 911-920.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY *et al.* (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 15718-15723.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-1920.
- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 979-984.
- Baines SD, Freeman J, Wilcox MH (2005) Effect of piperacillin/tazobactam on *Clostridium difficile* growth and toxin production in a human gut model. *J Antimicrob Chemother* 55, 974-982.
- Baker DE (2005) Rifaximin: a nonabsorbed oral antibiotic. *Rev Gastroenterol Disord* 5, 19-30.
- Baldwin TJ, Brooks SF, Knutton S, Manjarrez Hernandez HA, Aitken A *et al.* (1990) Protein phosphorylation by protein kinase C in Hep-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 58, 761-765.
- Banan A, Zhang Y, Losurdo J, Keshavarzian A (2000) Carbonylation and disassembly of the F-actin cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in a human colonic cell line. *Gut* 46, 830-837.
- Banasaz M, Norin E, Holma R, Midtvedt T (2002) Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 68, 3031-3034.
- Bandow JE, Brotz H, Hecker M (2002) *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentrations of rifampin involves the sigma(B)-dependent general and multiple stress response. *J Bacteriol* 184, 459-467.
- Bandow JE, Brötz H, Leichert LIO, Labischinski H, Hecker M (2003) Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 948-955.
- Bandow JE, Hecker M (2007) Proteomic profiling of cellular stresses in *Bacillus subtilis* reveals cellular networks and assists in elucidating antibiotic mechanisms of action. *Prog Drug Res* 79, 81-101.
- Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS *et al.* (2000) Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 66, 1654-1661.
- Baricault L, Denariatz G, Hourii JJ, Bouley C, Sapin C *et al.* (1995) Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis* 16, 245-252.
- Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME (2004) Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 70, 3575-3581.

- Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME, Macfarlane GT (2005) Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin Infect Dis* 40, 28-37.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196, 80-83.
- Bassetti S, Frei R, Zimmerli W (1998) Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii*. *Am J Med* 105, 71-72.
- Baumgart DC, Carding SR (2007) Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369, 1627-1640.
- Baumgart DC, Sandborn WJ (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369, 1641-1657.
- Bayerdorffer E, Oertel H, Lehn N, Kasper G, Manners GM *et al.* (1980) Topographical association between active gastritis and *Campylobacter pylori* colonisation. *J Clin Pathol* 42, 834-839.
- Beaugerie L, Petit JC (2004) Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 337-352.
- Begley M, Hill C, Gahan CGM (2006) Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* 72, 1729-1738.
- Beja O, Suzuki MT, Koonin EV, Aravind L, Hadd A *et al.* (2000) Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from marine microbial assemblage. *Environ Microbiol* 2, 516-529.
- Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P *et al.* (2006) Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 72, 3593-3599.
- Ben-Amor K, Breeuwer P, Verbaarschot P, Rombouts FM, Akkermans ADL *et al.* (2002) Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. *Appl Environ Microbiol* 68, 5209-5216.
- Ben-Amor K, Helig H, Smidt H, Vaughan EE, Abee T *et al.* (2005) Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Appl Environ Microbiol* 71, 4679-4689.
- Bengmark S (1998) Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42, 2-7.
- Bengmark S, Martindale R (2005) Prebiotics and synbiotics in clinical medicine. *Nutr Clin Pract* 20, 244-261.
- Beninati C, Oggioni MR, Boccanera M, Spinoza MR, Maggi T *et al.* (2000) Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* 18, 1060-1064.
- Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T (1984) The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 28, 975-986.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.
- Bentley SD, Maiwald M, Murphy LD, Pallen MJ, Yeats CA *et al.* (2003) Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whipplei*. *Lancet* 361, 637-644.

- Berdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* (Tokyo) 58, 1–26.
- Berg RD (1985) Bacterial translocation from the intestines. *Exp Anim* 34, 1-16.
- Berg RD (1992) Translocation and the indigenous gut flora. In: Fuller R, ed. Probiotics, the scientific basis. London: Chapman & Hall, pp. 55-85.
- Berg RD (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4, 430-435.
- Berg RD (1999) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473, 11-30.
- Bergmann S, Hammerschmidt S (2007) Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost* 98, 512-520.
- Berirtzoglou E, Romond C (1990) Effect of the feeding practices on the establishment of bacterial interactions in the intestine of the newborn delivered by caesarean section. *J Perinat Med* 18, 139-143.
- Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G (2003) Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52, 439-451.
- Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F, Guimaraes V, Rabot S *et al.* (2005) A novel mucosal vaccine based on live *Lactococci* expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* 175, 7297-7302.
- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35, 483-489.
- Bernstein H, Payne CM, Bernstein C, Schneider J, Beard SE *et al.* (1999) Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol Lett* 108, 37-46.
- Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L *et al.* (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signalling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12208-12213.
- Beutler B (2000) Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 12, 20-26.
- Bevilacqua L, Ovidi M, Di Mattia E, Trovati LD, Canganella F (2003) Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. *Microbiol Res* 158, 179-185.
- Bezirtzoglou E (1997) The intestinal microbiota during the first weeks of life. *Anaerobe* 3, 173-177.
- Bezkorovainy A, Topouzian N (1983) Aspects of iron metabolism in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Int J Biochem* 15, 316-366.
- Biasoli SM, Tosello EM, Magarò MH (2002) Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses* 45, 465-469.
- Biavati B, Scardovi V, Moore WEC (1982) Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int J Syst Bacteriol* 32, 358-373.
- Biavati B, Mattarelli P (2001) The family *Bifidobacteriaceae*. In: The Prokaryotes (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds.), Release 3.7, pp.1-70. Springer, New York.
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P *et al.* (2005) VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 100, 1539-1546.

- Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW (2006) The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* 55, 1141-1149.
- Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA *et al.* (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 732-737.
- Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH (1999) Physiological cost of rifampin resistance induced *in vitro* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1866-1869.
- Bininda-Emonds ORP (2004) The evolution of supertrees. *Trends Ecol Evol* 19, 315-322.
- Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 108, 516-520.
- Bland PW (1998) Mucosal T cell-epithelial cell interactions. *Chem Immunol* 71, 40-63.
- Blaser MJ, Miller RA, Lacher J, Singleton JW (1984) Patients with active Crohn's disease have elevated serum antibodies to antigens of seven enteric bacterial pathogens. *Gastroenterology* 87, 888-891.
- Blei AT (1998) Hepatic encephalopathy. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J, eds. Oxford textbook of clinical hepatology, 2nd ed. Oxford: Oxford Medical, pp. 765-783.
- Blümer N, Sel S, Virna S, Patrascan CC, Zimmermann S *et al.* (2007) Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin Exp Allergy* 37, 348-357.
- Boirivant M, Strober W (2007) The mechanism of action of probiotics. *Curr Opin Gastroenterol* 23, 679-692.
- Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L *et al.* (2003) Crohn's disease-associated *NOD2* variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 124, 140-146.
- Bonnet R (2002) Phylogenetic diversity of the human gut microflora based on small-subunit rRNA. PhD Thesis. Reading, UK: University of Reading.
- Bonnet R, Suau A, Doré J, Gibson GR, Collins MD (2002) Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 757-763.
- Borisova GV, Slivko VV (1973) Biochemical activity of bifidobacteria in milk. *Molochnaya Promyshlennost* 12, 13-15.
- Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J *et al.* (2003) Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis* 36, 775-780.
- Borrueil N, Carol M, Casellas F, Antolin M, de Lara F *et al.* (2002) Increased mucosal tumour necrosis factor  $\alpha$  production in Crohn's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. *Gut* 51, 659-664.
- Bos NA, Cebra JJ, Kroese FGM (2000) B-1 cells and the intestinal microflora. *Curr Top Microbiol Immunol* 252, 211-218.
- Bottazzi V, Zaccani C, Gonzaga E, Paladino M (1986) Absorption of cholesterol by intestinal lactic acid bacteria. *Ann Microbiol* 36, 1-5.
- Boucher Y, Nesbø CL, Doolittle WF (2001) Microbial genomes: dealing with diversity. *Curr Opin Microbiol* 4, 285-289.
- Bouma G, Strober W (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3, 521-533.

- Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK (2006) Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 83, 1256-1264.
- Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E *et al.* (2006) A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4, 754-759.
- Brandimarte G, Tursi A (2004) Rifaximin plus mesalazine followed by mesalazine alone is highly effective in obtaining remission of symptomatic uncomplicated diverticular disease. *Med Sci Monit* 10, PI70-PI73.
- Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen FE, Morton HC, Norderhaug IN *et al.* (1999) The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev* 171, 45-87.
- Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J *et al.* (2003) Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol* 185, 6220-6223.
- Brighenti F, Castellani G, Benini L, Casiraghi MC, Leopardi E *et al.* (1995) Effect of neutralized and native vinegar on blood glucose and acetate responses to a mixed meal in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* 49, 242-247.
- Brigidi P, Vitali B, Swennen E, Altomare L, Rossi M *et al.* (2000) Specific detection of *Bifidobacterium* strains in a pharmaceutical probiotic product and in human feces by polymerase chain reaction. *Syst Appl Microbiol* 23, 391-399.
- Brigidi P, Swennen E, Rizzello F, Bozzolasco M, Matteuzzi D (2002) Effects of rifaximin administration on the intestinal microbiota in patients with ulcerative colitis. *J Chemother* 14, 290-295.
- Bron PA, Grangette C, Mercenier A, de Vos WM, Kleerebezem M (2004a) Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J Bacteriol* 186, 5721-5729.
- Bron PA, Marco M, Hoffer SM, Van Mullekom E, de Vos WM *et al.* (2004b) Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract. *J Bacteriol* 186, 7829-7835.
- Brook I (1996) Isolation of non-sporing anaerobic rods from infections in children. *J Med Microbiol* 45, 21-26.
- Brook I (1999) Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol* 25, 155-172.
- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W *et al.* (2007) Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 5596-5601.
- Brown JL, Ross T, McMeekin TA, Nichols PD (1997) Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int J Food Microbiol* 37, 163-173.
- Brown JR, Douady CJ, Italia MJ, Marshall WE, Stanhope MJ (2001) Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nat Genet* 28, 281-285.
- Bruggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A *et al.* (2004) The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science* 305, 671-673.
- Buckling A, Wills MA, Colegrave N (2003) Adaptation limits diversification of experimental bacterial populations. *Science* 302, 2107-2109.
- Bulois P, Tremaine WJ, Maunoury V, Gambiez L, Hafraoui S *et al.* (2000) Pouchitis is associated with mucosal imbalance between interleukin-8 and interleukin-10. *Inflamm Bowel Dis* 6, 157-164.
- Buret A, Gall DG, Olson ME, Hardin JA (1999) The role of epidermal growth factor receptor in microbial infections of the gastrointestinal tract. *Microbes Infect* 1, 1139-1144.

- Burns A, Rowland I (2000) Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 1, 13-24.
- Buss D (2004) Danone's top functional brand has America in its sights. *New Nutrition Business* 9, 3-5.
- Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D (2000) Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 100, 119-130.
- Butterworth RF (2003) Hepatic encephalopathy - a serious complication of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 27, 143-145.
- Caesar R, Palmfeldt J, Gustafsson JS, Pettersson E, Hashemi SH *et al.* (2007) Comparative proteomics of industrial lager yeast reveals differential expression of the *cerevisiae* and non-*cerevisiae* parts of their genomes. *Proteomics* 7, 4135-4147.
- Caldas T, Laalami S, Richarme G (2000) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *J Biol Chem* 275, 855-860.
- Callanan M, Kaleta P, O'Callaghan J, O'Sullivan O, Jordan K *et al.* (2008) Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J Bacteriol* 190, 727-735.
- Callister SJ, McCue LA, Turse JE, Monroe ME, Auberry KJ *et al.* (2008) Comparative bacterial proteomics: analysis of the core genome concept. *PLoS ONE* 3, e1542.
- Campbell AM (1992) Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *J Bacteriol* 174, 7495-7499.
- Campieri M, Gionchetti P (1999) Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterology* 116, 1246-1249.
- Campieri M, Rizzello F, Venturi A, Poggioli G, Ugolini F *et al.* (2000) Combination of antibiotic and probiotic treatment is efficacious in prophylaxis of post-operative recurrence of Crohn's disease: a randomised controlled study vs. mesalazine. *Gastroenterology* 118, A4179.
- Campieri C, Campieri M, Bertuzzi V, Swennen E, Matteuzzi D *et al.* (2001) Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration. *Kidney Int* 60, 1097-1105.
- Candela M, Vitali B, Matteuzzi D, Brigidi P (2004) Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 38, 229-232.
- Candela M, Seibold G, Vitali B, Lachenmaier S, Eikmanns BJ *et al.* (2005) Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: Competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Res Microbiol* 156, 887-895.
- Candela M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turrone S *et al.* (2007) Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J Bacteriol* 189, 5929-5936.
- Candela M, Miccoli G, Bergmann S, Turrone S, Vitali B *et al.* (2007) Plasminogen-dependent proteolytic activity in *Bifidobacterium lactis*. Submitted.
- Canani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C *et al.* (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.
- Canani PD, Delzenne NM (2007) Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10, 729-734.

- Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G *et al.* (2002) Commensal-associated molecular patterns induce selective Toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol* 160, 165-173.
- Carnahan VE, Redinbo MR (2005) Structure and function of the human nuclear xenobiotic receptor PXR. *Curr Drug Metab* 6, 357-367.
- Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Barcena JM, Klaenhammer TR, Hassan HM *et al.* (2007) Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G729-G738.
- Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV (2006) Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313, 1126-1130.
- Caspary WF, Lembcke B, Elsehans B (1981) Bacterial fermentation of carbohydrates within the gastrointestinal tract. *Clin Res Rev* 1, 107-117.
- Cassone M, Serra P, Mondello F, Girolamo A, Scafetti S *et al.* (2003) Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *J Clin Microbiol* 41, 5340-5343.
- Castell DO (1988) Eating and swallowing disorders in the elderly. *Pract Gastroenterol* 12, 32-43.
- Casula G, Cutting SM (2002) *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 68, 2344-2352.
- Caufield PW, Saxena D, Fitch D, Li Y (2007) Population structure of plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans*, a member of the human indigenous biota. *J Bacteriol* 189, 1238-1243.
- Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A (2002) Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* 40, 4435-4438.
- Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE (1998) Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 6, 13-18.
- Cerdeno-Tarraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MT, Pallen M *et al.* (2003) The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res* 31, 6516-6523.
- Cesaro S, Chinello P, Rossi L, Zanesco L (2000) *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a neutropenic patient treated with *Saccharomyces boulardii*. *Support Care Cancer* 8, 504-505.
- Chaillou S, Champomier-Vergès MC, Cornet M, Crutz-Le Coq AM, Dudez AM *et al.* (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat Biotechnol* 23, 1527-1533.
- Challa A, Rao DR, Chawan CB, Shackelford L (1997) *Bifidobacterium lonugm* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 18, 517-521.
- Chang YY, Cronan JE Jr (1999) Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33, 249-259.
- Cherifi S, Robberecht J, Miendje Y (2004) *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an elderly patient with *Clostridium difficile* colitis. *Acta Clin Belg* 59, 223-224.

- Christensen BB, Atlung T, Hansen FG (1999) DnaA boxes are important elements in setting the initiation mass of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 2683–2688.
- Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 168, 171-178.
- Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM *et al.* (2004) Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted *Gpx1* and *Gpx2* genes. *Cancer Res* 64, 962-968.
- Claesson MJ, Li Y, Leahy S, Canchaya C, van Pijkeren JP *et al.* (2006) From the Cover: Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 6718-6723.
- Clavel T, Haller D (2007) Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 8: 25-43.
- Cobb BA, Wang Q, Tzianabos AO, Kasper DL (2004) Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell* 117, 677-687.
- Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P, Swings J (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev* 29, 147-167.
- Coffey JC, Bennett MW, Wang JH, O'Connell J, Neary P *et al.* (2001) Upregulation of Fas-Fas-L (CD95/CD95L)-mediated epithelial apoptosis - a putative role in pouchitis? *J Surg Res* 98, 27-32.
- Cohan FM (2001) Bacterial species and speciation. *Syst Biol* 50, 513-524.
- Cohan FM (2002) Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetica* 116, 359-370.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C *et al.* (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR *et al.* (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007-1011.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA *et al.* (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33, D294-D296.
- Collado MC, Calabuig M, Sanz Y (2007) Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol* 8, 9-14.
- Collado MC, Sanz Y (2007) Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *J Appl Microbiol* 103, 1147-1157.
- Collins SM (2001) Stress and the gastrointestinal tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G315-G318.
- Commane D, Hughes R, Shortt C, Rowland I (2005) The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res* 591, 276-289.
- Commission of the European Communities. Commission directive on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. Luxembourg City, Luxembourg: European Commission, 1996, L49, 17-96.
- Conly JM, Stein K, Worobetz L, Rutledge-Harding S (1994) The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *Am J Gastroenterol* 89, 915-923.

- Conn HO (1988) The hepatic encephalopathies. In: Conn HO, Bircher J, eds. Hepatic encephalopathy: management with lactulose and related carbohydrates, East Lansing, MI, Medi-Ed Press, pp. 3-14.
- Cooperstock MS, Zedd AJ (1983) Intestinal flora of infants. In Human Intestinal Microflora in Health and Disease. Hentges DJ, ed. New York, Academic Press, pp. 79-100.
- Cordwell SJ, Larsen MR, Cole RT, Walsh BJ (2002) Comparative proteomics of *Staphylococcus aureus* and the response of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains to Triton X-100. *Microbiology* 148, 2765-2781.
- Corfield MS, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC (1992) Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immunol* 60, 3971-3978.
- Corneau N, Emond E, LaPointe G (2004) Molecular characterization of three plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Plasmid* 51, 87-100.
- Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 137, 781S-790S.
- Cozzone AJ (2005) Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9, 198-213.
- Criscuoli V, Rizzuto MR, Cottone M (2006) Cytomegalovirus and inflammatory bowel disease: is there a link? *World J Gastroenterol* 12, 4813-4818.
- Crociani F, Matteuzzi D (1982) Urease activity in the genus *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol* 133, 417-423.
- Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD (1932) Regional enteritis: a pathological and clinical entity. *JAMA* 99, 1323-1329.
- Crump JA, Sulka AC, Langer AJ, Schaben C, Crielly AS *et al.* (2002) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med* 347, 555-560.
- Cukrowska B, Kozáková H, Øeháková Z, Šinkora J, Tlaskalová-Hogenová H (2001) Specific antibody and immunoglobulin responses after intestinal colonization of germ-free piglets with non-pathogenic *Escherichia coli* 086. *Immunobiology* 204, 425-433.
- Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, Enders C, Sonnenborn U, Schulze J *et al.* (2002) Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 55, 204-209.
- Cummings JH, Englyst HN (1987) Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr* 45, 1243-1255.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT (1987a) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221-1227.
- Cummings JH, Hill MJ, Bone ES, Branch WJ, Jenkins DJA (1987b) The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. Part II. Bacterial metabolites in feces and urine. *Am J Clin Nutr* 32, 2094-2101.
- Cummings JH (1994) Quantitating short chain fatty acid production in humans. In: Binder HJ, Cummings JH, Soergel K, eds., Short Chain Fatty Acids, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN (1996) Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br J Nutr* 75, 733-747.

- Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, Rossi B, Ramphal P (2000) *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun* 68, 5998-6004.
- Dahan S, Dalmasso G, Imbert V, Peyron J-F, Rampal P *et al.* (2003) *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. *Infect Immun* 71, 766-773.
- Daims H, Brul A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M (1999) Probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 22, 434-444.
- Daims H, Stoecker K, Wagner M (2005) Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of prokaryotes. In: Osborn AM, Smith CJ, eds. *Advanced methods in molecular microbial ecology*. Bios-Garland, Abingdon, UK.
- Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB (2002) Elongation factor Tu and E1 subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* 46, 1041-1051.
- Dalziel TK (1913) Chronic interstitial enteritis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 2, 1068.
- Daniel C, Repa A, Wild C, Pollak A, Pot B *et al.* (2006) Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v1. *Allergy* 61, 812-819.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Buolis P, Neut C, Glasser AL *et al.* (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412-421.
- Daveran-Mingot ML, Campo N, Ritzenthaler P, Le Bourgeois P (1998) A natural large chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* is mediated by homologous recombination between two insertion sequences. *J Bacteriol* 180, 4834-4842.
- Dayan AD (1997) Rifaximin (Normix®). Preclinical Expert Report. London, 1997.
- De Boever P, Wouters R, Verschaeve L, Berckmans P, Schoeters G *et al.* (2000) Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 709-714.
- De Groote MA, Frank DN, Dowell E, Glode MP, Pace NR (2005) *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 24, 278-280.
- De Smet I, van Hoorde L, Vande Woestyne M, Christiaens H *et al.* (1995) Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 79, 292-301.
- De Smet L, De Boever P, Verstraete W (1998) Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br J Nutr* 79, 185-194.
- De Vos WM, Bron PA, Kleerebezem M (2004) Post-genomics of lactic acid bacteria and other food-grade bacteria to discover gut functionality. *Curr Opin Biotechnol* 15, 86-93.
- De Vries W, Gerbrandy SJ, Stouthamer AH (1967) Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim Biophys Acta* 136, 415-425.
- De Vries W, Stouthamer AH (1968) Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xilose by bifidobacteria. *J Bacteriol* 96, 472-478.
- De Vries MC (2006) Analyzing global gene expression of *Lactobacillus plantarum* in the human gastro-intestinal tract. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

- De Wit O, Pochart P, Desjeux JF (1988) Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insuline and free fatty acid levels after lactose, milk, fresh or heated yogurt ingestion by healty young adults with or without lactose malabsorbtion. *Nutrition* 4, 131-135.
- Debbia EA, Soro O, Pesce A, Raggi M, Schito GC (1997) Selection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* does not occur in the presence of low concentrations of rifaximin. *Clin Microbiol Infect* 3, 147-151.
- Marchese A, Salerno A, Pesce A, Debbia EA Schito GC (2000) *In vitro* activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against *Clostridium difficile* and rate of selection of spontaneous resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia producing species. *Chemotherapy* 46, 253-266.
- Degnan BA, MacFarlane GT (1993) Transport and metabolism of glucose and arabinose in *Bifidobacterium breve*. *Arch Microbiol* 260, 144-151.
- Deguchi Y, Morishita T, Mutai M (1985) Comparative studies of synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agric Biol Chem* 49, 13-19.
- Deguchi Y, Makino K, Iwabichi A, Watanuki M, Yamashita T (1993) Selection of ammonia-assimilating bifidobacteria and their effect on ammonia levels in rat caecal contents and blood. *Microb Ecol Health Dis* 6, 85-94.
- Dehnert J (1957) Untersuchungen ueber die Gram-positive Stuhlflora des Brustmilchkinder. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig A* 169, 66-69.
- Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 434-464.
- Delgado S, Floréz AB, Mayo B (2005) Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr Microbiol* 50, 202-207.
- Derrien M, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G *et al.* (2004a) The intestinal mucosa as a habitat of the gut microbiota and a rational target for probiotic functionality and safety. *Microb Ecol Health Dis* 16, 137-144.
- Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM (2004b) *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1469-1476.
- Derrien M, Collado MC, Ben-Amor K, Salminen S, de Vos WM (2008) The mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 74, 1646-1648.
- Descombe JJ, Dubourg D, Picard M, Palazzini E (1994) Pharmacokinetic study of rifaximin after oral administration in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Res* 14, 51-56.
- Devereux R, Kane MD, Wilfrey J, Stahl DA (1992) Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 15, 601-609.
- Di Stefano M, Malservisi S, Veneto G, Ferrieri A, Corazza GR (2000) Rifaximin versus chlortetracycline in the short-term treatment of small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 551-556.
- Di Stefano M, Strocchi A, Malservisi S, Veneto G, Ferrieri A *et al.* (2000) Non-absorbable antibiotics for managing intestinal gas production and gas-related symptoms. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 1001-1008.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F *et al.* (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6025-6030.

- Dietch EA, Hempa AC, Specian RD, Bery RD (1992) A study of the relationships among survival gut origin, sepsis and bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *J Trauma* 32, 141-147.
- Ding WK, Shah NP (2007) Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J Food Sci* 72, M446-M450.
- Dionisi F, Golay PA, Elli M, Fay LB (1999) Stability of cyclopropane and conjugated linoleic acids during fatty acid quantification in lactic acid bacteria. *Lipids* 34, 1107-1115.
- Dolezalec J (1979) Use of the bifidogenic microflora in the manufacture of dried milks for feeding infants and children. *Prumysl Potravin* 30, 684-685.
- Doré J, Pochart P, Bernalier A, Goderel I, Morvan B *et al.* (1995) Enumeration of H<sub>2</sub>-utilizing methanogenic archaea, acetogenic and sulphate-reducing bacteria from human feces. *FEMS Microbiol Ecol* 17, 279-284.
- Doty RL, Sharman P, Applebaum SL, Giberson R, Siksorski L *et al.* (1984) Smell identification ability: changes with age. *Science* 22, 1441-1443.
- Douglas CW, Brown PR, Preston FE (1990) Platelet aggregation by oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 72, 63-68.
- Drasar BS, Hill MJ (1974) The metabolic activities of the gut bacteria. Human Intestinal Flora. (Drasar BS, Hill MJ, eds.), pp. 26-35. Academic Press Inc Ltd, London.
- Dring MM, Goulding CA, Trimble VI, Keegan D, Ryan AW *et al.* (2006) The pregnane X receptor locus is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 130, 341-348.
- Drouault S, Juste C, Marteau P, Renault P, Corthier G (2002) Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhance lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environ Microbiol* 68, 3166-3168.
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K *et al.* (1995) Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102, 448-455.
- Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M *et al.* (1999) T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 44, 812-818.
- Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C *et al.* (2006) Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12511-12516.
- Dunbar J, Barns SM, Ticknor LO, Kuske CR (2002) Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl Environ Microbiol* 68, 3035-3045.
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2004) Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* 70, 5810-5817.
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D *et al.* (2001) *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* 73, 386s-392s.
- Dunnick JK, O'Leary WM (1970) Correlation of bacterial lipid composition with antibiotic resistance. *J Bacteriol* 101, 892-900.
- DuPont HL (2006) New Insights and Directions in Travelers' Diarrhea. *Gastroenterol Clin N Am* 35, 337-353.
- DuPont HL (2008) Systematic review: prevention of travelers' diarrhea. *Aliment Pharmacol Ther* [Epub ahead of print].

- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L *et al.* (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638.
- Edwards CA, Parrett AM (2002) Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr* 88, S11-S18.
- Eftimiadi C, De Leo C, Schito GC (1986) Rapid disappearance from the intestinal tract of bacteria resistant to rifaximin. *Drugs Exptl Clin Res* XII, 979-981.
- Egert M, de Graaf AA, Smidt H, de Vos WM, Venema K (2006) Beyond diversity: functional microbiomics for the human colon. *Trends Microbiol* 14, 86-91.
- Eisen JA, Heidelberg JF, White O, Salzberg SL (2000) Evidence for symmetric chromosomal inversions around the replication origin in bacteria. *Genome Biol* 1, RESEARCH0011.
- Elliott PR, Forseit T, Darougar S, Treharne JD, Lennard-Jones JE (1981) Chlamydiae and inflammatory bowel disease. *Gut* 22, 25-27.
- Elliott SN, Wallace JL, McKnight W, Gall DG, Hardin JA *et al.* (2000) Bacterial colonization and healing of gastric ulcers: the effects of epidermal growth factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G105-G112.
- Embley TM, Stackebrandt E (1994) The molecular phylogeny and systematics of the *actinomycetes*. *Annu Rev Microbiol* 48, 257-289.
- Encheva V, Wait R, Begum S, Gharbia SE, Shah HN (2007) Protein expression diversity amongst serovars of *Salmonella enterica*. *Microbiology* 153, 4183-4193.
- Englyst KN, Englyst HN, Hudson GJ, Cole TJ, Cummings JH (1999) Rapidly available glucose in foods: an *in vitro* measurement that reflects the glycemic response. *Am J Clin Nutr* 69, 448-454.
- Ericsson CD (2003) Travellers' diarrhoea. *Int J Antimicrob Agents* 21, 116-124.
- Eutamene H, Bueno L (2007) Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress. *Gut* 56, 1495-1497.
- Evgenikos N, Bartolo DC, Hamer-Hodges DW, Ghosh S (2002) Assessment of ileoanal pouch inflammation by interleukin 1beta and interleukin 8 concentrations in the gut lumen. *Dis Colon Rectum* 45, 249-255.
- Fagarasan S, Honjo T (2003) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 3, 63-72.
- Fallingborg J (1999) Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull* 46, 183-196.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 92, 48-55.
- Fang H, Elina T, Heikki A, Seppo S (2000) Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29, 47-52.
- FAO/WHO (2001) Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. Cordoba, Argentina, 2001.
- FAO/WHO (2002) Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Available at: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
- Fasano A (2001) Intestinal zonulin: open sesame! *Gut* 49, 159-162.

- Favier CS, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 68, 219-226.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumourigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Federici F, Vitali B, Gotti R, Pasca MR, Gobbi S *et al.* (2004) Characterisation and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene from *Bifidobacterium lactis*. *Appl Environ Microbiol* 70, 5066-5073.
- Feleszko W, Jaworska J, Rha RD, Steinhausen S, Avagyan A *et al.* (2007) Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 37, 498-505.
- Felis GE, Dellaglio F (2007) Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 8, 44-61.
- Feng CG, Kullberg MC, Jankovic D, Cheever AW, Caspar P *et al.* (2002) Transgenic mice expressing human interleukin-10 in the antigen-presenting cell compartment show increased susceptibility to infection with *Mycobacterium avium* associated with decreased macrophage effector function and apoptosis. *Infect Immun* 70, 6672-6679.
- Ferianc P, Farewell A, Nystrom T (1998) The cadmium-stress stimulon of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 144, 1045-1050.
- Ferley J, Brey F, Pisani P, Parkin DM (2001) Globocan 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. In: IARC Cancer Base 5, Lyon IARC Press.
- Finegold SM, Howad RA, Vera LS (1974) Effect of diet on human intestinal fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr* 27, 1456-1469.
- Finegold SM, Vera LS, Paul TS, Harvey AE, Shirley ML *et al.* (1977) Fecal microbial flora in Seventh Day Adventist populations and control subjects. *Am J Clin Nutr* 30, 1781-1792.
- Fink LN, Zeuthen LH, Ferlazzo G, Frøkiær H (2007) Human antigen-presenting cells respond differently to gut-derived probiotic bacteria but mediate similar strain-dependent NK and T cell activation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51, 535-546.
- Finlay BB, Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 6, 136-169.
- Fiorucci S, Distrutti E, Mencarelli A, Barbanti M, Palazzini E *et al.* (2002) Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria mononuclear cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. *Digestion* 66, 246-256.
- Fischer S, Lerman L (1984) Sequence-determined DNA separations. *Annu Rev Biophys Bioeng* 13, 399-423.
- Fitzsimons NA, Akkermans AD, de Vos WM, Vaughan EE (2003) Bacterial gene expression detected in human faeces by reverse transcription-PCR. *J Microbiol Methods* 55, 133-140.
- Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O *et al.* (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 184, 5479-5490.
- Fleming SE, Choi SY, Fitch MD (1991) Absorption of short-chain fatty acids from the rat cecum *in vivo*. *J Nutr* 121, 1787-1797.
- Florey H (1955) Mucin and the protection of the body. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 143, 144-158.
- Florin THF, Zhu G, Kirk KM, Martin NG (2000) Shared and unique environmental factors determine the ecology of methanogens in humans and rats. *Am J Gastroenterol* 95, 2872-2879.

- Foligne B, Dessein R, Marceau M, Poiret S, Chamaillard M *et al.* (2007) Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology* 133, 862-874.
- Fozo EM, Kajfasz JK, Quivey RG Jr (2004) Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 238, 291-295.
- Francois P, Scherl A, Hochstrasser D, Schrenzel J (2007) Proteomic approach to investigate MRSA. *Methods Mol Biol* 391, 179-199.
- Frank AC, Lobry JR (1999) Asymmetric substitution patterns: a review of possible underlying mutational or selective mechanisms. *Gene* 238, 65-77.
- Frank DN, Amand AL St, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N *et al.* (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 13780-13785.
- Frankel WL, Zhang W, Singh A, Klurfeld DM, Don S *et al.* (1994) Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* 106, 375-380.
- Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F *et al.* (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64, 3336-3345.
- Fredenucci I, Chomarar M, Boucaud C, Flandrois JP (1998) *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient receiving Ultra-levure therapy. *Clin Infect Dis* 27, 222-223.
- Freitas M, Tavan E, Cayuela C, Diop L, Sapin C *et al.* (2003) Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biol Cell* 95, 503-506.
- Freter R, Abrams GD (1972) Function of various intestinal bacteria in converting germfree mice to the normal state. *Infect Immunol* 6, 119-126.
- Fric P, Zavoral M (2003) The effect of non-pathogenic *Escherichia coli* in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15, 313-315.
- Friedman G, George J (2000) Treatment of refractory "pouchitis" with probiotic and probiotic therapy. *Gastroenterology* 118, A4167.
- Friis H, Bodé S, Rumessen JJ, Gudmand-Hoyer E (1991) Effect of simethicone on lactulose-induced H<sub>2</sub> production and gastrointestinal symptoms. *Digestion* 49, 227-230.
- Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K *et al.* (2007) High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22, 1199-1204.
- Fujiwara S, Seto Y, Kimura A, Hashiba H (2001) Intestinal transit of an orally administered streptomycin-rifampicin-resistant variant of *Bifidobacterium longum* SBT2928: its long-term survival and effect on the intestinal microflora and metabolism. *J Appl Microbiol* 90, 43-52.
- Fujiwara D, Inoue S, Wakabayashi H, Fujii T (2004) The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 205-215.
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. A review. *J Appl Bacteriol* 66, 365-378.

- Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV *et al.* (2005) Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 54, 242-249.
- Galan JE, Pace J, Hayman MJ (1992) Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *S. typhimurium*. *Nature* 357, 588-589.
- Galbraith EA, Antonopoulos DA, White BA (2004) Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environ Microbiol* 6, 928-937.
- Gao B, Gupta RS (2005) Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum *Actinobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2401-2412.
- Gao B, Gupta RS (2006) Signature proteins that are distinctive characteristics of *Actinobacteria* and their subgroups. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90, 69-91.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H *et al.* (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 7877-7882.
- Garrity GM, Bell JA, Liburn TG (2004) Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>.
- Gasser F (1994) Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 92, 45-67.
- Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD (1994) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the complex. *Infect Immun* 62, 2132-2134.
- Gerard L, Garey KW, DuPont HL (2005) Rifaximin: a nonabsorbable rifamycin antibiotic for use in nonsystemic gastrointestinal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3, 201-211.
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T *et al.* (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3, 733-739.
- Gewirtz AT, Liu Y, Sitaraman SV, Madara JL (2002) Intestinal epithelial pathobiology: past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, 851-867.
- Giaccari S, Tronci S, Falconieri M, Ferrieri A. (1993) Long-term treatment with rifaximin and lactobacilli in post-diverticulitic stenoses of the colon. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 15, 29-34.
- Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT (1988) Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl Environ Microbiol* 54, 2750-2755.
- Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP (1992) Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells *in vitro*. *J Gastroenterol Hepatol* 7, 165-172.
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK (2001) Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 74, 833-839.

- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ *et al.* (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355-1359.
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 49, 377-381.
- Gillis JC, Brogden RN (1995) Rifaximin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential in conditions mediated by gastrointestinal bacteria. *Drugs* 49, 467-484.
- Gillum JG, Israel DS, Polk RE (1993) Pharmacokinetic drug interactions with antimicrobial agents. *Clin Pharmacokinet* 25, 450-482.
- Gilman J, Cashman KD (2006) The effect of probiotic bacteria on trans-epithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells. *Curr Issues Intest Microbiol* 7, 1-5.
- Gionchetti P, Rizzello F, Ferrieri A, Venturi A, Brignola C *et al.* (1999) Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid treatment: a double-blind, placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci* 44, 1220-1221.
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D *et al.* (2000) Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patient with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119, 305-309.
- Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM *et al.* (2003a) Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 124, 1202-1209.
- Gionchetti P, Amadini C, Rizzello F, Venturi A, Poggioli G *et al.* (2003b) Diagnosis and treatment of pouchitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 75-87.
- Gionchetti P, Rizzello F, Lammers KM, Morselli C, Tambasco R *et al.* (2006) Antimicrobials in the management of inflammatory bowel disease. *Digestion* 73, 77-85.
- Gionchetti P, Rizzello F, Poggioli G, Pierangeli F, Laureti S *et al.* (2007a) Oral budesonide in the treatment of chronic refractory pouchitis. *Aliment Pharmacol Ther* 25, 1231-1236.
- Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, Poggioli G, Tambasco R *et al.* (2007b) High-dose probiotics for the treatment of active pouchitis. *Dis Colon Rectum* 50, 2075-2082.
- Glick M, Sall T, Zilliken F, Mudd S (1960) Morphological changes of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell wall precursor. *Biochim Biophys Acta* 37, 361-363.
- Gluck U, Gebbers JO (2003) Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and  $\beta$ -hemolytic streptococci). *Am J Clin Nutr* 77, 517-520.
- Gomase VS, Changbhale SS, Patil SA, Kale KV (2008) Metabolomics. *Curr Drug Metab* 9, 89-98.
- Gómez-Zavaglia A, Kociubinski G, Pérez P, Disalvo E, De Antoni G (2002) Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 93, 794-799.
- Gomi H, Jiang ZD, Adachi JA, Ashley D, Lowe B *et al.* (2001) *In vitro* antimicrobial susceptibility testing of bacterial enteropathogens causing travelers' diarrhea in four geographic regions. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 212-216.
- González R, Blancas A, Santillana R, Azaola A, Wachter C (2004) Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 606-610.
- Goodacre R (2007) Metabolomics of a superorganism. *J Nutr* 137, 259S-266S.
- Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 37, 189-216.

- Gooley A, Packer NH (1997) Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. In: Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF, eds., Springer, Germany, p. 65.
- Gorbach SL, Goldin BR (1989) *Lactobacillus* strains and methods of isolation. United States, US patent 4, 839, 281.
- Görg A, Postel W, Günther S (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Gosselink MP, Schouten WR, van Lieshout LMC, Hop WCJ, Laman JD *et al.* (2004) Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Dis Colon Rectum* 47, 876-884.
- Gosselink MP, Schouten WR, van Lieshout LM, Hop WC, Laman JD *et al.* (2004) Eradication of pathogenic bacteria and restoration of normal pouch flora: comparison of metronidazole and ciprofloxacin in the treatment of pouchitis. *Dis Colon Rectum* 47, 1519-1525.
- Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC *et al.* (2006) *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via Toll-like receptor 2-and Toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun* 74, 4075-4082.
- Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD (2004) Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells an mucin. *Infect Immun* 72, 2160-2169.
- Granette C, Muller-Alouf H, Geoffroy M, Goudercourt D, Turneer M *et al.* (2002) Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and *in vivo* persistence. *Vaccine* 20, 3304-3309.
- Granette C, Muller-Alouf H, Hols P, Goudercourt D, Delcour J *et al.* (2004) Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect Immun* 72, 2731-2737.
- Green SL (1978) Case report: fatal anaerobic pulmonary infection due to *Bifidobacterium eriksonii*. *Postgrad Med* 63, 187-188.
- Greenstein RJ (2003) Is Crohn's disease caused by a *mycobacterium*: comparisons with leprosy, tuberculosis and Johne's disease? *The Lancet Infect Dis* 3, 507-514.
- Grill JP, Perrin S, Schneider F (2000) Bile salt toxicity to some bifidobacteria strains: role of conjugated bile salt hydrolase and pH. *Can J Microbiol* 46, 878-884.
- Grogan DW, Cronan JE Jr (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Molec Rev* 45, 429-441.
- Grohmann E, Muth G, Espinosa M (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 277-301.
- Gross C, Engbaek F, Flammang T, Burgess R (1976) Rapid micromethod for the purification of *Escherichia coli* ribonucleic acid polymerase and the preparation of bacterial extracts active in ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* 128, 382-389.
- Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G *et al.* (2004) Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 186, 5432-5441.
- Grundy FJ, Henkin TM (1998) The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 30, 737-749.
- Guarner F, Malagelada JR (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512-519.

- Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E (2007) Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* 92, 64-66.
- Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L *et al.* (2001) Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* 32, 331-350.
- Guerzoni ME, Lanciotti R, Cocconcelli PS (2001) Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology* 147, 2255-2264.
- Guglielmetti S, Karp M, Mora D, Tamagnini I, Parini C (2007) Molecular characterization of *Bifidobacterium longum* biovar *longum* NAL8 plasmids and construction of a novel replicon screening system. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 1053-1061.
- Gunzer F, Hennig-Pauka I, Waldmann KH, Sandhoff R, Grone HJ *et al.* (2002) Gnotobiotic piglets develop thrombotic microangiopathy after oral infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Am J Clin Pathol* 118, 364-375.
- Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S (2000) Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary openlabel study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31, 453-457.
- Guslandi M (2000) *Saccharomyces boulardii* in the maintenance of Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 14, A32.
- Guslandi M, Giollo P, Testoni PA (2004) Corticosteroid-sparing effect of rifaximin, a nonabsorbable oral antibiotic, in active ulcerative colitis: preliminary clinical experience. *Curr Therapeut Res* 65, 292-296.
- Guslandi M, Petrone MC, Testoni PA (2006) Rifaximin for active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 12, 335.
- Gygi SP, Cothals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R (2000) Evaluation of the two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9390-9395.
- Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ (1990) Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 65, 185-188.
- Haller D, Holt L, Kim SC, Schwabe RF, Sartor RB *et al.* (2003) Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits non-pathogenic gramnegative bacteria-induced NF- $\kappa$ B recruitment to the interleukin-6 gene promoter in intestinal epithelial cells through modulation of histone acetylation. *J Biol Chem* 278, 23851-23860.
- Haller D (2006) Intestinal epithelial cell signalling and host-derived negative regulators under chronic inflammation: to be or not to be activated determines the balance towards commensal bacteria. *Neurogastroenterol Motil* 18, 184-199.
- Hallstrom M, Eerola E, Vuono R, Janas M, Tammela O (2004) Effects of mode of delivery and necrotising enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23, 463-470.
- Han W, Mercenier A, Ait-Belgnaoui A, Pavan S, Lamine F *et al.* (2006) Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflamm Bowel Dis* 12, 1044-1052.
- Hanada M, Feng J, Hemmings BA (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1697, 3-16.
- Handelsman J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 669-685.
- Hanniffy S, Wiedermann U, Repa A, Mercenier A, Daniel C *et al.* (2004) Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Adv Appl Microbiol* 56, 1-64.

- Harmsen HJM, Gibson GR, Elfferich P, Raangs GC, Wildeboer-Veloo ACM *et al.* (1999) Comparison of viable cell counts and fluorescence *in situ* hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 183, 125-129.
- Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijin N *et al.* (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30, 61-67.
- Harmsen HJM, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW (2002) Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68, 2982-2990.
- Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F *et al.* (2004) Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 53, 1602-1609.
- Hartemink R, Kok BJ, Weenk GH, Rombouts FM (1996) Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for *bifidobacteria*. *J Microbiol Methods* 27, 33-43.
- Hartmann G, Honikel KO, Knüsel F, Nüesch J (1967) The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim Biophys Acta* 145, 843-844.
- Hassinen JB, Durbin GT, Tomarelli RM, Bernhart FW (1951) The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *J Bacteriol* 62, 771-777.
- Hatakeyama M, Higashi H (2005) *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 96, 835-843.
- Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T *et al.* (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 322, 1327.
- Hatch M, Cornelius J, Allison M, Sidhu H, Peck A *et al.* (2006) *Oxalobacter* sp. reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. *Kidney Int* 69, 691-698.
- Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T *et al.* (2002) Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122, 1987-2000.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC *et al.* (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y (2002a) Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 46, 535-548.
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y (2002b) Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol Immunol* 46, 819-831.
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y (2003) Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol* 47, 557-570.
- Heczko PB, Strus M, Kochan P (2006) Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. *J Physiol Pharmacol* 57, 5-12.
- Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL *et al.* (2002) Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 68, 114-123.

- Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzaeg P (1996) Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 89, 494-501.
- Helin T, Haahtela S, Haahtela T (2002) No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 57, 243-246.
- Helwig U, Gionchetti P, Rizzello F, Lammers K, Kühbacher T *et al.* (2004) CXC and CC chemokine expression in inflamed and noninflamed pelvic ileal pouch tissue. *Int J Colorectal Dis* 19, 165-170.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S *et al.* (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hendrix RW, Smith MC, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2192-2197.
- Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viard JP, Ricour C *et al.* (2000) Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 16-20.
- Henry S, D'Hondt L, Andre M, Holemans X, Canon JL (2004) *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a head and neck cancer patient: a case report and review of the literature. *Acta Clin Belg* 59, 220-222.
- Herbert BR, Molloy MP, Gooley AA, Walsh BJ, Bryson WG *et al.* (1998) Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 19, 845-851.
- Herias MV, Hesse C, Telemo E, Midtvedt T, Hanson LA *et al.* (1999) Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin Exp Immunol* 116, 283-290.
- Herrera L, Jimenez S, Valverde A, Garcia-Aranda MA, Saez-Nieto JA (2003) Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996-2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. *Int J Antimicrob Agents* 21, 403-408.
- Hill MJ (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 6, S43-S45.
- Hillier S, Krohn MA, Watts DH, Wolner-Hanssen P, Eschenbach D (1990) Microbiologic efficacy of intravaginal clindamycin cream for the treatment of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 76, 407-413.
- Hinkle DC, Mangel WF, Chamberlin MJ (1972) Studies of the binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to DNA. The effect of rifampicin on binding and on RNA chain initiation. *J Mol Biol* 70, 209-220.
- Hirayama K, Rafter J (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2, 681-686.
- Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormack BA *et al.* (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 993-1000.
- Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y (2006) Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 117, 696-702.
- Hodgkinson A (1977) Oxalate content of foods and nutrition. In *Oxalic acid in biology and medicine*, ed. Hodgkinson A, pp. 193-212. London, Academic Press.
- Hoentjen F, Harmsen HJM, Braat H, Torrice CD, Mann BA *et al.* (2003) Antibiotic with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut* 52, 1721-1727.

- Hokama S, Honma Y, Toma C, Ogawa Y (2000) Oxalate-degrading *Enterococcus faecalis*. *Microbiol Immunol* 44, 235-240.
- Hokama S, Toma C, Iwanaga M, Morozumi M, Sugaya K *et al.* (2005) Oxalate-degrading *Providencia rettgeri* isolated from human stools. *Int J Urology* 12, 533-538.
- Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrrie E, Flint HJ (2002) Assessment of microbial diversity in human clonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 33-39.
- Holton J, Vaira D, Menegatti M, Barbara L (1995) The susceptibility of *Helicobacter pylori* to the rifamycin, rifaximin. *J Antimicrob Chemother* 35, 545-549.
- Homma N (1988) Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobacteria Microflora* 7, 35-39.
- Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI (1999) A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9833-9838.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG *et al.* (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291, 881-884.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 22, 283-307.
- Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI (2003) Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 4, 269-273.
- Hoover WW, Gerlach EH, Hoban DJ, Eliopoulos GM, Pfäller MA *et al.* (1993) Antimicrobial activity and spectrum of rifaximin, a new topical rifamycin derivative. *Diagn Microbiol Infect Dis* 16, 111-118.
- Hopkins MJ, Macfarlane GT (2002) Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 51, 448-454.
- Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furrrie E, Fite A, Macfarlane S (2005) Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiol Ecol* 54, 77-85.
- Hoskins LC, Agustines M, McKee WB, Boulding ET, Kriaris M *et al.* (1985) Mucin degradation in the human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest* 75, 944-953.
- Hosono A, Wardojo R, Otani H (1990) Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric Biol Chem* 54, 1693-1700.
- Hoyles L, Collins MD, Falsen E, Nikolaitchouk N, McCartney AL (2004) Transfer of members of the genus *Falcivibrio* to the genus *Mobiluncus*, and emended description of the genus *Mobiluncus* system. *Appl Microbiol* 27, 72-83.
- Hsieh S-Y, Shih T-C, Yeh C-Y, Lin C-J, Chou Y-Y *et al.* (2006) Comparative proteomic studies on the pathogenesis of human ulcerative colitis. *Proteomics* 6, 5322-5331.
- Huang DB, Okhuysen PC, Jiang ZD, DuPont HL (2004) Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am J Gastroenterol* 99, 383-389.
- Hughenoltz P, Goebel BM, Pace NR (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180, 4765-4774.

- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP *et al.* (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.
- Hui J, Gordon N, Kajioka R (1977) Permeability barrier to rifampin in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 11, 773-779.
- Humbert R, Altendorf K (1989) Defective gamma subunit of ATP synthase (F1F0) from *Escherichia coli* leads to resistance to aminoglycoside antibiotics. *J Bacteriol* 171, 1435-1444.
- Husain I, Poupard JA, Norris RF (1972) Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*. *J Bacteriol* 111, 841-844.
- Husebye E, Hellstrom PM, Midtvedt T (1994) Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Dig Dis Sci* 39, 946-956.
- Ibrahim SA, Bezkorovainy A (1993) Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. *J Food Prot* 56, 713-715.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Spinose M, Kikuchi H *et al.* (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21, 526-531.
- Ikeda M, Nakagawa S (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 62, 99-109.
- Isaacs KL, Sandler RS, Abreu M, Picco MF, Hanauer SB *et al.* (2007) Rifaximin for the treatment of active pouchitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 13, 1250-1255.
- Ishibashi N, Yamazaki S (2001) Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 73, 465s-470s.
- Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A *et al.* (2003) Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 22, 56-63.
- Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H *et al.* (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 14925-14930.
- Ismail AS, Hooper LV (2005) Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, 779-784.
- Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S (2002) Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 50, 54-59.
- Ito H, Miura N, Masai M, Yamamoto K, Hara T (1996) Reduction of oxalate content of foods by the oxalate degrading bacterium, *Eubacterium lentum* WYH-1. *Int J Urol* 3, 31-34.
- Ivanov D, Emonet C, Foata F, Affolter M, Delley M *et al.* (2006) A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J Biol Chem* 281, 17246-17252.
- Iwabuchi N, Takahashi N, Xiao J-Z, Miyaji K, Iwatsuki K (2007) *In vitro* Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria. *Microbiol Immunol* 51, 649-660.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59, 171-200.
- James LF (1972) Oxalate toxicosis. *Clin Toxicol* 5, 231-243.
- Jewell AP (2005) Is the liver an important site for the development of immune tolerance to tumours? *Medical Hypotheses* 64, 751-54.

- Jian W, Zhu L, Dong X (2001) New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1633-1638.
- Jiang ZD, Ke S, Palazzini E, Riopel L, DuPont HL (2000) *In vitro* activity and fecal concentration of rifaximin after oral administration. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2205-2206.
- Jiang ZD, DuPont HL (2005) Rifaximin: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity. A review. *Chemotherapy* 51, 67-72.
- Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D *et al.* (2004) DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 126, 1358-1373.
- Jin DJ, Gross CA (1988) Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 202, 45-58.
- Johnston DE, McClure WR (1976) Abortive initiation of *in vitro* RNA synthesis on bacteriophage  $\lambda$  DNA polymerase. In: Losick R, Chamberlin M, eds. RNA polymerase. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 413-428.
- Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ, Lappin-Scott H (2001) Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet* 357, 40-41.
- Kagnoff MF, Eckmann L (1997) Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 100, 6-10.
- Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H, Vesikari T (1995) Viable versus inactivated *lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 72, 51-53.
- Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 1869-1871.
- Kamata H, Shibukawa Y, Oka SI, Hirata H (2000) Epidermal growth factor receptor is modulated by redox through multiple mechanisms. Effects of reductants and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Eur J Biochem* 267, 1933-1944.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* 32, D277-D280.
- Kandler O, Lauer E (1974) Neuere Vorstellungen zur Taxonomie der Bifidobacterien. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1, Orig Reihe A228*, pp. 29-45.
- Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299-2301.
- Karlsson S, Persson M, Carlsson GE (1991) Mandibular movement and velocity in relation to state of dentition and age. *J Oral Rehabil* 18, 1-8.
- Kastner S, Perreten V, Bleuler H, Hugenschmidt G, Lacroix C *et al.* (2005) Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Syst Appl Microbiol* 29, 145-155.
- Kelly D, Conway S (2005) Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Mol Immunol* 42, 895-901.
- Kelsall B, Strober W (1997) Peyer's patch dendritic cells and the induction of mucosal immune responses. *Res Immunol* 148, 490-498.
- Kenrick KG, Margolis J (1970) Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem* 33, 204-207.

- Kessler C, Hualfeng M, Hartmann GR (1982) Competition of rifampicin with binding of substrate and RNA to RNA polymerase. *Eur J Biochem* 122, 515-518.
- Kilara A, Shahani KM (1976) Lactose activity of cultured and acidified dairy products. *J Dairy Sci* 61, 2031-2035.
- Kim BH, Kim S, Kim HG, Lee J, Lee IS *et al.* (2005) The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Microbiololy* 151, 209-218.
- Kirjavainen PV, El Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF (1999) The effect of orally administered viable probiotic an dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26, 131-135.
- Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E (2002) Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* 51, 51-55.
- Kirjavainen PV, Salminen SJ, Isolauri E (2003) Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36, 223-227.
- Kitahara M, Takamine F, Imamura T, Benno Y (2000) Assignment of *Eubacterium* sp. VPI 12708 and related strains with high bile acid 7  $\alpha$ -dehydroxylating activity to *Clostridium scindens* and proposal of *Clostridium hylemonae* sp. *nov.* isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 971-978.
- Klaassens ES, de Vos WM, Vaughan EE (2007) Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 73, 1388-1392.
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12, 39-85.
- Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66, 1328-1333.
- Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24, 895-904.
- Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP *et al.* (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1990-1995.
- Kliwer SA, Goowin B, Willson TM (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23, 687-702.
- Klijn A, Mercenier A, Arigoni F (2005) Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29, 491-509.
- Klingberg TD, Budde BB (2006) The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int J Food Microbiol* 109, 157-159.
- Knodler LA, Finlay BB, Steele-Mortimer O (2005) The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem* 280, 9058-9064.
- Kojima M, Suda S, Hotta S, Hamada K (1970a) Induction of pleomorphology and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*. *J Bacteriol* 102, 217-220.
- Kojima M, Suda S, Hotta S, Hamada K (1970b) Necessity of calcium ion for cell division. *J Bacteriol* 104, 1010-1013.
- Kok RG, de Waal A, Schut F, Welling GW, Weenk G *et al.* (1996) Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl Environ Microbiol* 62, 3668-3672.
- Kolsto AB (1997) Dynamic bacterial genome organization. *Mol Microbiol* 24, 241-248.

- Komanduri S, Gillevet PM, Sikaroodi M, Mutlu E, Keshavarzian A (2007) Dysbiosis in pouchitis: evidence of unique microfloral patterns in pouch inflammation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5, 352-360.
- Konstantinov SR, Smidt H, Willem M, de Vos WM (2005) Representational difference analysis and real-time PCR for strain-specific quantification of *Lactobacillus sobrius* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 71, 7578-7581.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H (2003) Review: evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *Int Dairy J* 13, 3-13.
- Krinos CM, Coyne MJ, Weinacht KG, Tzianabos AO, Kasper DL *et al.* (2001) Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature* 414, 555-558.
- Kroes I, Lepp PW, Relman DA (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14547-14552.
- Krüger C, Hu Y, Pan Q, Marcotte H, Hultberg A *et al.* (2002) *In situ* delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol* 20, 702-706.
- Kruis W, Schultz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G *et al.* (1997) Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 11, 853-858.
- Kruis W, Fric P, Stolte S (2001) Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with *Escherichia coli* Nissle 1917 and with standard mesalamine. *Gastroenterology* 120, A680.
- Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B *et al.* (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-1623.
- Krzewinski F, Brassart C, Gavini F, Bouquelet F (1996) Characterisation of the lactose transport system in the strain *Bifidobacterium bifidum* DSM20082. Université des Sciences et Technologies de Lille, France 32, 301-307.
- Krzewinski F, Brassart C, Gavini F, Bouquelet F (1997) Glucose and galactose transport in *Bifidobacterium bifidum* DSM20082. Université des Sciences et Technologies de Lille, France 35, 175-179.
- Kühbacher T, Ott SJ, Helwig U, Mimura T, Rizzello F *et al.* (2006) Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut* 55, 833-841.
- Kuisma J, Mentula S, Jarvinen H, Kahri A, Saxelin M *et al.* (2003) Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment Pharmacol Ther* 17, 509-515.
- Kullen MJ, Brady LJ, O'Sullivan DJ (1997) Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 154, 377-383.
- Kumprecht I, Gasnarek Z, Zobak P (1984) The effect of a single and continuous administration of *Streptococcus faecium* M-74 germs on the growth of broilers and on metabolic processes in broiler. *Zivoc Vyr* 29, 949-955.
- Kunin V, Ouzounis CA (2003) The balance of driving forces during genome evolution in prokaryotes. *Genome Res* 13, 1589-1594.
- Kunisawa T (1995) Identification and chromosomal distribution of DNA sequence segments conserved since divergence of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Mol Evol* 40, 585-593.
- Kunz AN, Noel JM, Fairchok MP. Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38, 457-458.

- Kurdi P, Kawanishi K, Mizutani K, Yokota A (2006) Mechanism of growth inhibition by free bile acids in *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *J Bacteriol* 188, 1979-1986.
- Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H *et al.* (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 14, 169-181.
- Kwak C, Jeong BC, Ku JH, Kim HH, Lee JJ *et al.* (2006) Prevention of nephrolithiasis by *Lactobacillus* in stone-forming rats: a preliminary study. *Urol Res* 34, 265-270.
- Laake KO, Line PD, Aabakken L, Lotveit T, Bakka A *et al.* (2003) Assessment of mucosal inflammation and circulation in response to probiotics in patients operated with ileal pouch anal anastomosis for ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 38, 409-414.
- Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen TK (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* 25, 531-552.
- Lahteenmaki K, Edelman S, Korhonen TK (2005) Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol* 13, 79-85.
- Lamhonwah AM, Skaug J, Scherer SW, Tein I (2003) A third human carnitine/organic cation transporter (OCTN3) as a candidate for the 5q31 Crohn's disease locus (IBD5). *Biochem Biophys Res Commun* 301, 98-101.
- Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A *et al.* (2002) Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol* 97, 1182-1186.
- Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F *et al.* (2003) Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38, 165-172.
- Lamouliatte H (1989) Treatment of chronic gastritis associated with *Campylobacter pylori*. *Gastroenterol Clin Biol* 13, 101B-106B.
- Lan GQ, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW (2002) Efficacy of supplementation a phytase-producing bacterial culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult Sci* 81, 1522-1532.
- Lan JG, Cruickshank SM, Singh JC, Farrar M, Lodge JP *et al.* (2005) Different cytokine response of primary colonic epithelial cells to commensal bacteria. *World J Gastroenterol* 11, 3375-3384.
- Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J *et al.* (2005) *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 115, 178-181.
- Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR *et al.* (1995) Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 61, 3069-3075.
- Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G *et al.* (2004) Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* 127, 26-40.
- Lata J, Novotný I, Příbramská V, Juránková J, Frič P *et al.* (2007) The effect of probiotics on gut flora, level of endotoxin and Child-Pugh score in cirrhotic patients: results of a double-blind randomized study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19, 1111-1113.
- Latella G, Pimpo MT, Sottili S, Zippi M, Viscido A *et al.* (2003) Rifaximin improves symptoms of acquired uncomplicated diverticular disease of the colon. *Int J Colorectal Dis* 18, 55-62.

- Lauritano EC, Gabrielli M, Lupascu A, Santoliquido A, Nucera G *et al.* (2005) Rifaximin dose-finding study for the treatment of small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 22, 31-35.
- Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrøm K, Rajilic M, Vaughan EE *et al.* (2005) Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 71, 4153-4155.
- Lay C, Sutren M, Rochet V, Saunier K, Doré J *et al.* (2005) Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ Microbiol* 7, 933-946.
- Lechevalier HA, Lechevalier MP (1967) Biology of *actinomycetes*. *Annu Rev Microbiol* 21, 71-100.
- Lederberg J (2000) Infectious history. *Science* 288, 287-293.
- Lee A (1984) Neglected niches: the microbial ecology of the gastrointestinal tract. In: *Advances in Microbial Ecology*, Marshal KC, ed. New York, Plenum Press, pp. 115-162.
- Lee SK, Kim YB, Ji GE (1997) Note: purification of amylase secreted from *Bifidobacterium adolescentis*. *J Appl Microbiol* 83, 267-272.
- Lee JH, O'Sullivan DJ (2006) Sequence analysis of two cryptic plasmids from *Bifidobacterium longum* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *Appl Environ Microbiol* 72, 527-535.
- Lepage P (2005) La microflore associée à la muqueuse intestinale chez l'homme dans le contexte de la maladie de Crohn. PhD Thesis. Université Paris XI, pp. 117-128.
- Lepage P, Colombet J, Marteau P, Sime-Ngando T, Doré J *et al.* (2008) Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 57, 424-425.
- Lerat E, Ochman H (2004) Psi-Phi: exploring the outer limits of bacterial pseudogenes. *Genome Res* 14, 2273-2278.
- Lherm T, Monet C, Nougère B, Soulier M, Larbi D *et al.* (2002) Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. *Intensive Care Med* 28, 797-801.
- Lestin F, Pertschy A, Rimek D (2003) Fungemia after oral treatment with *Saccharomyces boulardii* in a patient with multiple comorbidities. *Dtsch Med Wochenschr* 128, 2531-2533.
- Levitt MD, Bond JH (1970) Volume, composition and source of intestinal gas. *Gastroenterology* 59, 921-929.
- Levitt MD, Lasser RB, Schwartz JS, Bond JH (1976) Studies of a flatulent patient. *N Engl J Med* 295, 260-262.
- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD *et al.* (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 11070-11075.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837-848.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
- Li T, Johansson I, Hay DI, Stromberg N (1999) Strains of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* exhibit structurally variant fimbrial subunit proteins and bind to different peptide motifs in salivary proteins. *Infect Immunol* 67, 2053-2059.
- Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ *et al.* (2005) The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12344-12349.

- Li J, Wang L, Hashimoto Y, Tsao CY, Wood TK *et al.* (2006) A stochastic model of *Escherichia coli* AI-2 quorum signal circuit reveals alternative synthesis pathways. *Mol Syst Biol* 2, 67.
- Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S *et al.* (2008) Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2117-2122.
- Liepke C, Adermann K, Raida M, Magert HJ, Frossmann WG *et al.* (2002) Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur J Biochem* 269, 712-718.
- Lieske JC, Goldfarb DS, De Simone C, Reigner C (2005) Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria. *Kidney Int* 68, 1244-1249.
- Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D *et al.* (2000) *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47, 646-652.
- Lilly DM, Stillwell RH (1965) Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 47, 747-748.
- Limdi JK, O'Neill C, McLaughlin J (2006) Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology? *World J Gastroenterol* 12, 5447-5457.
- Ling WH (1995) Diet and colonic microflora interaction in colorectal cancer. *Nutr Res* 15, 439-454.
- Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H *et al.* (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445, 915-918.
- Lisitsyn NA (1995) Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Trends Genet* 11, 303-307.
- Liu TS, Musch MW, Sugi K, Walsh-Reitz MM, Ropeleski MJ *et al.* (2003) Protective role of Hsp72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1073-C1082.
- Liu M, van Enckevort FH, Siezen RJ (2005) Genome update: lactic acid bacteria genome sequencing is booming. *Microbiology* 151, 3811-3814.
- Livengood CH III, Thomason TL, Hill GB (1990a) Bacterial vaginosis: treatment with topical intravaginal clindamycin phosphate. *Obstet Gynecol* 76, 118-123.
- Livengood CH III, Thomason TL, Hill GB (1990b) Bacterial vaginosis: diagnostic and pathogenetic findings during topical clindamycin therapy. *Am J Obstet Gynecol* 163, 515-520.
- Lopez-Boado YS, Wilson CL, Hooper LV, Gordon JI, Hultgren SJ *et al.* (2000) Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. *J Cell Biol* 148, 1305-1315.
- Lowder JF, Johnson RS (1987) The generation of the rifamycin binding site in the  $\beta$  subunit of *E. coli* RNA polymerase through subunit interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 147, 1129-1136.
- Ludwig W, Klenk HP (2001) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Garrity GM, ed. New York, USA, Springer, pp. 49-66.
- Lund B, Edlund C (2001) Probiotic *Enterococcus faecium* strain is possible recipient of the vanA gene cluster. *Clin Infect Dis* 32, 1-11.
- Lykke N (1998) T cell and cytokine regulation of the IgA response. *Chem Immunol* 71, 209-234.

- Lykidis A, Mavromatis K, Ivanova N, Anderson I, Land M *et al.* (2007) Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *J Bacteriol* 189, 2477-2486.
- M'Koma AE, Wise PE, Muldoon RL, Schwartz DA, Washington MK *et al.* (2007) Evolution of the restorative proctocolectomy and its effects on gastrointestinal hormones. *Int J Colorectal Dis* 22, 1143-1163.
- Ma D, Forsythe P, Bienenstock J (2004) Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 72, 5308-5314.
- Ma X, Shah YM, Guo GL, Wang T, Krausz KW *et al.* (2007) Rifaximin is a gut-specific human pregnane X receptor activator. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 391-398.
- Maassen CB, Laman JD, den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FJ, van Holten-Neelen JC *et al.* (1999) Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* 17, 2117-2128.
- Maassen CBM, van Holten-Neelen JCPA, Balk F, den Bak-Glashouwer MJF, Leer RJ *et al.* (2000) Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 18, 2613-2623.
- MacConaill LE, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2003) Investigation of protein export in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 69, 6994-7001.
- MacDonough FE, Wells P, Wong NP (1983) Mechanism of lactose utilisation by lactic acid streptococci: enzymatic and genetic analysis. *J Bacteriol* 102, 804-809.
- Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C (1986) Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* 132, 1647-1656.
- Macfarlane GT, Englyst HN (1986) Starch utilization by the human large intestinal microflora. *J Appl Bacteriol* 60, 195-201.
- Macfarlane GT, Cummings JH, Macfarlane S, Gibson GR (1989) Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. *J Appl Bacteriol* 67, 520-527.
- Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH (1992) Comparison of fermentations reactions in different regions of the human colon. *Appl Bacteriol* 72, 57-64.
- Macfarlane GT, Gibson GR, Drasar BS, Cummings JH (1995) Metabolic significance of the colonic microflora. In: *Gastrointestinal and Oesophageal Physiology*, Whitehead R, ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, pp. 249-274.
- Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR (1998) Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb Ecol* 35, 180-187.
- Macfarlane GT, Cummings JH (2002) Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* 15, 1-6.
- Macfarlane S, Macfarlane GT (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *P Nutr Soc* 62, 67-72.
- Macfarlane S, Woodmansey EJ, Macfarlane GT (2005) Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol* 71, 7483-7492.
- Macfarlane S, Dillon JF (2007) Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 102, 1187-1196.

- Macfarlane GT, Macfarlane S (2007) Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr Opin Biotechnol* 18, 156-162.
- Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA (2003) Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827-833.
- Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC, Hamilton-Miller JM (1999) *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 5, 290-292.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69, 1035S-1045S.
- Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I (1996) Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 38, 365-375.
- Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hergartner R *et al.* (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222-2226.
- Macpherson AJ, Harris NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 478-485.
- Macpherson AJ, Uhr T (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662-1665.
- Madden MV, McIntyre AS, Nicholls RJ (1994) Double-blind crossover trial of metronidazole versus placebo in chronic unremitting pouchitis. *Dig Dis Sci* 39, 1193-1196.
- Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H *et al.* (2001) Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580-591.
- Mai V, Morris JG Jr (2004) Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J Nutr* 134, 459-464.
- Majewski J, Zawadzki P, Pickerill P, Cohan FM, Dowson CG (2000) Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. *J Bacteriol* 182, 1016-1023.
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B *et al.* (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 15611-15616.
- Malchow HA (1997) Crohn's disease and *Escherichia coli*: a new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 25, 653-658.
- Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E (1996) Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann Nutr Metab* 40, 137-145.
- Mandar R, Mikelsaar M (1996) Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate* 69, 30-35.
- Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl Environ Microbiol* 68, 5367-5373.
- Mangin I, Bonnet R, Seksik P, Rigottier-Gois L, Sutren M *et al.* (2004) Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol Ecol* 50, 25-36.
- Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR (2001) Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. *J Clin Microbiol* 39, 2987-2990.

- Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E *et al.* (2006) Reduced diversity of fecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205-211.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* 142, 1097-1106.
- Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U *et al.* (1996) The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 111, 334-344.
- Marchese A, Salerno A, Pesce A, Debbia EA, Schito GC (2000) *In vitro* activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against *Clostridium difficile* and the rate of selection of spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species. *Chemotherapy* 46, 253-266.
- Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P *et al.* (2007) Rapid and non-invasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res* 6, 546-551.
- Marchi E, Montecchi L, Venturini AP, Mascellani G, Brufani M *et al.* (1985) 4-Deoxyprido[1',2':1,2]imidazo[5,4-c]rifamycin SV derivatives. A new series of semisynthetic rifamycins with high antibacterial activity and low gastroenteric absorption. *J Med Chem* 28, 960-963.
- Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M (2006) Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol* 17, 204-210.
- Marcos A, Warnberg J, Nova E, Gomez S, Alvarez A *et al.* (2004) The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur J Nutr* 43, 381-389.
- Mariadason J, Rickard K, Barkla D, Augenlicht L, Gibson P (2000) Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate induced differentiation. *J Cell Physiol* 183, 347-354.
- Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, Andersson DI (2004) Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1289-1294.
- Marotta F, Geng TC, Wu CC, Barbi G (1996) Bacterial translocation in the course of acute pancreatitis: beneficial role of nonabsorbable antibiotics and lactitol enemas. *Digestion* 57, 446-452.
- Marques MA, Chitale S, Brennan PJ, Pessolani MC (1998) Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 66, 2625-2631.
- Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73, 430S-436S.
- Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A *et al.* (2001) Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 67, 4939-4942.
- Martin FJ, Dumas M, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IKS *et al.* (2007a) A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol Syst Biol* 3: Article number 112; doi:10.1038/msb4100153.
- Martin F-PJ, Wang Y, Sprenger N, Yap IKS, Lundstedt T *et al.* (2007b) Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol Syst Biol* 4: Article number 157; doi:10.1038/msb4100190.

- Martini S, Bonechi C, Corbini G, Donati A, Rossi C (2004) Solution structure of rifaximin and its synthetic derivative rifaximin OR determined by experimental NMR and theoretical simulation methods. *Bioorg Med Chem* 12, 2163-2172.
- Mas A, Rodés J, Sunyer L, Rodrigo L, Planas R *et al.* (2003) Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of acute hepatic encephalopathy: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial. *J Hepatol* 38, 51-58.
- Maser EA, Present DH (2008) Pouch-ouch. *Curr Opin Gastroenterol* 24, 70-74.
- Mater DD, Langella P, Corthier G, Flores MJ (2008) A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14, 123-127.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Oyaizu H (1998) Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* 167, 113-121.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H (1999) Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol* 65, 4506-4512.
- Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M *et al.* (2005) Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 140, 417-426.
- Matsumura H, Takeuchi A, Kano Y (1997) Construction of *Escherichia coli*-*Bifidobacterium longum* shuttle vector transforming *B. longum* 105-A and 108-A. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 1211-1212.
- Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T (1997) Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocr J* 44, 357-365.
- Mattarelli P, Biavati B, Alessandrini A, Crociati F, Scardovi V (1994) Characterization of the plasmid pVS809 from *Bifidobacterium globosum*. *New Microbiol* 17, 327-331.
- Matteuzzi D, Crociani F, Zani G, Trovatelli LD (1971) *Bifidobacterium suis* sp. nov.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig faeces. *Zeitschrift Allgemeine Mikrobiol* 11, 387-395.
- Matteuzzi D, Crociani F, Emaldi O (1978) Amino acids produced by bifidobacteria and some clostridia. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 129, 175-181.
- Mayer EA (2000) The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 47, 861-869.
- Maze A, O'Connell-Motherway M, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2006) Identification and characterization of a fructose phosphotransferase system in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 73, 545-553.
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL (2005) An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107-118.
- McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE *et al.* (2003) Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 52, 975-980.
- McCartney AL (2002) Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr* 88, S29-S37.
- McClure WR, Cech CL (1978) On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* 253, 8949-8956.

- McGuire BB, Brannigan AE, O'Connell PR (2007) Ileal pouch-anal anastomosis. *Br J Surg* 94, 812-823.
- McLean MJ, Wolfe KH, Devine KM (1998) Base composition skews, replication orientation, and gene orientation in 12 prokaryote genomes. *J Mol Evol* 47, 691-696.
- McLeod MP, Qin X, Karpathy SE, Gioia J, Highlander SK *et al.* (2004) Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other rickettsiae. *J Bacteriol* 186, 5842-5855.
- McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M *et al.* (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 15582-15587.
- Meagher AP, Farouk R, Dozois RR, Kelly KA, Pemberton JH (1998) J ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis: complications and long-term outcome in 1310 patients. *Br J Surg* 85, 800-803.
- Meech RJ, Loutit J (1985) Non-specific vaginitis: diagnostic features and response to imidazole therapy (metronidazole, ornidazole). *NZ Med J* 98, 389-391.
- Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y (2007) Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 150, 531-538.
- Medzhitov R, Janeway Jr Ch (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89-97.
- Megraud F, Lamouliatte H (1992) *Helicobacter pylori* and duodenal ulcers. Evidence suggesting causation. *Dig Dis Sci* 37, 767-772.
- Megraud F, Bouffant F, Camou-Juncas C (1994) *In vitro* activity of rifaximin against *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13, 184-186.
- Ménard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N *et al.* (2004) Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53, 821-828.
- Ménard O, Butel MJ, Gaboriau-Routhiau V, Waligora-Dupriet AJ (2008) Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobacterium* sp. strains isolated from infants. *Appl Environ Microbiol* 74, 660-666.
- Merrett MN, Mortensen N, Kettlewell M, Jewell DO (1996) Smoking may prevent pouchitis in patients with restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *Gut* 38, 362-364.
- Merritt J, Kreth J, Shi W, Qi F (2005) LuxS controls bacteriocin production in *Streptococcus mutants* through a novel regulatory component. *Mol Microbiol* 57, 960-969.
- Mestecky J, Russel MW, Jackson S, Michalek SM, Tlaskalová-Hogenová H, Šterzl J, eds. (1995) Advances in mucosal immunology. New York/London, Plenum Press.
- Metchnikoff E (1907) *The Prolongation of Life*. London: William Heinemann.
- Mike A, Nagaoka N, Tagami Y, Miyashita M, Shimada S *et al.* (1999) Prevention of B220+ T cell expansion and prolongation of lifespan induced by *Lactobacillus casei* in MLR/lpr mice. *Clin Exp Immunol* 117, 368-375.
- Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Blumberg B, Sasano H (2005) Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Mol Cell Endocrinol* 231, 75-85.
- Miller TL, Wolin MJ (1985) *Methanosphaera stadtmaniae* gen nov., sp. nov. a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch Microbiol* 141, 116-122.
- Miller TL, Wolin MJ (1986) Methanogens in human and animal tracts. *Syst Appl Microbiol* 7, 223-229.

- Miller I, Crawford J, Gianazza E (2006) Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 6, 5385-5408.
- Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S *et al.* (2004) Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53, 108-114.
- Minekus M, Smeets-Peeters M, Bernalier A, Marol-Bonnin S, Havenaar R *et al.* (1999) A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 108-114.
- Miner P, Wedel M, Bane B, Bradley J (2004) An enema formulation of alicaforsen, an antisense inhibitor of intercellular adhesion molecule-1, in the treatment of chronic, unremitting pouchitis. *Aliment Pharmacol Ther* 19, 281-286.
- Mira A, Ochman H, Moran NA (2001) Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet* 17, 589-596.
- Missich R, Sgorbati B, LeBlanc DJ (1994) Transformation of *Bifidobacterium longum* with pRM2, a constructed *Escherichia coli*-*B. longum* shuttle vector. *Plasmid* 32, 208-211.
- Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junctions structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol* 279, G250-G254.
- Miyazawa E, Iwabuchi A, Yoshida T (1996) Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorous, calcium and magnesium in germfree and conventional rats. *Nutr Res* 16, 603-613.
- Möllenbrink M, Bruckschen E (1994) Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor). *Med Klin (Munich)* 89, 587-593.
- Mongodin EF, Shapir N, Daugherty SC, DeBoy RT, Emerson JB *et al.* (2006) Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genet* 2, e214.
- Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L *et al.* (2004) *Lactobacillus acidophilus* protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion* 69, 225-228.
- Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Van Sluys MA, Kitajima JP, Truffi D *et al.* (2004) The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17, 827-836.
- Moore WE, Holdeman LV (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 27, 961-979.
- Moore WE, Holdeman LV (1974) Special problems associated with isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am J Clin Nutr* 27, 1450-1455.
- Morelli L, Cesena C, Lucchini F, Callegari ML (1997) Role of cell aggregation protein in adhesion *in vitro* and *in vivo*. In: Novel Methods for Probiotic Research, 2nd Workshop FAIR CT96-1028, PROBDEMO, p. 63. Technical Research Centre of Finland, Espoo.
- Moreno Y, Collado MC, Ferrús MA, Cobo JM, Hernández E *et al.* (2006) Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4°C using LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> staining and conventional plate counts. *Int J Food Sci Technol* 41, 275-280.
- Morishita T, Yura T (1976) Altered nutritional requirements associated with mutations affecting the structure of ribonucleic acid polymerase in *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol* 125, 416-422.

- Morozumi M, Yamaguchi K, Ogawa Y, Kitagawa R (1987) Oxalate metabolism in stone formers. *Kidney Dial* 23, S332-S337.
- Morrison M, Miron J (2000) Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins? *FEMS Microbiol Lett* 185, 109-115.
- Morrow TO, Harmon SA (1979) Genetic analysis of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase mutants. *J Bacteriol* 137, 374-383.
- Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ, Doucet-Populaire F (2005) Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Antimicrob Chemother* 55, 38-44.
- Mowat AM (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.
- Mujahid S, Pechan T, Wang C (2007) Improved solubilization of surface proteins from *Listeria monocytogenes* for 2-DE. *Electrophoresis* 28, 3998-4007.
- Mullen KD, Dasarathy S (1999) Hepatic encephalopathy. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, eds. Schiff's diseases of the liver, 8th ed. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, pp. 545-581.
- Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M *et al.* (2001) Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science* 294, 2348-2351.
- Murphy SJ, Ullman TA, Abreu MT (2008) Gut microbes in Crohn's disease: getting to know you better? *Am J Gastroenterol* 103, 397-398.
- Musch MW, Sugi K, Straus D, Chang EB (1999) Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 117, 115-122.
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Nagaoka M, Hashimoto S, Watanabe T, Yokokura T, Mori Y (1994) Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol Pharm Bull* 17, 1012-1017.
- Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Ikeuchi M, Katoh H *et al.* (2002) Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (supplement). *DNA Res* 9, 135-148.
- Narva M, Halleen J, Vaananen K, Korpela R (2004) Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on bone cells *in vitro*. *Life Sci* 75, 1727-1734.
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142-201.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Anaerobic Bacteria Approved Standard M11-A3, third ed. NCCLS, Wayne, PA, 1997.
- Neish AS (2002) The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect* 4, 309-317.
- Nesbø CL, Nelson KE, Doolittle WF (2002) Suppressive subtractive hybridization detects extensive genomic diversity in *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* 184, 4475-4488.
- Nesbø CL, Boucher Y, Dlutek M, Doolittle WF (2005) Lateral gene transfer and phylogenetic assignment of environmental fosmid clones. *Environ Microbiol* 7, 2011-2026.

- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Neutra MR (1999) M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 236, 17-32.
- Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2, 1004-1009.
- Newton JP, Yemm R, Abel RW, Menhinick S (1993) Changes in human jaw muscles with age and dental state. *Gerodontology* 10, 16-22.
- Niault M, Thomas F, Prost J, Ansari FH, Kalfon P (1999) Fungemia due to *Saccharomyces* species in a patient treated with enteral *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis* 28, 930.
- Nicaise P, Gleizes A, Sandre C, Forestier F, Kergot R *et al.* (1998) Influence of intestinal microflora on murine bone marrow and spleen macrophage precursors. *Scand J Immunol* 48, 585-591.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181-1189.
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID (2005) Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* 3, 431-438.
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S *et al.* (2005) CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258.
- Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H *et al.* (1998) Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 42, 470-476.
- Nishio Y, Nakamura Y, Kawarabayasi Y, Usuda Y, Kimura E *et al.* (2003) Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res* 13, 1572-1579.
- Noriega L, Cuevas I, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG (2006) Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *Int Dairy J* 16, 850-855.
- Normand P, Lapierre P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N *et al.* (2007) Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res* 17, 7-15.
- Normark BH, Normark S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252, 91-106.
- Nottingham PM, Hungate RE (1968) Isolation of methanogenic bacteria from feces of man. *J Bacteriol* 96, 2178-179.
- Nova E, Gómez-Martínez S, Morande G, Marcos A (2002) Cytokine production by blood mononuclear cells from in-patients with anorexia nervosa. *Br J Nutr* 88, 183-188.
- Nova E, Toro O, Varala P, Lopez-Vidriero I, Morande G *et al.* (2006) Effects of a nutritional intervention with yogurt on lymphocyte subsets and cytokine production capacity in anorexia nervosa patients. *Eur J Nutr* 45, 225-233.
- Nova E, Wärnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Romeo J *et al.* (2007) Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *Br J Nutr* 98, S90-S95.

- Noverr MC, Erb-Downward JR, Huffnagle GB (2003) Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev* 16, 517-533.
- Noverr MC, Noggle RM, Toews GB, Huffnagle GB (2004) Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses. *Infect Immunol* 72, 4996-5003.
- O'Farrel PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.
- O'Hara AM, O'Regan P, Fanning Á, O'Mahony C, MacSharry J *et al.* (2006) Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 118, 202-215.
- O'Hara AM, Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7, 688-693.
- O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F *et al.* (2005) *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 128, 541-551.
- O'Mahony L, O'Callaghan L, McCarthy J, Shilling D, Scully P *et al.* (2006) Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G839-G845.
- O'Riordan K, Fitzgerald GF (1999) Molecular characterisation of a 5.75-kb cryptic plasmid from *Bifidobacterium breve* NCFB 2258 and determination of mode of replication. *FEMS Microbiol Lett* 174, 285-294.
- O'Toole R, Williams HD (2003) Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 154, 387-392.
- Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE *et al.* (1999) A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 134, 15-20.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299-304.
- Ochman H, Davalos LM (2006) The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science* 311, 1730-1733.
- Oggioni MR, Pozzi G, Valensin PE, Galieni P, Bigazzi C (1998) Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *J Clin Microbiol* 36, 325-326.
- Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee J, eds. *Mucosal immunology*, New York, Academic Press, 1999.
- Ohkusa T, Nomura T, Sato N (2004) The role of bacterial infection in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intern Med* 43, 534-539.
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 16, 373-378.
- Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, Mironenko T, Scott N *et al.* (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol* 25, 447-453.
- Orla-Jensen S (1924) La classification des bacteries lactiques. *Lait* 4, 468-474.
- Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J (1994) Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat Res* 311, 239-248.
- Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O *et al.* (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685-693.

- Otte JM, Podolsky DK (2004) Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, 613-626.
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S (1999) Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 9, 43-52.
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Tolkkio S, Salminen SJ (2000) The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol* 30, 10-13.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
- Ouwehand AC, Kurvinen T, Rissanen P (2004) Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an *in vivo* study. *Int J Food Microbiol* 95, 103-106.
- Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Guryev SO, Chertov OYu *et al.* (1981) The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. Nucleotide sequence of the *rpoB* gene and amino-acid sequence of the beta-subunit. *Eur J Biochem* 116, 621-629.
- Palazzini E (2004) Periodic safety update report for rifaximin (January 1987-December 2003). Bologna, Alfa Wassermann.
- Palermo G, Di Gregorio P, Coffa G (1984) Effectiveness of the L 105 compound in the treatment of acute diarrhoeal diseases. A short-term controlled study. *Med Praxis* 5, 147-152.
- Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA (2003) Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Curr Issues Intest Microbiol* 4, 71-75.
- Palmer C, Bik EM, Eckburg PB, Sana TR, Wolber PK *et al.* (2006) Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucleic Acids Res* 34, e5.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5, 1556-1573.
- Palys T, Nakamura LK, Cohan FM (1997) Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1145-1156.
- Papanicolaou DA, Wilder RL, Monolapas SC, Chrousos GP (1998) The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. NIH conference. *Ann Intern Med* 128, 127-137.
- Papineau D, Walker JJ, Mojzsis SJ, Pace NR (2005) Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia. *Appl Environ Microbiol* 71, 4822-4832.
- Pardi DS, Sandborn WJ (2006) Systematic review: the management of pouchitis. *Aliment Pharmacol Ther* 23, 1087-1096.
- Park MS, Lee KH, Ji GE (1997) Isolation and characterization of two plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol* 25, 5-7.
- Park MS, Shin DW, Lee KH, Ji GE (1999) Sequence analysis of plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*. *Microbiology* 145, 585-592.

- Park YH, Kim JG, Shin YW, Kim HS, Kim Y-J *et al.* (2008) Effects of *Lactobacillus acidophilus* 43121 and a mixture of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* on the serum cholesterol level and fecal sterol excretion in hypercholesterolemia-induced pigs. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 70581-70586.
- Parks AG, Nicholls RJ, Belliveau P (1980) Proctocolectomy with ileal reservoir and anal anastomosis. *Br J Surg* 67, 533-538.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN *et al.* (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183, 3770-3783.
- Patterson SD, Aebersold R (1995) Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis* 16, 1791-1814.
- Paulsen I, Banerjee L, Myers GSA, Nelson KE, Seshadri R *et al.* (2003) Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299, 2071-2074.
- Peck KR, Kim SW, Jung SI, Kim YS, Oh WS *et al.* (2003) Antimicrobials as potential adjunctive agents in the treatment of biofilm infection with *Staphylococcus epidermidis*. *Chemotherapy* 49, 189-193.
- Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F *et al.* (2004) Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 4250-4255.
- Pein K, Holz J (1993) Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea—a pilot study. *Z Gastroenterol* 31, 129-134.
- Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C *et al.* (2005) Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 243, 141-147.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B *et al.* (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511-521.
- Perapoch J, Planes AM, Querol A, López V, Martínez-Bendayán I *et al.* (2000) Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levura. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 468-470.
- Pereira DI, Gibson GR (2002) Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in human. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 259-281.
- Perencevich M, Burakoff R (2006) Use of antibiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 12, 651-664.
- Perez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL (1998) Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol* 64, 21-26.
- Perkins AE, Nicholson WL (2008) Uncovering new metabolic capabilities of *Bacillus subtilis* using phenotype profiling of rifampin-resistant *rpoB* mutants. *J Bacteriol* 190, 807-814.
- Pessi T, Sutas Y, Saxelin M, Kallioinen H, Isolauri E (1999) Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65, 4725-4728.
- Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E (2000) Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 30, 1804-1808.

- Petrof EA, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y *et al.* (2004) Probiotics inhibit nuclear factor- $\kappa$ B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 127, 1474-1487.
- Petruzzello L, Iacopini F, Bulajic M, Shah S, Costamagna G (2006) Review article: uncomplicated diverticular disease of the colon. *Aliment Pharmacol Ther* 23, 1379-1391.
- Philip R, Epstein L (1986) Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself,  $\gamma$ -interferon and interleukin-1. *Nature* 323, 86-89.
- Physicians' desk reference: use-in-pregnancy ratings, ed. 58. Montvale, Medical Economics Co, 2004.
- Pitcher MC, Beatty ER, Cummings JH (2000) The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* 46, 64-72.
- Pitt-Rivers AL, Impiombato F-AA (1968) The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochem J* 109, 825-830.
- Platts-Mills TA (2001) The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1-5.
- Pletincx M, Legein J, Vandenplas Y (1995) Fungemia with *Saccharomyces boulardii* in a 1-year-old girl with protracted diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21, 113-115.
- Pochard P, Gosset P, Grangette C, Andre C, Tonnel AB *et al.* (2002) Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 110, 617-623.
- Pochard P, Hammad H, Ratajczak C, Charbonnier-Hatzfeld AS, Just N *et al.* (2005) Direct regulatory immune activity of lactic acid bacteria on Der p 1-pulsed dendritic cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 116, 198-204.
- Podar M, Abulencia CB, Walcher M, Hutchison D, Zengler K *et al.* (2007) Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 73, 3205-3214.
- Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347, 417-429.
- Pohjivuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M *et al.* (2004) *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN- $\gamma$  production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 114, 131-136.
- Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schilinger U *et al.* (1996) *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer* 26, 365-380.
- Potter T, Ellis C, Levitt MD (1985) Activated charcoal: *in vivo* and *in vitro* studies of effect on gas formation. *Gastroenterology* 88, 620-624.
- Poupard JA, Husain I, Norris RF (1973) Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol Rev* 37, 136-165.
- Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C (2002) Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 51, 405-409.
- Prevost H, Divies C (1992) Cream fermentation by mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. *Biotechnol Lett* 14, 583-588.
- Price CE, Reid SJ, Driessen AJ, Abratt VR (2006) The *Bifidobacterium longum* NCIMB 702259T *ctr* gen codes for a novel cholate transporter. *Appl Environ Microbiol* 72, 923-926.
- Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C *et al.* (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 2512-2517.

- Pronio A, Montesani C, Butteroni C, Vecchione S, Mumolo G *et al.* (2008) Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells. *Inflamm Bowel Dis* [Epub ahead of print].
- Pull SL, Doherty JM, Millis JC, Gordon JI, Stappenbeck TS (2005) Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 99-104.
- Pullan RD, Thomas GAO, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT *et al.* (1994) Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35, 353-359.
- Putman R (1994) Community Ecology. New York, Chapman and Hall.
- Qin MH, Madiraju MV, Rajagopalan M (1999) Characterization of the functional replication origin of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* 233, 121-130.
- Quon DV, d'Oliveira CE, Johnson PJ (1992) Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 15, 4402-4406.
- Rabilloud T (1996) Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 17, 813-829.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C *et al.* (2004) Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528.
- Raitano A, Korc M (1993) Growth inhibition of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin-1 is associated with enhanced expression of  $\gamma$ -interferon receptors. *Cancer Res* 53, 636-640.
- Rajilić-Stojanović M (2007) Diversity of the human gastrointestinal microbiota: novel perspectives from highthroughput analyses. PhD Thesis. Wageningen, The Netherlands, Wageningen University.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-241.
- Rao SC, Edwards CA, Austen CJ, Bruce C, Read NW (1988) Impaired colonic fermentation of carbohydrate after ampicillin. *Gastroenterology* 94, 928-932.
- Rao AV, Shiwrain N, Maharaj I (1989) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Canc Inst Food Sci Technol* 22, 365-369.
- Raoult D, Ogata H, Audic S, Robert C, Suhre K *et al.* (2003) *Tropheryma whipplei* Twist: a human pathogenic *Actinobacteria* with a reduced genome. *Genome Res* 13, 1800-1809.
- Rasic LJ, Kurman JA (1983) Bifidobacteria and their role. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart.
- Rasic J (1989) The role of dairy foods containing bifidobacteria and acidophilus bacteria in nutrition and health. *Ferm. Milks Curr Res Ass Int Fabric Yog*, Paris, France.
- Rasic J, Vujicic IF, Skrinjar M, Vulic M (1992) Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotech Lett* 14, 39-44.
- Rastall RA (2004) Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr* 134, 2022S-2026S.
- Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H (1999) Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 28, 1159-1160.

- Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI (2006) Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 127, 423-433.
- Reddy A, Fried B (2007) The use of *Trichuris suis* and other helminth therapies to treat Crohn's disease. *Parasitol Res* 100, 921-927.
- Redenbach M, Scheel J, Schmidt U (2000) Chromosome topology and genome size of selected actinomycetes species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 227-235.
- Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D *et al.* (2003) Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35, 131-134.
- Reilly N, Poylin V, Menconi M, Onderdonk A, Bengmark S *et al.* (2007) Probiotics potentiate IL-6 production in IL-1 $\beta$ -treated Caco-2 cells through a heat shock-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1169-R1179.
- Reiners JJ, Clift R, Mathieu P (1999) Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis* 20, 1561-1566.
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT (1999) Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635-639.
- Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204, 572-581.
- Resta-Lenert S, Barrett KE (2002) Infection with enteroinvasive bacteria alters barrier function and transport properties of human intestinal epithelial cells: role of iNOS and COX-2 expression. *Gastroenterology* 122, 1070-1087.
- Resta-Lenert S, Barrett KE (2003) Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52, 988-997.
- Reuter G (1963) Vergleichende untersuchungen ueber die bifidus-flora im sauglings und erwachsenenstuhl. *Zbl Bakteriol Par Infek* 191, 486-507.
- Rezzonico E, Lariani S, Barretto C, Cuanoud G, Giliberti G *et al.* (2007) Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Bifidobacterium longum*. *FEMS Microbiol Lett* 271, 136-45.
- Richard V, Van der Auwera P, Snoeck R, Daneau D, Meunier F (1988) Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7, 783-785.
- Rieu-Lesme F, Delbes C, Sollelis L (2005) Recovery of partial 16S rDNA sequences suggests the presence of Crenarchaeota in the human digestive ecosystem. *Curr Microbiol* 51, 317-321.
- Riggio O, Masini A, Efrati C, Nicolao F, Angeloni S *et al.* (2005) Pharmacological prophylaxis of hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: a randomized controlled study. *J Hepatol* 42, 674-679.
- Rijnders BJ, Van Wijngaerden E, Verwaest C, Peetermans WE (2000) *Saccharomyces* fungemia complicating *Saccharomyces boulardii* treatment in a non-immunocompromised host. *Intensive Care Med* 26, 825.
- Riley PA (2004) Bacteriophages in autoimmune disease and other inflammatory conditions. *Med Hypothese* 62, 493-498.

- Rincon MT, Cepeljnik T, Martin JC, Lamed R, Barak Y *et al.* (2005) Unconventional mode of attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome to the cell surface. *J Bacteriol* 187, 7569-7578.
- Ripa S, Mignini F, Prenna M, Falcioni E (1987) *In vitro* antibacterial activity of rifaximin against *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejunii* and *Yersinia* spp. *Drugs Exp Clin Res* 13, 483-488.
- Riquelme AJ, Calvo MA, Guzmán AM, Depix MS, García P *et al.* (2003) *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J Clin Gastroenterol* 36, 41-43.
- Roberfroid MB, Gibson GR (1994) Probiotic and prebiotic. In: Ilsi Europe, Workshop of colony microflora: nutrition and health. Barcelona, Spain, 14-16 sept 1994.
- Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C, Cummings JH (1995) Colonic microflora: nutrition and health: summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) (Europe) workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr Rev* 53, 127-130.
- Robertson AM, Corfield AP (1999) Mucin degradation and its significance in inflammatory conditions of the gastrointestinal tract. In: Medical importance of the normal microflora, Tannock GW, ed., Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 222-261.
- Roberts M (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245, 195-203.
- Rocha EP (2003) DNA repeats lead to the accelerated loss of gene order in bacteria. *Trends Genet* 19, 600-603.
- Rodby RA, Tyazka TS, Williams JW (1991) Reversal of cardiac dysfunction secondary to type I primary hyperoxaluria after combined liver-kidney transplantation. *Am J Med* 90, 498-504.
- Roediger WEW (1980) The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy deficient disease? *Lancet* 2, 712-715.
- Rohwer F, Edwards R (2002) The phage proteomic tree: a genome based taxonomy for phage. *J Bacteriol* 184, 4529-4535.
- Rokbi B, Seguin D, Guy B, Mazarin V, Vidor E *et al.* (2001) Assessment of *Helicobacter pylori* gene expression within mouse and human gastric mucosae by real-time reverse transcriptase PCR. *Infect Immun* 69, 4759-4766.
- Roller C, Ludwig W, Schleifer KH (1992) Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *J Gen Microbiol* 138, 1167-1175.
- Romero E, Riva S, Berti M, Fietta AM, Silvestri LG (1973) Pleiotropic effects of a rifampicin-resistant mutation in *E. coli*. *Nat New Biol* 246, 225-228.
- Ropeleski MJ, Tang J, Walsh-Reitz MM, Musch MW, Chang EB (2003) Interleukin-11-induced heat shock protein 25 confers intestinal epithelial-specific cytoprotection from oxidant stress. *Gastroenterology* 124, 1358-1368.
- Roselli M, Finamore A, Britti MS, Mengheri E (2006) Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br J Nutr* 95, 1177-1184.
- Rosen R, Becher D, Büttner K, Biran D, Hecker M (2004) Highly phosphorylated bacterial proteins. *Proteomics* 4, 3068-3077.
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A, Michaelsen KF (2004) Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 145, 612-616.

- Rossi M, Brigidi P, Gonzalez V, Matteuzzi D (1996) Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Res Microbiol* 147, 133-143.
- Rossi M, Brigidi P, Matteuzzi D (1998) Improved cloning vectors for *Bifidobacterium* spp. *Lett Appl Microbiol* 26, 101-104.
- Rossi M, Maurano F, Luongo D, Fasano A, Uzzau S *et al.* (2002) Zonula occludens toxin (Zot) interferes with the induction of nasal tolerance to gliadin. *Immunol Lett* 81, 217-221.
- Rothkotter HJ, Pabst R (1989) Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunology* 67, 103-108.
- Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, Barnich N, Neut C *et al.* (2007) *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med* 13, 35-37.
- Rovensky J, Svik K, Matha V, Istok R, Ebringer L *et al.* (2004) The effects of *Enterococcus faecium* and selenium on methotrexate treatment in rat adjuvant-induced arthritis. *Clin Dev Immunol* 11, 267-273.
- Rowland I, Rumney C, Coutts J, Lievens L (1998) Effects of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 19, 281-285.
- Rozee KR, Cooper D, Lam K, Costerton JW (1982) Microbial flora of the mouse ileum mucous layer and epithelial surface. *Appl Environ Microbiol* 43, 1451-1463.
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilan CG, Salminen S (2006) Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from "villi" on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *J Dairy Sci* 89, 2355-2358.
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernández-García M, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A (2008) Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 74, 1936-1940.
- Rubin DT, Kornbluth A (2005) Role of antibiotics in the management of inflammatory bowel disease: a review. *Rev Gastroenterol Disord* 5, S10-S15.
- Ruiz PA, Hoffmann M, Szcesny S, Blaut M, Haller D (2005) Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology* 115, 441-450.
- Ruiz L, Sánchez B, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A (2007) Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. *FEMS Microbiol Lett* 274, 316-322.
- Ruseler-van Embden JG, Schouten WR, van Lieshout LM (1994) Pouchitis: result of microbial imbalance? *Gut* 35, 658-664.
- Russell MW, Sibley DA, Nikolova EB, Tomana M, Mestecky J (1997) IgA antibody as a non-inflammatory regulator of immunity. *Biochem Soc Trans* 25, 466-470.
- Ryan MP, Jack RW, Josten M, Sahl HG, Jung G *et al.* (1999) Extensive post-translational modification, including serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. *J Biol Chem* 274, 37544-37550.
- Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2006) Screening and identification of starch, amylopectin and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains. *Appl Environ Microbiol* 72, 5289-5296.

- Saarela M, Mättö J, Mattila-Sandholm T (2002) Safety aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. *Microbial Ecol in Health & Disease* 14, 234-241.
- Saavedra J, Bauman N, Oung I, Perman J, Yolken R (1994) Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 47, 709-710.
- Saavedra JM (1999) Probiotics plus antibiotics: regulating our bacterial environment. *J Pediatr* 135, 564-568.
- Saavedra JM (2001) Clinical applications of probiotic agents. *Am J Clin Nutr* 73, 1147S-1151S.
- Sagar PM, Pemberton JH (1997) Ileo-anal pouch function and dysfunction. *Dig Dis* 15, 172-188.
- Saggiaro A (2004) Probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 38, S104-S106.
- Salix Pharmaceuticals (2004) Xifaxan (rifaximin) tablets [prescribing information]. Palo Alto, CA.
- Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D *et al.* (1998a) Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol* 44, 93-106.
- Salminen S, Bouley C, Bouton-Ruault MC, Cummings J, Franck A *et al.* (1998b) Functional food science in gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80, S147-S171.
- Salyers AA, Gupta A, Wang Y (2004) Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 12, 412-416.
- Samuel BS, Gordon JI (2006) A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10011-10016.
- Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Anglade P, Baraige F, de los Reyes-Gavilán CG *et al.* (2005) Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J Bacteriol* 187, 5799-5808.
- Sánchez B, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A (2006) The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Environ Microbiol* 8, 1825-1833.
- Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Collado MC, Anglade P, Baraige F *et al.* (2007a) Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype longum. *Appl Environ Microbiol* 73, 6450-6459.
- Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Stuer-Lauridsen B, Ruas-Madiedo P, Anglade P *et al.* (2007b) Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach. *Appl Environ Microbiol* 73, 6757-6767.
- Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, Pemberton JH, Philips SF (1994) Pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis: a pouchitis disease activity index. *Mayo Clin Proc* 69, 409-415.
- Sandborn WJ, in: McLeod RS, Martin F, Sutherland LR, Wallace JL, Williams CN, eds., Trends in inflammatory bowel disease 1996, Kluwer Academic Publishers, Lancaster 1997, pp. 51-63. Pouchitis: definition, risk factors, frequency, natural history, classification, and public perspectives.
- Sandborn WJ, McLeod R, Jewell DP (1999) Medical therapy for induction and maintenance of remission in pouchitis. A systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 5, 33-39.
- Sandborn WJ, Pardi DS (2004) Clinical management of pouchitis. *Gastroenterology* 127, 1809-1814.
- Sandler RS, Everhart JE, Donowitz M, Adams E, Cronin K *et al.* (2002) The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology* 122, 1500-1511.

- Sansonetti PJ (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 4, 953-964.
- Saric J, Wang Y, Li J, Coen M, Utzinger J *et al.* (2008) Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function. *J Proteome Res* 7, 352-360.
- Sartor RB (2000) Antibiotics as therapeutic agents in Crohn's disease. In: Bayless TM, Hanauer S, ed., *Current advanced therapy of inflammatory bowel disease*, Hamilton, Decker Inc, pp. 359-362.
- Sartor RB (2002) Mucosal immunology and mechanisms of gastrointestinal inflammation. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, eds., *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. Volume I. 7th ed. Philadelphia, Saunders, pp. 21-51.
- Sartor RB (2004a) Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 21, 44-50.
- Sartor RB (2004b) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 126, 1620-1633.
- Sartor RB (2006) Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 390-407.
- Sarubbi E, Monti F, Corti E, Miele A, Selva E (2004) Mode of action of the microbial metabolite GE23077, a novel potent and selective inhibitor of bacterial RNA polymerase. *Eur J Biochem* 15, 3146-3154.
- Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67, 504-513.
- Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM *et al.* (1996) Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 347, 1212-1217.
- Savage DC (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31, 107-133.
- Savijoki K, Suokko A, Palva A, Valmu L, Kalkkinen N *et al.* (2005) Effect of heat-shock and bile salts on protein synthesis of *Bifidobacterium longum* revealed by [<sup>35</sup>S]methionine labelling and two-dimensional gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 248, 207-215.
- Saxelin M, Elo S, Salminen S, Vapaatalo H (1991) Dose response colonisation of faeces after oral administration of *Lactobacillus casei* strain GG. *Microbial Ecol Health Dis* 4, 209-214.
- Saxelin M, Chuang NH, Chassy B, Rautelin H, Mäkelä PH *et al.* (1996) Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. *Clin Infect Dis* 22, 564-566.
- Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S (1990) A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 86, 202-210.
- Scardovi V, Trovatelli LD (1965) The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol Enzymol* 15, 19-29.
- Scardovi V, Trovatelli LD (1969) New species of bifidobacteria from *Apis mellifera* L and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zbl Bakteriell Par Infek Hyg Abt 2* 123, 64-88.
- Scardovi V, Trovatelli LD, Crociani F, Sgorbati B (1969) Bifidobacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*, *B. globosum* sp. nov. and *B. ruminale* sp. nov. *Arch Microbiol* 68, 278-294.

- Scardovi V, Zani G, Trovatelli LD (1970) Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. *Arch Microbiol* 72, 318-325.
- Scardovi V, Trovatelli LD, Zani G, Crociani F, Matteuzzi D (1971) Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 21, 276-294.
- Scardovi V, Crociani F (1974) *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int J Syst Bacteriol* 24, 6-20.
- Scardovi V, Casalicchio S, Vincenzi N (1979) Multiple electrophoretic forms of transaldolase and their relationships to the taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 29, 312-327.
- Scarpignato C, Pelosini I (2005) Rifaximin: a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. *Chemotherapy* 51, 36-66.
- Scarpignato C, Pelosini I (2006) Experimental and clinical pharmacology of rifaximin, a gastrointestinal selective antibiotic. *Digestion*, 73, 13-27.
- Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B *et al.* (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 14422-14427.
- Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF *et al.* (2007) Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immunol* 75, 2399-2407.
- Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J *et al.* (2008) Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte  $\beta$ -defensin 2. *Clin Exp Immunol* 151, 528-535.
- Schmid RM, Adler G (2000) NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 118, 1208-1228.
- Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Cell Physiol* 286, 1213-1228.
- Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W *et al.* (2007) Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutr* 137, 838S-846S.
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J (1998) Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 42, 477-484.
- Schrempf H (2001) Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 285-289.
- Scrascia M, Forcillo M, Maimone F, Pazzani C (2003) Susceptibility to rifaximin of *Vibrio cholerae* strains from different geographical areas. *J Antimicrob Chemother* 52, 303-305.
- Scupham AJ, Presley LL, Wei B, Bent E, Griffith N *et al.* (2006) Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl Environ Microbiol* 72, 793-801.
- Seegers JF (2002) Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol* 20, 508-515.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P *et al.* (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237-242.
- Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF *et al.* (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and Actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J* 22, 515-528.
- Servin AL (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28, 405-440.

- Severijnen AJ, van Kleef R, Hazenburg MP, van de Merwe J (1989) Cell wall fragments from major residents of the human intestinal flora induce chronic arthritis in rats. *J Rheumatol* 16, 1061-1068.
- Seydel F, Lill HR, Hartmann GR (1981) Isolation of a second rifamycin-binding protein from *Escherichia coli* by affinity chromatography. *Eur J Biochem* 117, 87-91.
- Sgorbati B, Scardovi V, Leblanc DJ (1982) Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. *J Gen Microbiol* 128, 2121-2131.
- Shafran I, Johnson LK (2005) An open-label evaluation of rifaximin in the treatment of active Crohn's disease. *Curr Med Res Opin* 21, 1165-1169.
- Shah YM, Ma X, Morimura K, Kim I, Gonzalez FJ (2007) Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF-(kappa)B target gene expression. *Am J Physiol* 292, G1114-G1122.
- Shanahan F (2001a) Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapies. *Gastroenterology* 120, 622-635.
- Shanahan F (2001b) Turbo probiotics for IBD. *Gastroenterology* 120, 1297-1298.
- Shang XZ, Armstrong J, Yang GY, Volk A, Li J *et al.* (2004) Regulation of antigen-specific versus by-stander IgE production after antigen sensitization. *Cell Immunol* 229, 106-116.
- Shaw KJ, Miller N, Liu X, Lerner D, Wan J *et al.* (2003) Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J Microbiol Biotechnol* 5, 105-122.
- Sheehan VM, Sleator RD, Fitzgerald GF, Hill C (2006) Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol* 72, 2170-2177.
- Sheehan VM, Sleator RD, Hill C, Fitzgerald GF (2007) Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology* 153, 3563-3571.
- Shen B, Achkar JP, Lashner BA, Ormsby AH, Remzi FH *et al.* (2001) A randomized clinical trial of ciprofloxacin and metronidazole to treat acute pouchitis. *Inflamm Bowel Dis* 7, 301-305.
- Shen B (2003) Diagnosis and treatment of patients with pouchitis. *Drugs* 63, 453-461.
- Shen B, Brzezinski A, Fazio VW, Remzi FH, Achkar J-P *et al.* (2005) Maintenance therapy with a probiotic in antibiotic-dependent pouchitis: experience in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther* 22, 721-728.
- Sheperd NA, Jass JR, Duval I, Moskowitz RL, Nicholls RJ *et al.* (1987) Restorative proctocolectomy with ileal reservoir: pathological and histochemical study of mucosal biopsy. *J Clin Pathol* 40, 601-607.
- Sherlock O, Schembri MA, Reisner A, Klemm P (2004) Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* 186, 8058-8065.
- Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PSC, Goulet J *et al.* (2005) Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun* 73, 5183-5188.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Shima T, Fukushima K, Setoyama H, Imaoka A, Matsumoto S *et al.* (2007) Differential effects of two probiotic strains with different bacteriological properties on intestinal gene expression, with special reference to indigenous bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52, 69-77.

- Shipman JA, Berleman JE, Salyers AA (2000) Characterization of four outer membrane proteins involved in binding starch to the cell surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol* 182, 5365-5372.
- Shkoda A, Werner T, Daniel H, Gunckel M, Rogler G *et al.* (2007) Differential protein expression profile in the intestinal epithelium from patients with inflammatory bowel disease. *J Proteome Res* 6, 1114-1125.
- Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C *et al.* (2000) Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 46, 507-514.
- Sidhu H, Schmidt ME, Cornelius JG, Thamilselvan ME, Khan SR *et al.* (1999) Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible prevention by gut recolonization or enzyme replacement therapy. *J Am Soc Nephrol* 10, S334-S340.
- Sidhu H, Allison MJ, Chow JM, Clark A, Peck AB (2001) Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. *J Urol* 166, 1487-1492.
- Sierra JM, Navia MM, Vargas M, Urassa H, Schelleberg D *et al.* (2001a) *In vitro* activity of rifaximin against bacterial enteropathogens causing diarrhea in children under 5 years of age in Ifakara, Tanzania. *J Antimicrob Chemother* 47, 904-905.
- Sierra JM, Ruiz J, Navia MM, Vargas M, Vila J (2001b) *In vitro* activity of rifaximin against enteropathogens producing travelers' diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 643-644.
- Silvester KR, Englyst HN, Cummings JH (1995) Ileal recovery of starch from whole diets containing resistant starch measured *in vitro* and fermentation of ileal effluent. *Am J Clin Nutr* 62, 403-411.
- Simon GL, Gorbach SL (1984) Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 86, 174-193.
- Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP (2005) Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J Appl Microbiol* 99, 493-501.
- Smith EA, Macfarlane GT (1996) Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effect of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol* 81, 288-302.
- Smith CA, Baker EN (2002) Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2, 143-160.
- Snell B, Bork P, Huynen MA (2002) Genomes in flux: the evolution of archaeal and proteobacterial gene content. *Genome Res* 12, 17-25.
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI (2004) Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol* 5, 569-573.
- Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP *et al.* (2005) Glycan foraging *in vivo* by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 307, 1955-1959.
- Sonnenburg JL, Chen CT, Gordon JI (2006) Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol* 4, e413.

- Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar KR, Chen X, Anton PM *et al.* (2006) *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- $\kappa$ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 69-76.
- Spinosa MR, Wallet F, Courcol RJ, Oggioni MR (2000) The trouble in tracing opportunistic pathogens: cholangitis due to *Bacillus* in a French hospital caused by a strain related to an Italian probiotic? *Microb Ecol Health Dis* 12, 99-101.
- Spratt BG (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alteration. *Science* 264, 388-393.
- Stach JE, Bull AT (2005) Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 3-9.
- Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Pauker O *et al.* (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1134-1139.
- Stackebrandt SP (2000) The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. Springer-Verlag, New York, NY.
- Stallmach A, Schäfer F, Hoffmann S, Weber S, Müller-Molaian I *et al.* (1998) Increased state of activation of CD4 positive T cells and elevated interferon  $\gamma$  production in pouchitis. *Gut* 43, 499-505.
- Stallmach A, Chan CC, Ecker K-W, Feifel G, Herbst H *et al.* (2000) Comparable expression of matrix metalloproteinase 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut* 47, 415-422.
- Stams AJ (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 271-294.
- Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Van Sinderen D (2005) Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin Biotechnol* 16, 198-203.
- Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15451-15455.
- Stark PL, Lee A (1982) The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol* 15, 189-203.
- Steen A, Palumbo E, Deghorain M, Cocconcelli PS, Delcour J *et al.* (2005) Autolysis of *Lactococcus lactis* is increased upon D-Alanine depletion of peptidoglycan and lipoteichoic acids. *J Bacteriol* 187, 114-124.
- Steffen R, Sack DA, Riopel L, Jiang ZD, Sturchler M *et al.* (2003) Therapy of travelers' diarrhea with rifaximin on various continents. *Am J Gastroenterol* 98, 1073-1078.
- Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E *et al.* (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* 66, 3183-3189.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F *et al.* (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289, 1352-1355.
- Steidler L, Neiryneck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A *et al.* (2003) Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 21, 785-789.
- Stephen AM, Wiggings HS, Cummings JH (1987) Effect of changing transit time on colonic microbial metabolism in man. *Gut* 28, 601-609.

- Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reyssset G *et al.* (2007) Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res* 17, 192-200.
- Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B *et al.* (2004) Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 36, 476-480.
- Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Ann Rev Immunol* 20, 495-549.
- Su P, Henriksson A, Tandianus JE, Park JH, Foong F *et al.* (2005) Detection and quantification of *Bifidobacterium lactis* LAFTIB94 in human faecal samples from a consumption trial. *FEMS Microbiol Lett* 244, 99-103.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J-J, Gibson GR *et al.* (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 65, 4799-4807.
- Subramanian S, Campbell BJ, Rhodes JM (2006) Bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Infect Dis* 19, 475-484.
- Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C *et al.* (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 159, 1739-1745.
- Sullivan A, Nord CE (2005) Probiotics and gastrointestinal diseases. *J Intern Med* 257, 78-92.
- Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson RA, Weinstock JV (2005a) *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 128, 825-832.
- Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson RA, Weinstock JV (2005b) *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 54, 87-90.
- Sun J, Daniel R, Wagner-Dobler I, Zeng A-P (2004) Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* 4, 36.
- Suokko A, Poutanen M, Savijoki K, Kalkkinen N, Varmanen P (2008) ClpL is essential for induction of thermotolerance and is potentially part of the HrcA regulon in *Lactobacillus gasseri*. *Proteomics* 8, 1029-1041.
- Suutari M, Linkkonen K, Laakso S (1990) Temperature adaptation in yeast: the role of fatty acids. *J Gen Microbiol* 136, 1469-1474.
- Suutari M, Laakso S (1992) Temperature adaptation in *Lactobacillus fermentum*: interconversion of oleic, vaccenic and dihydrostercolic acid. *J Gen Microbiol* 138, 445-450.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V *et al.* (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122, 44-54.
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H (2005) Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 43, 3380-3389.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Doerffel Y (2008) Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis* 14, 147-161.
- Szajewska H, Mrukowicz JZ (2001) Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33, S17-S25.

- Tabuchi M (2003) Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 1421-1424.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40, 722-756.
- Taguchi H, Takahashi M, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A *et al.* (2002) Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxicogenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J Med Microbiol* 51, 336-343.
- Takahashi T, Morotomi M (1994) Absence of cholic acid 7-dehydroxylase activity in the strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *J Dairy Sci* 77, 3275-3286.
- Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9879-9884.
- Takaishi H, Matsuki T, Nakazawa A, Takada T, Kado S *et al.* (2007) Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* [Epub ahead of print].
- Takano E, Tao M, Long F, Bibb MJ, Wang L *et al.* (2003) A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 50, 475-486.
- Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y *et al.* (2001) Prognostic significance of natural killer cell activity in patients with gastric carcinoma: a multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 96, 574-578.
- Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF (2004) Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 1-4.
- Tan S, Seow TK, Liang RCMY, Koh S, Lee CPC *et al.* (2002) Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer* 98, 523-531.
- Tanaka K, Samura K, Kano Y (2005) Structural and functional analysis of pTB6 from *Bifidobacterium longum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 422-425.
- Tannock GW (1999) A fresh look at the intestinal microflora. In: Probiotics, A Critical Review, Tannock GW, ed., Horizon Scientific Press, University of Otago, Dundin, New Zealand, pp. 5-17.
- Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J *et al.* (2000) Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 66, 2578-2588.
- Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC *et al.* (2006) Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1018-C1030.
- Taranto MP, Fernández-Murga ML, Lorca G, de Valdez GF (2003) Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J Appl Microbiol* 95, 86-91.
- Taranto MP, Pérez-Martínez G, Font de Valdez G (2006) Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Res Microbiol* 157, 720-725.
- Tauch A, Kaiser O, Hain T, Goesmann A, Weisshaar B *et al.* (2005) Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J Bacteriol* 187, 4671-4682.
- Taylor GR, Kropp KD, Molina TC (1985) Nine-year microflora study of an isolator-maintained immunodeficient child. *Appl Environ Microbiol* 50, 1349-1356.

- Teitelbaum JE, Walker WA (2002) Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* 22, 107-38.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S *et al.* (1993) Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341, 647-650.
- Tempera G, Pinizzotto MR, Olivieri S (1993) Microbiological-clinical study on the selection of resistant bacterial strains during topical treatment of pyodermitis with rifaximin cream. *Stampa Med Eur* 13, 29-36.
- Terahara M, Nishide S, Kaneko T (2000) Preventive effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the oxidation of LDL. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 1868-1873.
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41, 100-180.
- Thole JE, van Dalen PJ, Havenith CE, Pouwels PH, Seegers JF *et al.* (2000) Live bacterial delivery systems for development of mucosal vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 2, 94-99.
- Thomas DP, Bachmann SP, Lopez-Ribot JL (2006) Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *Proteomics* 6, 5795-5804.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22, 4673-4680.
- Thompson-Chagoyan OC, Maldonado J, Gil A (2007) Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. *Dig Dis Sci* 52, 2069-2077.
- Thorburn A, Muir J, Proietto J (1993) Carbohydrate fermentation decreases hepatic glucose output in healthy subjects. *Metabolism* 42, 780-785.
- Thukral C, Travassos WJ, Peppercorn MA (2005) The role of antibiotics in inflammatory bowel disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 8, 223-228.
- Taskalová-Hogenová H, Èerná J, Mandel L (1981) Peroral immunization of germfree piglets: appearance of antibody-forming cells and antibodies of different isotypes. *Scand J Immunol* 13, 467-472.
- Taskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Hudcovic T, Tučková L, Cukrowska B *et al.* (2004) Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 93, 97-108.
- Toiyama Y, Araki T, Yoshiyama S, Hiro J-I, Miki C *et al.* (2006) The expression patterns of toll-like receptors in the ileal pouch mucosa of postoperative ulcerative colitis patients. *Surg Today* 36, 287-290.
- Topouzian N, Joseph BJ, Bezkorovainy A (1984) Effects of various metals and calcium metabolism inhibitors on the growth of *Bifidobacterium* var. *pennsylvanicus*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3, 137-142.
- Toure R, Kheadr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I (2003) Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 95, 1058-1069.
- Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K *et al.* (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* 308, 554-557.
- Trovatelli LD, Crociani F, Pedinotti M, Scardovi V (1974) *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.. A new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Arch Microbiol* 98, 187-198.

- Trovatelli LD, Biavati B (1978) Esigenze nutrizionali di alcune specie del genere *Bifidobacterium*. In: Atti XVIII Cong Naz Soc It Microb Fiuggi, Giugno 1978, Lombardo ed., Roma, pp. 330-333.
- Turchet P, Laurenzano M, Auboiron S, Antoine JM (2003) Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J Nutr Health Aging* 7, 75-77.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER *et al.* (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R *et al.* (2007) The human microbiome project. *Nature* 449, 804-810.
- Turrone S, Vitali B, Bendazzoli C, Candela M, Gotti R *et al.* (2007) Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 103, 1600-1609.
- Tynkkynen S, Singh KV, Varmanen P (1998) Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. *Int J Food Microbiol* 41, 195-204.
- Uchiyama T, Abe T, Ikemura T, Watanabe K (2005) Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol* 23, 88-93.
- Ukena SN, Westendorf AM, Hansen W (2005) The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the pro-inflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med Genet* 6, 43.
- Ulisse S, Gionchetti P, D'Alo S, Russo FP, Pesce I *et al.* (2001) Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol* 96, 2691-2699.
- Ulevitch RJ (1999) Endotoxin opens the Tollgates to innate immunity. *Nat Med* 5, 144-145.
- Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y (1993) Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 79, 32-37.
- Urayama S, Musch MW, Retsky J, Madonna MB, Straus D *et al.* (1998) Dexamethasone protection of rat intestinal epithelial cells against oxidant injury is mediated by induction of heat shock protein 72. *J Clin Invest* 102, 1860-1865.
- Van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K *et al.* (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 9274-9279.
- Van der Waaij LA, Limburg PC, Mesander G, van der Waaij D (1996) *In vivo* IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* 38, 348-354.
- Van Leeuwen PAM, Boermeester MA, Houdijk APJ, Ferwerda ChC, Cuesta MA *et al.* (1994) Clinical significance of translocation. *Gut* 35, S28-S34.
- Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA (2002) *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 109, 678-684.
- Van Tongeren SP, Slaets JPI, Harmsen HJM, Welling GW (2005) Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol* 71, 6438-6442.
- Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryck S, Demetter P *et al.* (2004) Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and helms acute colitis in mice. *Gastroenterology* 127, 502-513.

- Vanhoute T, Huys G, De Brandt E, Swings J (2004) Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol* 48, 437-446.
- Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD *et al.* (2002) The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 341-352.
- Vaughan EE, Heilig HG, Ben-Amor K, de Vos WM (2005) Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev* 29, 477-490.
- Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM, Hardie KR (2005) Making “sense” of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3, 383-396.
- Venter CS, Vorster HH, Cummings JH (1990) Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. *Am J Gastroenterol* 85, 549-553.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D *et al.* (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66-74.
- Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R (2001a) Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Ecol* 36, 113-121.
- Ventura M, Reniero R, Zink R (2001b) Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Appl Environ Microbiol* 67, 2760-2765.
- Ventura M, Zink R (2002) Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl Environ Microbiol* 68, 6429-6434.
- Ventura M, Meylan V, Zink R (2003a) Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl Environ Microbiol* 69, 4296-4301.
- Ventura M, Canchaya C, Meylan V, Klaenhammer TR, Zink R (2003b) Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl Environ Microbiol* 69, 6908-6922.
- Ventura M, Zink R (2003c) Comparative sequence analysis of the *tuf* and *recA* genes and restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region sequences supply additional tools for discriminating *Bifidobacterium lactis* from *Bifidobacterium animalis*. *Appl Environ Microbiol* 69, 7517-7522.
- Ventura M, Canchaya C, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R (2004a) *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: identification of the *atp* (*atpBEFHAGDC*) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. *Appl Environ Microbiol* 70, 3110-3121.
- Ventura M, Canchaya C, Zink R, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2004b) Characterization of the *groEL* and *groES* loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl Environ Microbiol* 70, 6197-6209.
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R (2004c) Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 205-223.
- Ventura M, Zink R, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2005a) Gene structure and transcriptional organization of the *dnaK* operon of *Bifidobacterium breve* UCC 2003 and application of the operon in bifidobacterial tracing. *Appl Environ Microbiol* 71, 487-500.

- Ventura M, Lee JH, Canchaya C, Zink R, Leahy S *et al.* (2005b) Prophage-like elements in bifidobacteria: insights from genomics, transcription, integration, distribution, and phylogenetic analysis. *Appl Environ Microbiol* 71, 8692-8705.
- Ventura M, Canchaya C, Bernini V, Del Casale A, Dellaglio F *et al.* (2005c) Genetic characterization of the *Bifidobacterium breve* UCC2003 hrcA locus. *Appl Environ Microbiol* 71, 8998-9007.
- Ventura M, Zhang Z, Cronin M, Canchaya C, Kenny JG *et al.* (2005d) The ClgR protein regulates transcription of the *clpP* operon in *Bifidobacterium breve* UCC 2003. *J Bacteriol* 187, 8411-8426.
- Ventura M, Canchaya C, Zhang Z, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2006a) How high G + C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiol Rev* 30, 734-759.
- Ventura M, Canchaya C, Del Casale A, Dellaglio F, Neviani E *et al.* (2006b) Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2783-2792.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF *et al.* (2007a) Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 495-548.
- Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF *et al.* (2007b) From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 120, 2-12.
- Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E *et al.* (1999) Impact on the composition of the faecal flora by the new probiotic preparation, preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 13, 1103-1108.
- Venturini AP (1983a) Pharmacokinetics of L/105, a new rifamycin, in rats and dogs, after oral administration. *Chemotherapy* (Basel) 29, 1-3.
- Venturini AP (1983b) L/105: report on pharmacokinetics in rats, dogs after oral administration and adverse reactions. *Chemioterapia* (Florence) 2, 162-163.
- Venturini AP, Bertoli D, Marchi E (1987) Transcutaneous absorption of a topical rifamycin preparation: rifaximin (L/105). *Drugs Exptl Clin Res* XIII, 231-232.
- Viggiano M, Badetti C, Bernini V, Garabedian M, Manelli JC (1995) *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient with severe burns. *Ann Fr Anesth Reanim* 14, 356-358.
- Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R *et al.* (2005) Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 60, 494-500.
- Villa ML, Marcus R, Ramirez Delay R, Kelsey JL (1995) Factors contributing to skeletal health of postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 10, 1233-1242.
- Vincent J, Veomett R, Riley F (1959) Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol* 78, 477-484.
- Vitali B, Wasinger V, Brigidi P, Guilhaus M (2005) A proteomic view of *Bifidobacterium infantis* generated by multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Proteomics* 5, 1859-1867.
- Vitali B, Turrone S, Dal Piaz F, Candela M, Wasinger V *et al.* (2007) Genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07. *Res Microbiol* 158, 355-362.
- Von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ (2001) Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4(+) T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 695-701.

- Von Wintzingrode F, Gobel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21, 213-229.
- Vrijzen R, Boeyé A (1992) Rifaximin is an inhibitor of bacterial RNA synthesis. *Vrije Universiteit Brussel*.
- Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER *et al.* (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 279, 54881-54886.
- Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J *et al.* (1997) Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 65, 4165-4172.
- Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M *et al.* (2003) SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 4, 920-927.
- Walker SA, Klaenhammer TR (2001) Leaky *Lactococcus* cultures that externalize enzymes and antigens independently of culture lysis and secretion and export pathways. *Appl Environ Microbiol* 67, 251-259.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM *et al.* (2000) Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* 66, 297-303.
- Walter J, Heng NCK, Hammes WP, Loach DM, Tannock GW *et al.* (2003) Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 69, 2044-2051.
- Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 275, 14624-14631.
- Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P (2001) Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am J Clin Nutr* 74, 510-515.
- Wang RF, Beggs ML, Robertson LH, Cerniglia CE (2002) Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *FEMS Microbiol Lett* 213, 175-182.
- Wang X, Heazlewood SP, Krause DO, Florin THJ (2003) Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol* 95, 508-520.
- Wang KY, Li SN, Liu CS, Perng DS, Su YC *et al.* (2004) Effect of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Nutr* 80, 737-741.
- Wang M, Ahrne S, Antonsson M, Molin G (2004) T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. *J Microbiol Methods* 59, 53-69.
- Wang MF, Lin HC, Wang YY, Hsu CH (2004) Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr Allergy Immunol* 15, 152-158.
- Wang M, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G (2005) Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 54, 219-231.
- Ward RE, Ninonuevo M, Mills DA, Lebrilla CB, German JB (2006) In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl Environ Microbiol* 72, 4497-4499.
- Wasinger VC, Pollack JD, Humphery-Smith I (2000) The proteome of *Mycoplasma genitalium*. *Eur J Biochem* 267, 1571-1582.

- Watabe J, Benno Y, Mitsuoka T (1983) *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from the caeca of chickens. *Int J Syst Bacteriol* 33, 127-132.
- Weber P (1999) The role of vitamins in the prevention of osteoporosis-a brief status report. *Int J Vitam Nutr Res* 69, 194-197.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14, 353-356.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR *et al.* (2003) Inducible and constitutive beta defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 9, 215-223.
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M *et al.* (2004) NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 72, 5750-5758.
- Wehrli W, Knüsel F, Schmid K, Staehelin M (1968) Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* 61, 667-673.
- Wehrli W (1977) Kinetic studies of the interaction between rifampicin and DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 80, 325-330.
- Wehrli W (1983) Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Rev Infect Dis* 5, 407-411.
- Weiffenbach JM, Baum BJ, Burghauer R (1982) Taste thresholds: quality specific variation with human aging. *J Gerontol* 37, 372-377.
- Wells JM, Mercenier A (2003) Lactic acid bacteria as mucosal delivery system. In: Wood BJJ, Warner PJ, eds., *Genetics of lactic acid bacteria*, New York, Kluwer Academic Publishers, pp. 261-290.
- Westendorf AM, Gunzer F, Deppenmeier S, Hunger JK, Schmidt MA *et al.* (2005) Intestinal immunity of *E. coli* Nissle 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43, 373-384.
- Westmermeier R (1993) *Electrophoresis in practice*. VCH, New York, pp. 1-277.
- White RJ, Lancini G (1971) Uptake and binding of [<sup>3</sup>H] rifampicin by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* 240, 429-434.
- Whitehead K, Versalovic J, Roos S, Britton RA (2008) Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* 74, 1812-1819.
- Whitman WB, Colema DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6578-6583.
- Widdison A, Alvarez C, Chang YB, Karanjia ND, Reber HA (1994) Sources of pancreatic pathogens in acute pancreatitis. *Pancreas* 9, 536-541.
- Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (1997) *Proteome research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer-Verlag.
- Williams HE, Smith LH (1968) Disorders of oxalate metabolism. *Am J Med* 45, 715-735.
- Williams PEW, Newbold CJ (1990) Rumen probiosis: the effect of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity in recent advances in animal nutrition. In: *Rumen Microflora*, Haresign W, Cole DJA, eds., Butterworth, London, pp. 211-227.

- Williamson LL, Borlee BR, Schloss PD, Guan C, Allen HK *et al.* (2005) Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl Environ Microbiol* 71, 6335-6344.
- Woese CR (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8392-8396.
- Woodmansey EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S (2004) Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiota in young adults and in non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* 70, 6113-6122.
- Woodmansey EJ (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 102, 1178-1186.
- Wostmann BS, Bruckner-Kardoss E, Pleasants JR (1982) Oxygen consumption and thyroid hormones in germfree mice fed glucose-amino acid liquid diet. *J Nutr* 112, 552-559.
- Wostmann BS (1996) Germfree and gnotobiotic animal models: background and applications. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Wozny ME, Carnevale HN, Jones EE (1975) Alteration of regulation of arginine biosynthesis in *Escherichia coli* W by mutation to rifampin resistance. *Biochem Biophys Acta* 383, 106-116.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134, 489-492.
- Xavier KB, Bassler BL (2005) Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 238-248.
- Xavier RJ, Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434.
- Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N, Miyaji K, Oshida K *et al.* (2003) Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J Dairy Sci* 86, 2452-2461.
- Xiao H, Gulen MF, Qin J, Yao J, Bulek K *et al.* (2007) The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity* 26, 461-475.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M *et al.* (1998) IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101, 311-320.
- Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK *et al.* (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 299, 2074-2076.
- Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M *et al.* (2007) Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol* 5, 1574-1586.
- Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1463-1468.
- Yadav H, Jain S, Sinha PR (2007) Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* 23, 62-68.
- Yamazaki S, Tsuyuki S, Akashiba H *et al.* (1991) Immune response of *Bifidobacterium*-monoassociated mice. *Bifidobacter Microflora* 10, 19-31.
- Yan F, Polk DB (2002) Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 50959-50965.

- Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK *et al.* (2007) Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 132, 562-575.
- Yang PC, Jury J, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM *et al.* (2006) Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens. *Am J Pathol* 168, 3-5.
- Yang F, Wang J, Li X, Ying T, Qiao S *et al.* (2007) 2-DE and MS analysis of interactions between *Lactobacillus fermentum* I5007 and intestinal epithelial cells. *Electrophoresis* 28, 4330-4339.
- Yang J, Lee H-R, Low K, Chatterjee S, Pimentel M (2008) Rifaximin versus other antibiotics in the primary treatment and retreatment of bacterial overgrowth in IBS. *Dig Dis Sci* 53, 169-174.
- Yasui H, Shida K, Matsuzaki T, Yokokura T (1999) Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 383-389.
- Yildirim Z, Winters DK, Johnson MG (1999) Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J Appl Microbiol* 86, 45-54.
- You HJ, Oh DK, Ji GE (2004) Anticancerogenic effect of a novel chiroinositol-containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4. *FEMS Microbiol Lett* 240, 131-136.
- Younes H, Coudray C, Bellanger J, Demigne C, Rayssiguier Y *et al.* (2001) Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr* 86, 479-485.
- Young SL, Simon MA, Baird MA, Tannock GW, Bibiloni R *et al.* (2004) Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 686-690.
- Yuan J, Zhu L, Liu X, Li T, Zhang Y *et al.* (2006) A proteome reference map and proteomic analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Mol Cell Proteomics* 5, 1105-1118.
- Yuan J, Wang B, Sun Z, Bo X, Yuan X *et al.* (2008) Analysis of host-inducing proteome changes in *Bifidobacterium longum* NCC2705 grown in vivo. *J Proteome Res* 7, 375-385.
- Yuen LKW, Leslie D, Coloe PJ (1999) Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J Clin Microbiol* 37, 3844-3850.
- Yukawa H, Omumasaba CA, Nonaka H, Kós P, Okai N *et al.* (2007) Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* 153, 1042-1058.
- Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ *et al.* (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15681-15686.
- Zhang G, Ghosh S (2001) Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107, 13-19.
- Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J (2005) Live and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 135, 1752-1756.
- Zhang Q, Mousdicas N, Yi Q, Al-Hassani M, Billings SD *et al.* (2005) Staphylococcal lipoteichoic acid inhibits delayed-type hypersensitivity reactions via the platelet-activating factor receptor. *J Clin Invest* 115, 2855-2861.
- Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run J-Q, Wei CL *et al.* (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* 4, 108-118.

- Zhou JS, Gopal PK, Gill HS (2001) Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int J Food Microbiol* 63, 81-90.
- Zoetendal EG, Akkermans AD, de Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64, 3854-3859.
- Zoetendal EG, Akkermans AD, Akkermans-van Vliet WM, de Visser AGM, de Vos WM (2001) The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecol in Health & Disease* 13, 129-134.
- Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL *et al.* (2002) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 68, 3401-3407.
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota. *J Nutr* 134, 465-472.
- Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM (2006) A microbial world within us. *Mol Microbiol* 59, 1639-1650.
- Zunic P, Lacotte J, Pegoix M, Buteux G, Leroy G *et al.* (1991) *Saccharomyces boulardii* fungemia. Apropos of a case. *Therapie* 46, 498-499.
- Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer KH (2003) Improved fluorescence *in situ* hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis. *Syst Appl Microbiol* 26, 327-337.
- Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer KH (2004) Improved method for polynucleotide probe-based cell sorting, using DNA-coated microplates. *Appl Environ Microbiol* 70, 494-497.
- Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U *et al.* (2007) Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* 9, 804-816.

# Appendice 1

# Genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07

Beatrice Vitali<sup>a</sup>, Silvia Turrone<sup>a</sup>, Fabrizio Dal Piaz<sup>a,1</sup>, Marco Candela<sup>a</sup>,  
Valerie Wasinger<sup>b</sup>, Patrizia Brigidi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, CIRB-center for Biotechnology, University of Bologna, Via Belmeloro 6, 40126, Bologna, Italy

<sup>b</sup> Bioanalytical Mass Spectrometry Facility, Wallace Wurth Building, University of NSW, Kensington, NSW 2052, Australia

Received 13 October 2006; accepted 2 February 2007

Available online 22 February 2007

## Abstract

Rifaximin resistance in the probiotic strain *Bifidobacterium infantis* BI07 was studied to assess the use of an antibiotic–probiotic combination for clinical management of intestinal disorders. A rifaximin-resistant mutant was selected and a 129 bp core region of the *rpoB* gene was sequenced and compared with the respective sequence of the sensitive clone. A miss-sense mutation of codon 513, producing the substitution of Gln with Arg in the protein sequence, was found. The involvement of metabolic changes associated with rifaximin resistance was also investigated by proteomic analysis performed with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. The principal categories of proteins, whose expression levels varied as a consequence of rifaximin resistance, included chaperonins, regulatory factors and metabolic enzymes. The hypothesis of rifaximin inactivation by bacterial enzymatic activities was excluded, as neither structural modifications nor degradation derivatives of the drug moiety was identified using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Probiotics; Bifidobacteria; Rifaximin resistance; RNA polymerase; *rpoB* gene; Proteomics

## 1. Introduction

Bifidobacteria form one of the major groups of inhabitants of the human large intestine and play an important role in normal gut function and maintaining host health [12]. Due to their probiotic properties, some *Bifidobacterium* species are now common components in many fermented dairy products and pharmaceutical preparations. Several mechanisms exerted by probiotics have been suggested as being related to intestinal disorders: competitive exclusion of enteropathogens; modulation of the immune response of gut-associated lymphoid and epithelial cells; antimicrobial activity and suppression of pathogen growth; enhancement of barrier function; and induction

of T-cell apoptosis in the mucosal immune compartment [7,10,25].

Rifaximin is one of the antibiotics used for treatment of intestinal disorders [9]. It is a structural analogue of rifamycin, characterized by low gastrointestinal absorption and good antibacterial activity [18]. Rifaximin is a highly potent inhibitor of bacterial RNA polymerase. It forms a complex with the  $\beta$ -subunit of the enzyme, resulting in blockage of the translocation step that would ordinarily follow formation of the first phosphodiester bond during the transcription process [19]. The effect of rifaximin on the intestinal bacterial population was studied in a clinical trial performed in patients with ulcerative colitis. The administration of high doses of antibiotics did not permanently alter the microbiota equilibrium, but enabled selection of a significant number of rifaximin-resistant bacteria belonging to the genus *Bifidobacterium*. Interestingly, these mutants disappeared during the “wash-out” cycle, suggesting possible resistance reversion or metabolic disadvantages in

\* Corresponding author. Tel.: +39 051 2099743; fax: +39 051 2099734.

E-mail address: patrizia.brigidi@unibo.it (P. Brigidi).

<sup>1</sup> Present address: Department of Pharmaceutical Sciences, University of Salerno, Via Ponte Don Melillo, 84084 Fisciano (SA), Italy.

competition with wild-type clones without selective pressure [5]. No reports exist describing the molecular basis of bacterial resistance to rifaximin, while resistance to rifampicin in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* mutants has been characterized at the genetic level and is linked to mutations in the *rpoB* gene, which encodes the  $\beta$ -subunit of RNA polymerase. More than 95% of mutations map to “hot spot” codons located in an 81 bp core region of the gene [13,16,30,32]. However, other resistance mechanisms cannot be excluded, as a significant number of rifampicin-resistant mycobacteria with no mutations targeted to the *rpoB* gene have been isolated from different clinical samples [13,32]. In particular, the possibility that natural resistance to rifampicin might be attributed to an altered permeability barrier [14] or to inactivation of the drug moiety has been discussed [22].

In the present paper, we highlight molecular aspects of rifaximin resistance in the probiotic strain *Bifidobacterium infantis* BI07 by characterizing specific mutations on the *rpoB* gene of a resistant mutant. Furthermore, a proteomic study was carried out to evaluate metabolic changes related to the resistance phenotype.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and culture conditions

The bifidobacterial strains used in this study are listed in Table 1. *B. infantis* BI07, *Bifidobacterium breve* BBSF and *Bifidobacterium longum* BL04 are components of the probiotic preparation VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, FL, USA). All bifidobacteria were grown anaerobically in MRS medium (Difco) containing 0.05% L-cysteine, at 37 °C for 18–36 h. Anaerobic conditions were achieved in anaerobic jars supplemented with Anaerocult A (Merck).

### 2.2. Selection of rifaximin spontaneous resistant mutants

Minimal inhibitory concentrations (MICs) of rifaximin against bifidobacterial strains were determined by the agar dilution method [20]. A stock solution of 10 mg ml<sup>-1</sup> rifaximin (Alfa Wassermann, Italy) in methanol was used to prepare

MRS plates with scalar concentrations of antibiotic (0.031–32  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Spontaneous mutants, resistant to 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  rifaximin, were selected using the method of Marchese et al. [17]. The resistance stability was studied by performing sequential cultivation steps of the resistant clones in MRS broth without rifaximin. Colonies were counted in MRS plates with and without rifaximin after 100, 200, 300 and 400 bacterial generations.

### 2.3. Sequence determination of the *rpoB* gene

Isolation of genomic DNA from *B. infantis* BI07 wild-type (BI07-wt) and rifaximin-resistant mutant (BI07-res) was performed using the DNeasy tissue kit (Qiagen). Chromosomal DNAs were used as template to amplify a core segment of 410 bp inside the *rpoB* gene using the primers rpoB-L (5'-CCAGGTCGGCGAGCTGAT-3') and rpoB-R (5'-TACGGGGTCTCGATGAAGC-3'), which were designed by modifying primers TR1 and TR2b [30] on the basis of the *rpoB* gene sequence of *B. longum* NCC2705 [26]. PCR was carried out in a Biometra thermal cycler T gradient (Biometra) and Dynazyme II (Celbio) was used as thermostable polymerase. The amplified fragments were subjected to automated sequence analysis of both DNA strands using the primer set rpoB-L/rpoB-R. Oligonucleotides and sequencing of PCR products were provided by M-Medical. Sequences were composed of codons 508–550 (numbering system described by Telenti et al. [30]) and were deposited in the DDBJ databases under accession numbers AB198734 (BI07-wt) and AB198735 (BI07-res). Mutations on the *rpoB* gene of the resistant mutant were searched using the Clustal W program [31].

### 2.4. Proteome analysis

Proteomic characterization was carried out on BI07-wt grown in MRS and BI07-res grown in both MRS and MRS supplemented with rifaximin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Cultural broth samples for the early-logarithmic growth phase (5 h after inoculation) and stationary phase (24 h after inoculation) were centrifuged at 9000 g for 5 min at 4 °C. Cell pellets (20 mg) were washed with 1 ml of low salt washing buffer (3 mM KCl, 68 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Bacterial cells were suspended in lysis solution [0.11 M dithiotreitol, 0.11 M Chaps, 8 M urea, 2 M thiourea, 35 mM Tris, and Complete Protease Inhibitor (Roche Molecular Biochemicals)] and cell lysis was performed using the cell shearing method described by Vitali et al. [33]. Extracted proteins were solubilized in IEF solution [7 M urea, 2 M thiourea, 4% Chaps and 0.005% (v/v) 2-mercaptoethanol] for 2DE analysis. Total protein concentration of the cell extract was calculated using the PlusOne 2D Quant Kit (GE Healthcare). BI07-wt and BI07-res proteins were resolved by isoelectric focusing (IEF) on 13 cm Immobiline DryStrips with a linear gradient pH 4–7 (GE Healthcare). The protein sample (100  $\mu\text{g}$ ) was applied by in gel rehydration (12 h) in a solution containing 8 M urea, 2% Chaps, 10 mM dithiotreitol, 2% (v/v) ampholine, pH 4.0–6.5 (GE Healthcare) and 0.8% bromophenol blue. IEF

Table 1  
MIC of rifaximin against bifidobacteria used in this study

Strain <sup>a</sup>	MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
<i>B. longum</i> biovar <i>infantis</i> ATCC 15697 <sup>T,b</sup>	0.25
<i>B. breve</i> ATCC 15700 <sup>T</sup>	0.5
<i>B. longum</i> ATCC 15707 <sup>T</sup>	0.125
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521 <sup>T</sup>	0.25
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 <sup>T</sup>	0.5
<i>B. longum</i> biovar <i>infantis</i> BI07 <sup>b</sup>	0.5
<i>B. breve</i> BBSF	<0.0625
<i>B. longum</i> BL04	0.5

T, type strain.

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, MD); *B. infantis* BI07, *B. breve* BBSF and *B. longum* BL04 are included in VSL#3.

<sup>b</sup> These strains are designated *B. infantis* throughout the paper.

was performed using an IPGphor (GE Healthcare) for a total of 19 kVh. IPG strips were then reduced and alkylated [11] prior to loading onto 15% acrylamide separating gels (20 cm long, 1 mm thickness) and electrophoresis was performed using Protean II xi Cell (Bio-Rad). SDS-PAGE gels were run at 250 V for 7 h. The spots were visualized with a mass spectrometry-compatible silver-staining procedure [28] or by staining with colloidal Coomassie G250. Gels were scanned using a GS-800 imaging densitometer (Bio-Rad) and images analyzed by PDQuest software, version 6.2 (Bio-Rad). A total of five 2D protein maps for each clone and growth condition were processed. Student's *t* test ( $P < 0.05$ ) was used to select >threefold significantly changed spots. The selected protein spots were excised from the acrylamide gel and subjected to in gel tryptic digestion and extraction of peptides [28]. The extracted peptides were purified with ZipTip (Millipore). Peptide mass fingerprinting maps of tryptic peptides were generated by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) with a Voyager-DE Pro Biospectrometry work station (Applied Biosystems). All spectra were obtained in a reflectron mode, with an accelerating voltage of 20 kV and a delayed extraction of 40 ns. Internal calibration with peptides arising from trypsin autolysis was performed. Peptide masses were searched against the NCBI non-redundant protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the ProFound program (<http://129.85.19.192/index.html>). Proteins with a minimum of three matching peptides were considered positive.

The confidence of the MALDI-TOF MS identification was verified for four proteins by performing liquid chromatography associated tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The HPLC apparatus consisted of a CapLC capillary HPLC (Waters Corporation). Chromatographic separation was performed on a C<sub>18</sub> Vydac column (100 mm × 0.3 mm) (Dionex Corporation) with a flow rate of 300 nl min<sup>-1</sup>. Peptides were eluted using 40 min linear gradient of 10% (v/v) solvent A [2% (v/v) formic acid and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid] up to 60% (v/v) solvent B [acetonitrile containing 2% (v/v) formic acid and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid]. Mass spectra were obtained on a Q-TOF micro from Micromass (Waters) equipped with a nanospray source; acquisitions were performed in positive mode and over the *m/z* range from 400–1800. Peptide sequencing of the most intense ions was obtained (data dependent scan) over an *m/z* range from 200–1800 using Masslynx software (Waters).

### 2.5. MS analysis of structural modifications in rifaximin

Possible modifications of rifaximin moiety induced by enzymatic activities of the resistant bacteria were MS-analyzed. Samples of both early-logarithmic and stationary phase cultures were centrifuged at 9000 *g* for 5 min. The cellular pellet was treated with lysis buffer [20 mM Tris/HCl pH 8, 2 mM EDTA, 1.2% (v/v) TritonX-100 and 20 mg ml<sup>-1</sup> lysozyme] at 37 °C for 30 min. Rifaximin was extracted from cultural supernatant and cellular lysate with an equal volume of ethyl acetate (Sigma). Both ethyl acetate extracts underwent LC-MS/MS

analysis. The HPLC apparatus consisted of a System Gold (Beckman Coulter) equipped with a microflow binary pump. Chromatographic separation was performed on a C<sub>18</sub> Jupiter column (250 mm × 2.1 mm) (Phenomenex) eluted at 0.2 ml min<sup>-1</sup> with a linear gradient of 20 min of 40% (v/v) solvent A [0.1% (v/v) trifluoroacetic acid] up to 80% (v/v) solvent B [acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid]. Mass spectra were obtained on a Q-TOF from Micromass (Waters) operating in positive mode in the *m/z* range from 400 to 1800. To perform complete characterization and unambiguous identification of rifaximin, also tandem MS spectra were acquired in a dependent scan mode.

## 3. Results

### 3.1. Development of rifaximin resistance in *Bifidobacterium*

The antibacterial activity of rifaximin was tested against the type strains of the most representative intestinal bifidobacterial species (*B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium bifidum*) and against three bifidobacteria included in the probiotic preparation VSL#3 (*B. infantis* BI07, *B. breve* BBSF and *B. longum* BL04). All bifidobacteria were sensitive to the antibiotic, indicated by the MIC values ranging from <0.0625 to 0.5 µg ml<sup>-1</sup> (Table 1).

Subsequently, the emergence of rifaximin resistance was evaluated by in vitro experiments selecting for spontaneous resistant clones on MRS plates containing increasing concentrations of the drug. This phenotype was easily acquired by all bifidobacteria analyzed. One mutant able to grow in the presence of 100 µg ml<sup>-1</sup> rifaximin was selected for each strain and resistance stability in the absence of selective pressure was studied. Since the resistant phenotype persisted for more than 400 bacterial generations, we concluded that no reversal of antibiotic resistance had occurred.

### 3.2. Mutation analysis of the *rpoB* gene in *B. infantis* BI07

Nucleotide mutations of the *rpoB* gene were searched in the probiotic strain *B. infantis* BI07, which represents our model organism. We analyzed a 129 bp core region (codons 508–550) containing the 81 bp segment where the majority of mutations associated with rifampicin resistance in *E. coli* and *M. tuberculosis* have been mapped [13,16,30,32]. One point substitution (CAG to CGG) was located in codon position 513. This transition was a miss-sense mutation resulting in the substitution of **Gln** with **Arg** in the primary sequence of the β-subunit of RNA polymerase. Notably, position 513 has already been characterized as a “hot spot” codon related to rifampicin resistance in *M. tuberculosis* [32].

### 3.3. Proteome changes associated with rifaximin resistance in *B. infantis* BI07

Metabolic changes related to the rifaximin resistance phenotype were investigated in *B. infantis* BI07 using a proteomic

approach. Proteome analysis of BI07-wt and BI07-res was performed using both exponential and stationary phase bacteria, as significant differences in protein composition have been described during bacterial growth [34]. BI07-res was cultivated with and without rifaximin.

A total of 21 proteins with different expression levels in BI07-wt and BI07-res during the exponential growth phase were identified by MS (Fig. 1 and Table 2). Four proteins were downregulated in BI07-res, 16 were upregulated in BI07-res and one protein was found only in BI07-res. These proteins represented 65% of total proteins recognized as differentially expressed in BI07-wt and BI07-res. Among downregulated proteins, we identified a putative ferredoxin (spot 1) and a protein similar to the ATP synthase  $\beta$  chain (spot 3). Both proteins have been linked to antibiotic resistance phenomena: reduced transcription of the ferredoxin gene has been observed in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* [23], and structural alterations in ATP synthase have been observed in several antibiotic-resistant bacteria [15]. Up-regulated spots included three stress proteins (spots 6, 7 and 19), eight metabolic enzymes (spots 5, 8, 10, 13, 14, 15, 16 and 21) and three regulatory factors (spots 11, 17 and 20). A role in the cell response to stress in *E. coli* has also been hypothesized for S-adenosylmethionine synthetase (spot 13) and elongation factor G (spot 20) [6,8]. Among proteins involved in cell metabolism, putative *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase (spot 5) and acetyl-CoA acetyltransferase (spot 15) are noteworthy because they play a role in the pathway for polynuclear aromatic hydrocarbon biodegradation and in the catabolism of xenobiotics, respectively [1]. D-2-hydroxy-acid dehydrogenase (spot 21), which has been related

to the biosynthesis of proline under stress conditions in *Corynebacterium* [2], was detected only in BI07-res.

Eighteen proteins with different expression levels in BI07-wt and BI07-res in the stationary growth phase were identified by MS (Fig. 2 and Table 3). Three proteins were downregulated and 15 proteins upregulated in the resistant mutant. They represent 70% of total proteins recognized as differentially expressed in BI07-wt and BI07-res. Regarding downregulated proteins, two regulatory factors (spots 1 and 2) were detected in addition to 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (spot 3). This enzyme takes part in the biosynthesis of terpenoids and isoprenoids, components of the plasma membrane responsible for permeability modulation [29]. Analogously with proteome changes in the exponential phase, upregulated proteins in BI07-res during the stationary phase included two shock proteins (spots 8 and 15), two enzymes with acetyltransferase activity (spots 11 and 12) and the same putative *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase (spot 4). SufE protein (spot 7), the hypothetical protein with a possible ssDNA binding domain (spot 16) and alpha beta hydrolase (spot 17) can be grouped into the stress protein family because of their role in oxidative and energy stresses and cell protection against DNA damage. Alpha beta hydrolase also cooperates with RsbP phosphatase in dephosphorylation of anti-anti-sigma factor RsbV with consequent activation of transcription factor  $\sigma^B$ . In *Bacillus subtilis*  $\sigma^B$  and RsbP phosphatase control the general response to environmental stress and have also been associated with resistance to rifampicin [3]. Other positive transcription regulators, anti-anti-sigma factor (spot 9) and RNA polymerase sigma factor rpoD (spot 18), were found to be overexpressed in BI07-res.

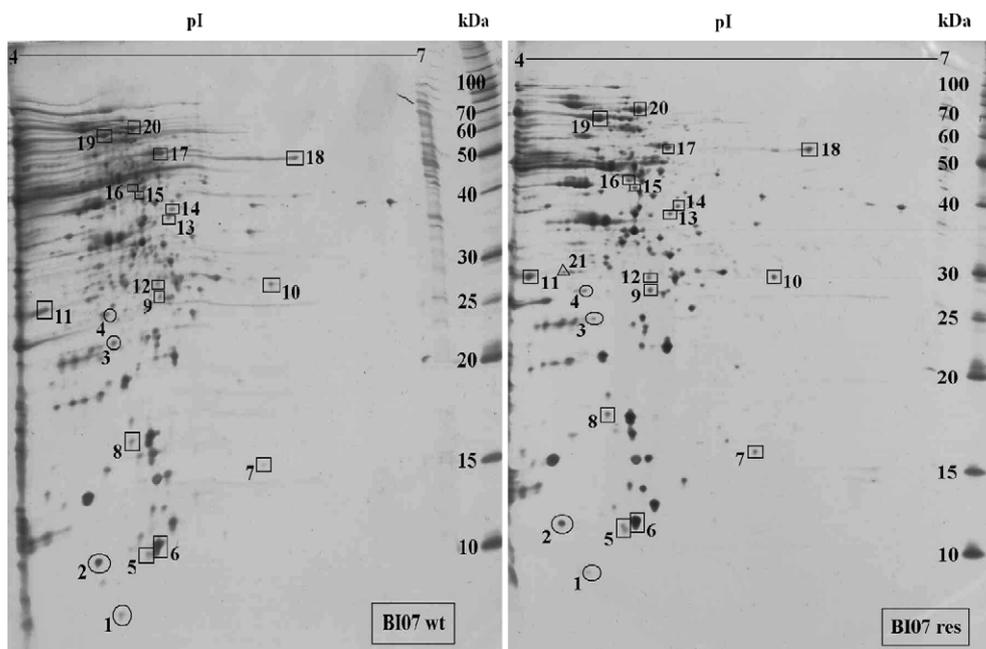


Fig. 1. Silver-stained 2DE maps of total proteins extracted from *B. infantis* BI07-wt and -res in exponential growth phase. BI07-res was grown in the presence of rifaximin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Proteins were separated by isoelectric focusing in the pI range of 4–7 in the first dimension and 15% SDS-PAGE in the second dimension. Circles and squares indicate down and upregulated proteins in BI07-res, respectively. The triangle indicates a spot visualized only in BI07-res.

Table 2  
Differentially expressed proteins in *B. infantis* BI07-wt and -res during exponential growth phase

Spot no. <sup>a</sup>	Homologous protein	Microorganism (accession no. <sup>b</sup> )	Observed migration (pI/kDa)	Theoretic migration (pI/kDa)	No. of peptides matched	Coverage (%)	Score
Proteins downregulated in BI07-res							
1	Putative ferredoxin	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) (gi 21222275)	4.8/8	5.2/7.4	3	34	9.9e–001
2	Hypothetical protein	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (gi 23335834)	4.6/9.5	4.9/8.5	4	33	1.0e+000
3	Protein with similarity to ATP synthase B chain	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23464960)	4.7/21.5	5.2/18.8	3	21	9.7e–001
4	Hypothetical protein	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (gi 23335579)	4.7/24	4.4/25.1	3	25	8.7e–001
Proteins upregulated in BI07-res							
5	Putative <i>cis</i> -naphthalene dihydrodiol dehydrogenase	<i>Rhodococcus</i> sp. IBN (gi 10933942)	4.8/11.5	4.7/13.7	4	43	1.0e+000
6	Co-chaperonin GroES (HSP10)	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (gi 23336432)	4.9/12	5.1/10.6	3	22	5.6e–001
7	Universal stress protein family	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 (gi 15841091)	5.7/15.5	5.5/15.3	3	20	4.1e–001
8	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	<i>Streptomyces lividans</i> (gi 2492971)	4.7/17.5	4.9/16.7	4	31	2.1e–001
9	Manganese-stabilizing protein precursor	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120 (gi 17231346)	5/28	4.9/29.9	4	27	1.0e+000
10	3-Methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (gi 15609362)	5.8/29	5.6/29.4	5	24	1.0e+000
11	Segregation and condensation protein B	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 (gi 15841170)	4.2/29	4.5/25.3	4	27	1.0e+000
12	Hypothetical protein	<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A (gi 23335524)	5/29	4.8/33.5	3	18	7.5e–001
13	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23466330)	5.1/39	4.8/43.9	3	18	1.8e–001
14	Ketosynthase	<i>Streptomyces tauricus</i> (gi 7209612)	5.2/40	5.3/41	3	22	3.0e–001
15	Acetyl-CoA acetyltransferase	<i>Deinococcus radiodurans</i> (gi 15807466)	4.9/42	5.1/41.1	3	19	9.6e–001
16	Adenosine deaminase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (gi 15610449)	4.8/45	5.3/40.1	5	25	8.9e–001
17	Glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 (gi 21324061)	5.1/54.6	4.9/55.8	4	24	1.0e+000
18	Hypothetical protein Rv2097c	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (gi 15609234)	6/55	6.3/51.7	3	22	6.1e–002
19	60 kDa chaperonin (GroEL)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (gi 29839413)	4.6/68.6	5/61.2	6	28	1.0e+000
20	Elongation factor G	<i>Tropheryma whipplei</i> TW08/27 (gi 28572835)	4.9/71	5.2/77.5	5	24	1.0e+000
Proteins expressed only in BI07-res							
21	D-2-hydroxy-acid dehydrogenase homolog unkdh	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (gi 11356550)	4.4/30	4.7/33	3	20	1.0e+000

Student's *t* test,  $P = 0.05$ . Proteins were identified by MALDI-TOF. Proteins with a minimum of three matching peptides were considered positive. BI07-res was grown in the presence of rifaximin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

<sup>a</sup> Refers to proteins labelled in Fig. 1.

<sup>b</sup> gi Number of NCBI database.

Comparison of 2D maps of BI07-res cultivated with and without rifaximin pointed out differences in protein expression levels which were genetically determined or induced by selective pressure. As only four proteins were induced by antibiotic exposure (putative *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase, S-adenosylmethionine synthetase, 65 kDa heat shock protein and putative acetyltransferase), we did not show the 2D maps of BI07-res grown without rifaximin. It is also noteworthy that identification of differentially

expressed proteins was most closely matched with the genera *Bifidobacterium*, *Mycobacterium* and *Streptomyces*, which have closely related phylogenetic profiles (Tables 2 and 3).

The reliability of MALDI-TOF MS analysis was verified by performing LC-MS/MS on four proteins, two related to the exponential (spots 6 and 20) and two to the stationary (spots 8 and 17) growth phase. Consistent results were achieved using the different MS techniques (data not shown).

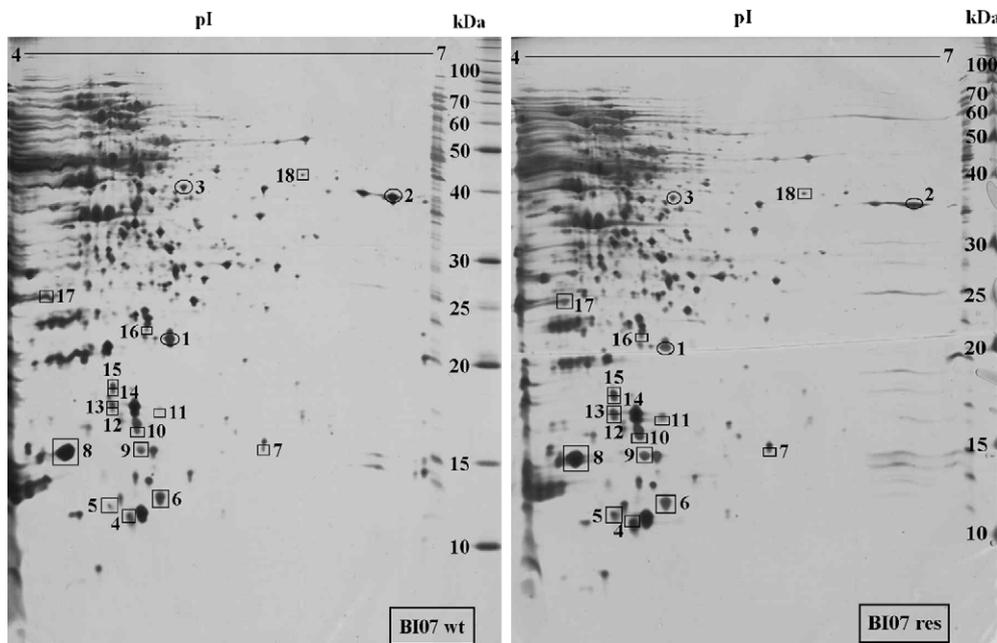


Fig. 2. Silver-stained 2DE maps of total proteins extracted from *B. infantis* BI07-wt and -res in stationary growth phase. BI07-res was grown in the presence of rifaximin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Proteins were separated by isoelectric focusing in the pI range of 4–7 in the first dimension and 15% SDS-PAGE in the second dimension. Circles and squares indicate down and upregulated proteins in BI07-res, respectively.

### 3.4. Rifaximin modifications induced by *B. infantis* BI07-res

Since potential enzymatic inactivation of rifaximin by BI07-res may be presumed on the basis of upregulation of acetyltransferase enzymes and *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase, structural changes in the drug moiety were analyzed using LC–MS/MS. Neither chemical modifications nor degradation derivatives of the rifaximin moiety were detected. The exclusion of a biodegradation pattern for the drug was further supported by the quantitative recovery in culture fractions of the total rifaximin amount ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) added to the culture medium (data not shown).

## 4. Discussion

Genetic and proteomic approaches were employed to elucidate molecular mechanisms determining rifaximin resistance in *Bifidobacterium*, and the expected interactions occurring in the gut between these bacteria and the drug.

We first demonstrated that a representative number of bifidobacteria spontaneously assume resistance when cultured in the presence of rifaximin, and stably maintain the phenotype in the absence of selective pressure. Exclusion of any reversion phenomenon suggested two hypotheses: (i) stable and immobile genetic elements encode resistance; (ii) the drug moiety does not act as an inducer of the resistance phenotype, but enables selection of resistant mutants. Further genetic and proteomic investigations were carried out using *B. infantis* BI07 as a model strain. The choice of this strain was determined based on the following elements: (i) *B. infantis* BI07 is a component of a probiotic preparation successfully used for management of gastrointestinal disorders [10]; (ii) its

capacity to survive and persist in the gut was demonstrated [4,10]; (iii) a proteomic overview of this strain has been recently reported [33].

Since point mutations in *rpoB* have been indicated as representing the principal factor determining rifampicin resistance in *E. coli* and *M. tuberculosis* [13,16,30,32], we verified whether a similar mechanism also occurs in *Bifidobacterium*. The analysis of a 129 bp *rpoB* core region of BI07-wt and BI07-res revealed a miss-sense mutation in position 513, already identified as a “hot spot” codon in *E. coli* and *M. tuberculosis* rifampicin-resistant mutants. This result suggests a potential role of the amino acid encoded by codon 513 in binding with the antibiotic moiety.

To achieve an overall view of metabolic modifications associated with rifaximin resistance in *Bifidobacterium*, proteomic analysis was performed. Comparative proteomic mapping of BI07-wt and BI07-res revealed that most differences in protein expression patterns were genetically encoded rather than induced by antibiotic exposure. In particular, we point out a linkage between the rifaximin resistance phenotype and increased expression levels of stress proteins. Overexpression of stress proteins was expected, as they represent a common non-specific response by bacteria when stimulated by different shock conditions, including exposure to toxic agents like heavy metals, oxidants, acids, bile salts and antibiotics [21,24]. Also, positive transcription regulators were found to be overexpressed in BI07-res, suggesting that bacteria could activate compensatory mechanisms to assist the transcription process in the presence of RNA polymerase inhibitors. Other differences in expression profiles were related to proteins involved in central metabolism; these modifications suggest metabolic disadvantages of resistant mutants in comparison

Table 3  
Differentially expressed proteins in *B. infantis* BI07-wt and -res during stationary growth phase

Spot no. <sup>a</sup>	Homologous protein	Microorganism (accession no. <sup>b</sup> )	Observed migration (pI/kDa)	Theoretic migration (pI/kDa)	No of peptides matched	Coverage (%)	Score
Proteins downregulated in BI07-res							
1	Elongation factor P	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23464692)	5.1/21	5/20.7	3	22	1.0e+000
2	Transcriptional regulator, putative	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 (gi 15839642)	6.8/39	6.6/40.7	4	20	3.8e–001
3	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23464723)	5.3/40	5.2/42.1	3	21	4.0e–001
Proteins upregulated in BI07-res							
4	Putative <i>cis</i> -naphthalene dihydrodiol dehydrogenase	<i>Rhodococcus</i> sp. 1BN (gi 10933942)	4.8/10.5	4.7/13.7	4	40	1.0e+000
5	Oxygenase	<i>Streptomyces argillaceus</i> (gi 3334823)	4.7/11	4.7/10.8	3	20	6.7e–001
6	Hypothetical protein SCC75A.34c	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) (gi 21220757)	5/12.5	4.6/12.2	3	28	9.2e–001
7	SufE protein probably involved in Fe–S center assembly	<i>Cytophaga hutchinsonii</i> (gi 48854817)	5.8/14.5	5.4/16	5	33	1.0e+000
8	65 kDa heat shock protein	<i>Mycobacterium chelonae</i> (gi 602177)	4.3/15	4.7/12.4	3	58	1.0e+000
9	Anti–anti-sigma factor	<i>Chlamydia muridarum</i> (gi 15835322)	4.9/15	5.3/12.6	3	33	5.1e–001
10	Protein-tyrosine-phosphatase	<i>Nostoc</i> sp. PCC7120 (gi 17228562)	4.8/15.5	5.2/16.5	3	26	5.6e–001
11	Putative acetyltransferase	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 (gi 29830647)	5/16.5	5.2/19.9	3	21	7.2e–001
12	Hypothetical protein with acyl transferase domain	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23464756)	4.6/17	4.6/18.9	3	22	8.9e–002
13	Phospho-2dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	<i>Streptomyces lividans</i> (gi 2492971)	4.6/17.5	4.9/16.7	3	20	2.6e–002
14	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23466229)	4.6/18	4.7/20.6	3	23	2.6e–002
15	Heat shock protein 60	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (gi 24850347)	4.6/18.5	4.5/20.6	3	25	5.3e–001
16	Narrowly conserved hypothetical protein with possible ssDNA binding domain	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23465228)	4.9/22	4.5/20.1	3	26	9.5e–002
17	Possible alpha beta hydrolase	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 (gi 23466334)	4.3/25	4.5/25.7	3	20	2.5e–001
18	RNA polymerase sigma factor rpoD	<i>Streptomyces aureofaciens</i> (gi 133468)	6.1/39	6.3/35.7	3	24	1.8e–001

Student's *t* test, *P* = 0.05. Proteins were identified by MALDI-TOF. Proteins with a minimum of three matching peptides were considered positive. BI07-res was grown in the presence of rifaximin (100 µg ml<sup>-1</sup>).

<sup>a</sup> Refers to proteins labelled in Fig. 2.

<sup>b</sup> gi Number of NCBI database.

with sensitive bifidobacteria in the gut environment, without selective pressure, explaining their disappearance from feces of patients with ulcerative colitis after interruption of anti-biotic treatment [5]. Results similar to our proteomic data were found by Shaw et al. [27], who used a DNA microarray approach to compare changes in global gene expression of *E. coli* induced by different bactericidal agents, including rifampicin. The addition of kanamycin and norfloxacin resulted in the induction of heat shock and SOS responses, while stimulation with rifampicin and ampicillin increased the expression of several genes of central metabolism, particularly involved in nucleotide salvage and purine biosynthesis. Notably, high transcriptional levels of the *rpoB* gene were detected after stimulation with rifampicin.

In conclusion, genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium* presented here, excluding any risk factor for horizontal transmission of resistance elements between intestinal microbial species, opens up the perspective of simultaneous use of the antibiotic rifaximin

and probiotic bifidobacteria for clinical treatment of several gastrointestinal diseases.

## References

- [1] V. Andreoni, S. Bernasconi, M. Colombo, J.B. van Beilen, L. Cavalca, Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN, *Environ. Microbiol.* 2 (2000) 572–577.
- [2] S. Ankri, I. Serebrijski, O. Reyes, G. Leblon, Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of the proA step, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4412–4419.
- [3] J.E. Bandow, H. Brotz, M. Hecker, *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentrations of rifampin involves the sigma(B)-dependent general and multiple stress response, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 459–467.
- [4] P. Brigidi, B. Vitali, E. Swennen, L. Altomare, M. Rossi, D. Matteuzzi, Specific detection of *Bifidobacterium* strains in a pharmaceutical probiotic product and in human feces by polymerase chain reaction, *Syst. Appl. Microbiol.* 23 (2000) 391–399.
- [5] P. Brigidi, E. Swennen, F. Rizzello, M. Bozzolascio, D. Matteuzzi, Effects of rifaximin administration on the intestinal microbiota in patients with ulcerative colitis, *J. Chemother.* 14 (2002) 290–295.

- [6] T. Caldas, S. Laalami, G. Richarme, Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 855–860.
- [7] R.N. Fedorak, K.L. Madsen, Probiotics and the management of inflammatory bowel disease, *Inflamm. Bowel Dis.* 10 (2004) 286–289.
- [8] P. Ferienc, A. Farewell, T. Nystrom, The cadmium-stress stimulon of *Escherichia coli* K-12, *Microbiology* 144 (1998) 1045–1050.
- [9] J.C. Gillis, R.N. Brogden, Rifaximin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential in conditions mediated by gastrointestinal bacteria, *Drugs* 49 (1995) 467–484.
- [10] P. Gionchetti, F. Rizzello, U. Helwig, A. Venturi, M.L. Lammers, P. Brigidi, B. Vitali, G. Poggioli, M. Miglioli, M. Campieri, Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial, *Gastroenterology* 124 (2003) 1202–1209.
- [11] A. Görg, W. Postel, S. Günther, The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* 9 (1988) 531–546.
- [12] F. Guarner, J.R. Malagelada, Gut flora in health and disease, *Lancet* 360 (2003) 512–519.
- [13] L. Herrera, S. Jimenez, A. Valverde, M.A. Garcia-Aranda, J.A. Saez-Nieto, Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996–2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature, *Int. J. Antimicrob. Agents* 21 (2003) 403–408.
- [14] J. Hui, N. Gordon, R. Kajioka, Permeability barrier to rifampicin in mycobacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 11 (1977) 773–779.
- [15] R. Humbert, K. Altendorf, Defective gamma subunit of ATP synthase (F1F0) from *Escherichia coli* leads to resistance to aminoglycoside antibiotics, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 1435–1444.
- [16] D.J. Jin, C.A. Gross, Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance, *J. Mol. Biol.* 202 (1988) 45–58.
- [17] A. Marchese, A. Salerno, A. Pesce, E.A. Debbia, G.C. Schito, In vitro activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against *Clostridium difficile* and the rate of selection of spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species, *Chemotherapy* 46 (2000) 253–266.
- [18] E. Marchi, L. Montecchi, A.P. Venturini, G. Mascellari, M. Brufani, L. Cellai, 4-Deoxyprido[1',2':1,2]imidazo[5,4-c]rifamycin SV derivatives. A new series of semisynthetic rifamycins with high antibacterial activity and low gastroenteric absorption, *J. Med. Chem.* 28 (1985) 960–963.
- [19] W.R. McClure, C.L. Cech, On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis, *J. Biol. Chem.* 24 (1978) 8949–8956.
- [20] National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Anaerobic Bacteria Approved Standard M11-A3, third ed. NCCLS, Wayne, PA, 1997.
- [21] R. O'Toole, H.D. Williams, Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*, *Res. Microbiol.* 154 (2003) 387–392.
- [22] S. Quan, H. Venter, E.R. Dabbs, Ribosylative inactivation of rifampin by *Mycobacterium smegmatis* is a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 2456–2460.
- [23] D.V. Quon, C.E. d'Oliveira, P.J. Johnson, Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15 (1992) 4402–4406.
- [24] B. Sanchez, M.-C. Champomier-Vergès, P. Anglade, F. Baraige, C.G. de los Reyes-Gavilán, A. Margolles, M. Zagorec, Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809, *J. Bacteriol.* 16 (2005) 5799–5808.
- [25] R.B. Sartor, Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics, *Gastroenterology* 126 (2004) 1620–1633.
- [26] M.A. Schell, M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M.C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R.D. Pridmore, F. Arigoni, The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 14422–14427.
- [27] K.J. Shaw, N. Miller, X. Liu, D. Lerner, J. Wan, A. Bittner, B.J. Morrow, Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents, *J. Microbiol. Biotechnol.* 5 (2003) 105–122.
- [28] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850–858.
- [29] S. Takahashi, T. Kuzuyama, H. Watanabe, H. Seto, A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 9879–9884.
- [30] A. Telenti, P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M.J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, T. Bodmer, Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*, *Lancet* 341 (1993) 647–650.
- [31] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acid. Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [32] L.K.W. Yuen, D. Leslie, P.J. Coloe, Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 3844–3850.
- [33] B. Vitali, V. Wasinger, P. Brigidi, M. Guilhaus, A proteomic view of *Bifidobacterium infantis* generated by multi-dimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Proteomics* 5 (2005) 1859–1867.
- [34] V.C. Wasinger, J.D. Pollack, I. Humphery-Smith, The proteome of *Mycoplasma genitalium*. Chaps-soluble component, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1571–1582.

## Appendice 2

1 **Molecular and phenotypic traits of in vitro-selected mutants of *Bifidobacterium* resistant to**  
2 **rifaximin**

3  
4 Beatrice Vitali<sup>a</sup>, Silvia Turrone<sup>a</sup>, Stefania Serina<sup>b,1</sup>, Margherita Sosio<sup>b,1</sup>, Lucia Vannini<sup>c</sup>, Marco  
5 Candela<sup>a</sup>, Maria Elisabetta Guerzoni<sup>c</sup>, Patrizia Brigidi<sup>a,\*</sup>

6  
7 <sup>a</sup>*Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna,*  
8 *Italy.*

9 <sup>b</sup>*Vicuron Pharmaceuticals - Microbial Technologies, via R. Lepetit 34, 21040 Gerenzano, Italy.*

10 <sup>c</sup>*Department of Food Science, University of Bologna, Via Fanin 46, 40127 Bologna, Italy.*

11  
12 \* Corresponding author. Tel.: +39 051 2099743; fax: +39 051 2099734.

13 *E-mail address:* patrizia.brigidi@unibo.it

14  
15 <sup>1</sup> Present address: KtedoGen, via Fantoli 16/15, 20138 Milano, Italy.

16  
17 *Int J Antimicrob Agents: in press*

18 **Abstract**

19 Nucleotide mutations inside a core region of *rpoB* gene, encoding the  $\beta$  subunit of RNA  
20 polymerase, were found in rifaximin-resistant mutants of *Bifidobacterium*. Five different miss-sense  
21 mutations of codons 513, 516, 522 and 529 were identified. Further aspects of the rifaximin  
22 resistance were investigated, using *B. infantis* BI07 as a model strain. A partial resistance of RNA  
23 polymerase of BI07 mutant at rifaximin concentration  $> 10 \mu\text{g/mL}$  was observed by cell-free  
24 transcription assay. The MS detection of rifaximin in the cellular pellet of BI07 resistant mutant, as  
25 well as changes in biosynthesis of saturated and cyclopropane fatty acids during the growth,  
26 suggested a reduction of membrane permeability for the antibiotic moiety.

27

28

29

30

31

32

33 Keywords: *Bifidobacterium*, rifaximin, resistance mechanisms, *rpoB* gene, RNA polymerase,  
34 membrane permeability

35

## 36 1. Introduction

37 The bacterial flora of the gastrointestinal tract plays a major role in human physiology,  
38 modulating metabolic and immunological processes and preventing overgrowth of opportunistic  
39 and pathogen microorganisms. Administration of antimicrobial agents, whether therapeutically or  
40 prophylactically, alters the ecological balance between the host and the normal microbiota [1].  
41 Probiotic bacteria belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera are commonly used to  
42 alleviate the possible gastrointestinal side effects caused by the drugs [2].

43 Rifaximin is a product of synthesis experiments designed to modify the parent compound,  
44 rifamycin, in order to achieve low gastrointestinal absorption and good antibacterial activity. Since  
45 the drug remains virtually unabsorbed after oral administration, it is used locally to treat disorders  
46 mediated by susceptible bacteria, within the gastrointestinal tract. Rifaximin, in common with its  
47 structural analogue rifampicin and other members of the rifamycin class, acts on the  $\beta$  subunit of the  
48 bacterial RNA polymerase to inhibit RNA synthesis [3]. The effects of rifaximin on the  
49 composition of the intestinal microbiota were evaluated by Brigidi et al. Interesting results that  
50 emerged from that study concerned the frequent selection of *Bifidobacterium* rifaximin-resistant  
51 mutants during the antibiotic treatment [4].

52 Point mutations inside *rpoB* gene, encoding the  $\beta$  subunit of RNA polymerase, have been  
53 indicated as the principal factor determining the rifampicin resistance in *Escherichia coli* and  
54 *Mycobacterium tuberculosis* [5, 6]. In a recent work, a miss-sense mutation in the *rpoB* core region,  
55 containing the 81 bp fragment where more than 95% hot spot codons were identified in *E. coli* and  
56 *M. tuberculosis* rifampicin-resistant mutants, was found in a rifaximin-resistant mutant of the  
57 probiotic strain *B. infantis* BI07. This point mutation resulted in the substitution of Gln with Arg in  
58 the protein sequence of the  $\beta$  subunit of RNA polymerase [7].

59 In the present paper, we characterized the *rpoB* gene sequence of several probiotic and intestinal  
60 *Bifidobacterium* strains. Furthermore, using the model strain *B. infantis* BI07, we analysed the  
61 functionality of RNA polymerase and changes of membrane permeability.

62

## 63 **2. Materials and methods**

64

### 65 *2.1. Antimicrobial agent, bacterial strains and culture conditions*

66 Rifaximin was provided by Alfa Wassermann (Italy). A stock solution of 10 mg/mL in  
67 methanol was used. The bifidobacterial strains used in this study are listed in Table 1.  
68 Spontaneously resistant mutants at the rifaximin concentration of 100 µg/mL were selected using  
69 the method described by Vitali et al. [7]. All bifidobacteria were grown anaerobically in MRS  
70 medium (Difco, Detroit, MI) containing 0.05% L-cysteine, at 37°C for 18-36 h. Anaerobic  
71 conditions were achieved in anaerobic jars supplemented with Anaerocult A (Merck, Milan, Italy).

72

### 73 *2.2. rpoB gene analysis*

74 Isolation of genomic DNA and sequencing of *rpoB* gene of the wild type and rifaximin-resistant  
75 *Bifidobacterium* clones, listed in Table 1, were performed as described by Vitali et al. [7]. The  
76 sequences comprised of the codons 508-550 and were deposited in the DDBJ Databases under the  
77 accession numbers reported in Table 1. Mutations on *rpoB* gene of the resistant mutants were  
78 searched using the Clustal W program [8].

79

### 80 *2.3. Cell-free transcription assay*

81 Enzymatic extracts of *B. infantis* BI07 wild type (BI07-wt) and rifaximin-resistant (BI07-res)  
82 were prepared following the procedure of Gross et al. [9], and were slightly modified to increase the  
83 efficiency of cell lysis, as follows. The lysozyme concentration was increased to 15 mg/mL and a  
84 sonication step, consisting of 5 cycles at power level 3 and 30% duty for 30 sec, was added  
85 (Branson Sonifier W-250, Heinemann, Schwäbisch, Germany). The inhibition of RNA polymerase  
86 activity was determined in a cell-free transcription assay. The reaction mixture (50 µL final volume)

87 contained 20 mM Tris-acetate (pH 7.9), 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 16 mM Mg-acetate, 5 mM  
88 DTT, 100 µg/mL bovine serum albumin (BSA), 2 mM ATP, 2 mM CTP, 2 mM GTP, 4 µM UTP,  
89 40 µg/mL calf thymus DNA as template, 2 µCi [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] UTP, 10 µL of enzymatic extract and 0.5 µL  
90 of rifaximin at different concentrations ranging from 0.016 µg/mL to 100 µg/mL (dissolved in 10%  
91 DMSO). The reaction mixture was incubated at 37°C for 45 min, and stopped by adding 150 µL of  
92 ice-cold 10% (w/v) TCA and incubating at 4°C for 30 min. Finally, the reaction products were  
93 collected on glass-fibre filters (UniFilters 96 GF/B, PerkinElmer, Waltham, MA) using a 96 well  
94 harvester (PerkinElmer) and washed with water to eliminate [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] UTP not incorporated. The  
95 radioactivity incorporated into RNA molecules was measured using the Top Count scintillation  
96 counter (PerkinElmer). ATP, CTP, GTP, UTP were from Roche, Mannheim, Germany. [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]  
97 UTP (10 µCi/µL) and calf thymus DNA were from GE Healthcare, Uppsala, Sweden. Solutions  
98 used for the assay were treated with 0.1% DEPC [diethylpicrocarbonate (Sigma-Aldrich)].

99

#### 100 2.4. Rifaximin binding/uptake by *B. infantis* BI07-res

101 A batch fermentation of BI07-res, cultured in MRS with 100 µg/mL of rifaximin, was  
102 performed to study the binding and/or uptake of the antibiotic by resistant cells. One mL of culture  
103 was taken at every h for the first 4 h and after 24 h from the inoculum time. Broth samples were  
104 centrifuged at 9,000 X g for 5 min to separate the bacterial cells from the cultural supernatant.  
105 Rifaximin present in the supernatant and bound to cellular pellet was extracted with 300 µL of ethyl  
106 acetate (Sigma-Aldrich). The cellular pellet was treated with lysis buffer [20 mM Tris/HCl (pH 8),  
107 2 mM EDTA, 1.2 % (v/v) TritonX-100 and 20 mg/mL lysozyme] at 37°C for 30 min. Rifaximin  
108 present in cellular lysate was extracted with 300 µL of ethyl acetate. Ethyl acetate extracts  
109 underwent LC-MS/MS analysis [7], to quantify the content of rifaximin in cultural supernatant,  
110 cellular lysate and portion bound to cellular pellet.

111

#### 112 2.5. Gas chromatographic analysis of membrane fatty acids

113 Membrane fatty acids of BI07-wt and -res clones in exponential and stationary growth phases  
114 were analysed by gas chromatography. BI07-wt and BI07-res were grown in MRS and MRS added  
115 with 100 µg/mL of rifaximin, respectively. Cells were harvested by centrifugation (10,000 X g for  
116 10 min), washed twice with 70 mM Tris/HCl (pH 7) and stored at –80°C until analyses. Lipid  
117 extraction was performed according to the method of Suutari et al. [10]. Fatty acid methyl esters  
118 were prepared by incubating the lipid extracts at 45°C for 15 min in boron trifluoride methanol. The  
119 fatty acid methyl esters were extracted with hexane.

120 The gas chromatography system (HRGR 5660 MEGA Series, Carlo Erba Instrument, Milan,  
121 Italy) was equipped with a flame ionization detector. Fatty acid methyl esters were separated on a  
122 fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm ID) coated with a film of Carbowax, as stationary  
123 phase, of 0.2 µm thickness (Supelco, Bellafonte, PA). The operating parameters were the following:  
124 injector temperature, 220°C; detector temperature, 220°C; gas carrier (He) flow rate, 3 mL/min;  
125 splitting ratio, 1:45 (v/v). The oven temperature was programmed to equilibrate at 60°C at the  
126 beginning of the cycle, then raised from 60°C to 220°C at 4°C/min. Fatty acids were identified on  
127 the basis of the comparison of the mass spectra of the various peaks of the samples with the mass  
128 spectra of standard solutions.

129

### 130 **3. Results and discussion**

131

#### 132 *3.1. Genetic analysis of rifaximin-resistant mutants*

133 The principal pharmacological target of rifaximin is the β chain of bacterial RNA polymerase,  
134 encoded by *rpoB* gene; nucleotide mutations of this gene were searched for all bifidobacteria listed  
135 in Table 1. We analysed a 129 bp core region (codons 508-550) containing the 81 bp segment  
136 where the majority of mutations associated to rifampicin resistance in *E. coli* and *M. tuberculosis*  
137 have been mapped [5, 6]. Table 1 reports a summary of all mutations (miss-sense and silent)  
138 identified in the rifaximin-resistant bifidobacteria. Five different types of miss-sense mutations were

139 found; all were point substitutions and involved codons 513, 516, 522 and 529. Position 529 was a  
140 novel mutation site, not previously described, and position 522 appeared interesting for both the  
141 double point substitutions and the heterogeneous profile of nucleotide changes. The replacement of  
142 Ser with Ala was encountered in *B. breve* ATCC 15700, while the inverse amino acid substitution  
143 was observed in *B. adolescentis* ATCC 15703 and *B. longum* BL04. Related to this finding, a great  
144 sequence polymorphism in codon 522 was observed among the wild type clones of the  
145 bifidobacteria studied in the present work: Ser is present in *B. infantis* ATCC 15697, *B. breve*  
146 ATCC 15700, *B. longum* ATCC 15707, *B. breve* BBSF, but Ala in *B. adolescentis* ATCC 15703, *B.*  
147 *infantis* BI07 and *B. longum* BL04. The strain *B. longum* NCC2705, whose genome sequence has  
148 been completely determined [11], presents a Ser at level of codon 522. The presence of Ser has  
149 been encountered also in *M. tuberculosis* wild type strain used as reference to study *rpoB* gene  
150 mutations in rifampicin-resistant mutants [6]. The sequence heterogeneity of codon 522 in  
151 *Bifidobacterium* leads to hypothesize an indirect role of its encoded amino acid in the binding with  
152 the rifaximin moiety.

153

### 154 3.2. Functional analysis of RNA polymerase of *B. infantis* BI07

155 Further aspects of rifaximin resistance were taken into account using the strain *B. infantis* BI07  
156 as a model system, since a resistant mutant of this strain has been recently characterized at a genetic  
157 and proteomic level [7].

158 To confirm the main role of the mutation on the  $\beta$  chain of RNA polymerase in rifaximin  
159 resistance acquisition, we evaluated the inhibitory effects exerted by rifaximin on in vitro  
160 transcription of BI07-wt and BI07-res enzymatic extracts (Fig. 1). As shown in Fig. 1A, where the  
161 inhibition percentage was correlated with the rifaximin concentration, BI07-wt and BI07-res  
162 exhibited different behaviours when challenged with rifaximin. The inhibition percentage for BI07-  
163 wt increased by increasing the rifaximin concentration in a dose-dependent manner, indicating that  
164 the wild type RNA polymerase was sensitive to rifaximin. On the contrary, the inhibition

165 percentage for BI07-res remained fairly constant until the rifaximin concentration of 20 µg/mL,  
166 then started to increase by increasing the antibiotic dose. The highest inhibition percentages for  
167 BI07-wt (47%) and BI07-res (29%) were observed at the rifaximin concentrations of 10 µg/mL and  
168 100 µg/mL, respectively. Notably, the inhibition percentage did not reach the theoretical value of  
169 100% at the maximum concentration of rifaximin. This is likely due to the presence, in  
170 bifidobacterial enzymatic extracts, of compounds able to interfere with inhibitors, or to a low basal  
171 transcription activity of the extracts. Differences in inhibition percentage of enzymatic extracts of  
172 BI07-wt and BI07-res were calculated for each rifaximin concentration applied (Fig. 1B).  
173 Differential inhibition increased by increasing rifaximin dosage until a concentration of 10 µg/mL.  
174 At higher concentrations of antibiotic, this parameter started to decline indicating a partial  
175 resistance of the mutated RNA polymerase. Since entire BI07-res cells are completely resistant to  
176 rifaximin until a concentration > 100 µg/mL, supplementary resistance mechanisms may take place  
177 in vivo.

178

### 179 *3.3. Membrane barrier for the uptake of rifaximin*

180 Since the colour of the cell pellet of BI07-res cultures grown in presence of rifaximin was  
181 orange (the same colour of rifaximin), but rifaximin did not precipitate in MRS broth, the binding  
182 and/or uptake of the antibiotic moiety to BI07-res cells were investigated by LC-MS/MS. Rifaximin  
183 in the cultural supernatant decreased exponentially to 29% of the initial concentration (100 µg/mL)  
184 during the first 4 h of fermentation, reaching the value of 14% after 24 h. Rifaximin bound to the  
185 cellular pellet increased exponentially to 49% in the first 4 h of bacterial growth and reached the  
186 value of 66% after 24 h. The percentage of rifaximin present within the bacterial cells slightly  
187 increased in the first 4 h reaching the value of 22%, which remained constant until the end of the  
188 fermentation experiment. The definitively major portion of rifaximin found to be bound to the  
189 cellular pellet, respect to the portion recovered in the cellular lysate, suggested a resistance  
190 mechanism involving changes in surface properties and permeability.

191 To understand the mechanism of membrane barrier, we investigated variations in fatty acids  
192 (FAs) composition of BI07-wt and BI07-res membranes. The results of a gas chromatographic  
193 analysis of FAs of BI07-wt and BI07-res clones in exponential and stationary growth phases are  
194 shown in Table 2. Differences in the ratio of percentages of saturated and unsaturated FAs were  
195 observed between sensitive and resistant clones. The increase of saturated FAs (C12:0, C14:0,  
196 C16:0) in the stationary phase was higher in BI07-res than in BI07-wt, whereas the unsaturated  
197 C18:1 $\Delta$ 11 was accumulated in the stationary phase of BI07-wt, but it was constant in the two  
198 growth phases of BI07-res. While saturated FAs confer rigidity to membrane and resistance to  
199 stress agents, such as antibiotics, a high level of lipid unsaturation is associated with high fluidity  
200 and susceptibility to stresses [12]. Thus, the higher percentage of saturated FAs during the  
201 stationary phase of BI07-res could represent a defence mechanism of mutant cells to prevent the  
202 antibiotic uptake. High percentages of cyclopropane fatty acids (CFAs) such as lactobacillic (cis-  
203 11,12-methyleneoctadecanoic) and dihydrosterculic (cis-9,10-methyleneoctadecanoic) acids were  
204 detected in the exponential phase of both strains, while CFAs decreased in the stationary phase.  
205 However, a significant percentage of dihydrosterculic acid accompanied by traces of C17:0cy was  
206 formed during the stationary phase only for BI07-res. CFAs occur in many bacterial cell  
207 membranes and are synthesized from unsaturated fatty acyl chains of membrane phospholipids by  
208 CFA synthase, which adds a methylene carbon bridge across the double bond. Lactobacillic and  
209 dihydrosterculic acids, which derive from a post-transcriptional methylation of C18:1 $\Delta$ 11 (cis-11-  
210 octadecenoic acid) and C18:1 $\Delta$ 9 (cis-9-octadecenoic acid), respectively, are regarded as the major  
211 CFAs in some species including lactic acid bacteria [13]. It has been suggested that the two CFAs  
212 have different activity or specificity. The incorporation of C18:1 $\Delta$ 9, which is the precursor of  
213 dihydrosterculic acid, restored the acid resistance in *E. coli* [14], while the total conversion of  
214 C18:1 $\Delta$ 11 to lactobacillic acid did not restore the acid tolerance in *Salmonella typhimurium* [15].  
215 Thus, the increase of dihydrosterculic acid observed for BI07-res during stationary phase suggests

216 that dihydrosterculic acid could be more suitable than its isomer lactobacillic acid to prevent the  
217 penetration of exogenous molecules, including rifaximin.

218

219 In conclusion, the present study indicates that rifaximin-resistance in *Bifidobacterium* is likely  
220 determined by the combination of two different mechanisms, the mutation of RNA polymerase, the  
221 molecular target of the antibiotic, and a decreased penetration of rifaximin moiety in resistant cells  
222 as a consequence of specific changes in the fatty acid composition, affecting the membrane  
223 permeability.

224

225 **References**

- 226 [1] Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effects of antimicrobial agents on the ecological balance of  
227 human microflora. *Lancet Infect Dis* 2001;1:101-14.
- 228 [2] Sullivan A, Nord CE. Probiotics and gastrointestinal diseases. *J Intern Med* 2005;257:78-92.
- 229 [3] Gillis JC, Brogden RN. Rifaximin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic  
230 properties and therapeutic potential in conditions mediated by gastrointestinal bacteria. *Drugs*  
231 1995;49:467-84.
- 232 [4] Brigidi P, Swennen E, Rizzello F, Bozzolascio M, Matteuzzi D. Effects of rifaximin  
233 administration on the intestinal microbiota in patients with ulcerative colitis. *J Chemother*  
234 2002;14:290-5.
- 235 [5] Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that  
236 lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 1988;202:45-58.
- 237 [6] Telenti A, Imboden P, Marchesi F et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in  
238 *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647-50.
- 239 [7] Vitali B, Turrone S, Dal Piaz F, Candela M, Wasinger V, Brigidi P. Genetic and proteomic  
240 characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07. *Res Microbiol*  
241 2007;158:355-62.
- 242 [8] Thompson JDD, Higgins G, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive  
243 multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and  
244 weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 1994;22:4673-80.
- 245 [9] Gross C, Engbaek F, Flammang T, Burgess R. Rapid micromethod for the purification of  
246 *Escherichia coli* ribonucleic acid polymerase and the preparation of bacterial extracts active in  
247 ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* 1976;128:382-9.
- 248 [10] Suutari M, Linkkonen K, Laakso S. Temperature adaptation in yeast: the role of fatty acids. *J*  
249 *Gen Microbiol* 1990;136:1469-74.

- 250 [11] Schell MA, Karmirantzou M, Snel B et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum*  
251 reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci USA  
252 2002;99:14422-7.
- 253 [12] Dunnick JK, O’Leary WM. Correlation of bacterial lipid composition with antibiotic  
254 resistance. J Bacteriol 1970;101:892-900.
- 255 [13] Dionisi F, Golay PA, Elli M, Fay LB. Stability of cyclopropane and conjugated linoleic acids  
256 during fatty acid quantification in lactic acid bacteria. Lipids 1999;34:1107-15.
- 257 [14] Chang YY, Cronan JE Jr. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid  
258 resistance of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1999;33:249-59.
- 259 [15] Kim BH, Kim S, Kim HG, Lee J, Lee IS, Park YK. The formation of cyclopropane fatty acids  
260 in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. Microbiology 2005;151:209-18.
- 261

262 **Acknowledgments**

263 We gratefully acknowledge Alfa Wassermann, Bologna, Italy, for providing rifaximin, and VSL  
264 Pharmaceuticals, FL, USA, for providing the VSL#3 *Bifidobacterium* strains.

265

266 **Declarations**

267 Funding: None

268 Competing interests: None declared

269 Ethical Approval: Not required

270

271 Table 1

272 *rpoB* gene mutations identified in *Bifidobacterium* rifaximin-resistant mutants

Strain <sup>a</sup> ( <i>rpoB</i> sequence accession n.)	Codon position <sup>c</sup>	Nucleotide change <sup>d</sup>	Amino acid change <sup>e</sup>
<i>B. longum</i> biovar <i>infantis</i> ATCC 15697 <sup>T, b</sup> (wt: <b>AB198724</b> ; res: <b>AB198725</b> )	529	<b>CGT</b> /CAT	<b>Arg</b> /His
	530	CTG/ <b>CTT</b>	Leu/Leu
	532	GCT/ <b>GCA</b>	Ala/Ala
	533	<b>TTG</b> /CTG	Leu/Leu
<i>B. breve</i> ATCC 15700 <sup>T</sup> (wt: <b>AB198726</b> ; res: <b>AB198727</b> )	522	<b>TCC</b> /GCT	<b>Ser</b> /Ala
	546	GAG/ <b>GAA</b>	Glu/Glu
	548	CGC/ <b>CGA</b>	Arg/Arg
<i>B. longum</i> ATCC 15707 <sup>T</sup> (wt: <b>AB198728</b> ; res: <b>AB198729</b> )	529	<b>CGT</b> /CAT	<b>Arg</b> /His
	530	CTC/ <b>CTT</b>	Leu/Leu
	532	GCT/ <b>GCA</b>	Ala/Ala
	541	GAT/ <b>GAC</b>	Asp/Asp
	547	GTC/ <b>GTG</b>	Val/Val
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 <sup>T</sup> (wt: <b>AB198732</b> ; res: <b>AB198733</b> )	508	ACC/ <b>ACT</b>	Thr/Thr
	522	<b>GCT</b> /TCC	<b>Ala</b> /Ser
	523	GGC/ <b>GGT</b>	Gly/Gly
	536	GGT/ <b>GGC</b>	Gly/Gly
	546	GAA/ <b>GAG</b>	Glu/Glu
<i>B. longum</i> biovar <i>infantis</i> BI07 <sup>b</sup> (wt: <b>AB198734</b> ; res: <b>AB198735</b> )	513	CAG/ <b>CGG</b>	<b>Gln</b> /Arg
<i>B. breve</i> BBSF (wt: <b>AB198736</b> ; res: <b>AB198737</b> )	516	<b>GAC</b> /TAC	<b>Asp</b> /Tyr
<i>B. longum</i> BL04 (wt: <b>AB198738</b> ; res: <b>AB198739</b> )	508	ACG/ <b>ACT</b>	Thr/Thr
	511	CTC/ <b>CTG</b>	Leu/Leu
	512	TCG/ <b>TCC</b>	Ser/Ser
	521	<b>TTG</b> /CTG	Leu/Leu
	522	<b>GCG</b> /TCT	<b>Ala</b> /Ser
	524	GTC/ <b>GTG</b>	Val/Val
	525	ACG/ <b>ACC</b>	Thr/Thr
	528	CGC/ <b>CGT</b>	Arg/Arg
	530	CTC/ <b>CTG</b>	Leu/Leu
	532	GCG/ <b>GCT</b>	Ala/Ala
	539	TCG/ <b>TCC</b>	Ser/Ser
546	GAG/ <b>GAA</b>	Glu/Glu	

273

274 <sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, Md.); *B. infantis* BI07, *B. breve* BBSF and *B. longum* BL04 are  
275 included in the probiotic preparation VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, FL, USA).

276 <sup>b</sup> These strains are designated *B. infantis* throughout the paper.

277 <sup>c</sup> Codon numbering system described by Telenti et al. [6].

278 <sup>d</sup> Wild type/resistant nucleotide sequence. The mutated base is indicated in bold type.

279 <sup>e</sup> Wild type/resistant amino acid. The mutated amino acid is indicated in bold type.

280 <sup>T</sup> Type strain.

281

## 282 Table 2

283 Gas chromatographic analysis of membrane fatty acids of *B. infantis* BI07-wt and -res clones in exponential and  
 284 stationary growth phases. The amounts of each fatty acid are expressed as percentage (%). The data are the means of  
 285 three repetitions. The coefficients of variability ranged between 2 and 5%.

Fatty acid <sup>a</sup> (%)	BI07-wt		BI07-res	
	Exponential	Stationary	Exponential	Stationary
C12:0	- <sup>b</sup>	0.09	-	1.25
C14:0	2.22	5.08	0.71	8.84
C15:0	0.11	0.14	-	0.17
C16:0	21.89	33.33	15.13	35.62
C16:1	1.76	0.45	1.42	2.83
C17:0cy	-	-	0.41	0.4
C17:1	-	-	0.38	-
C18:0	1.86	8.58	2.35	5.86
C18:1Δ9	14.09	18.16	19.25	18.45
C18:1Δ11	4.36	16.05	7.89	8.26
C18:2	-	1.93	-	1.06
Lactobacillic acid (C19:0cy)	44.73	8.76	38.64	4.60
Dihydrosterculic acid (C19:1cy)	1.35	-	0.51	3.55
Saturated	26.08	47.22	18.19	51.74
Unsaturated	20.21	36.59	28.94	30.60

286

287 <sup>a</sup> The fatty acyl residues are: dodecanoic acid (C12:0), tetradecanoic acid (C14:0), pentadecanoic acid (C15:0),  
 288 hexadecanoic acid (C16:0), cis-9-hexadecenoic acid (C16:1), cis 9,10 methylenehexadecanoic acid (C17:0cy), cis-10-  
 289 heptadecenoic acid (C17 :1), octadecanoic acid (C18:0), cis-9-octadecenoic acid (C18:1Δ9), cis-11-octadecenoic acid  
 290 (C18:1Δ11), cis-9, cis-12-octadecenoic acid (C18:2), cis-11,12-methyleneoctadecanoic acid (lactobacillic acid), cis-  
 291 9,10-methyleneoctadecanoic acid (dihydrosterculic acid).

292 <sup>b</sup> not detected

293

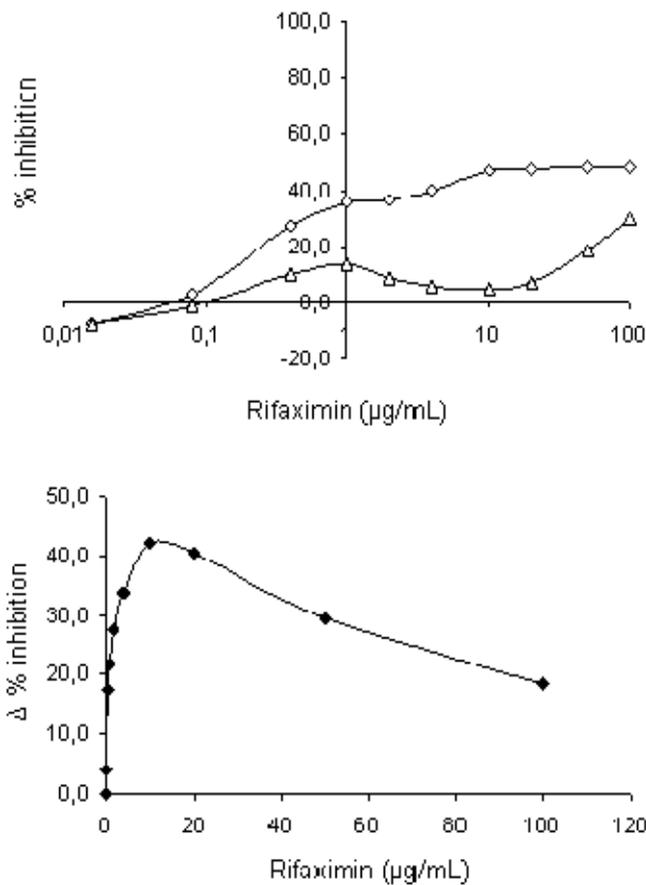
294

295 **Figure legends**

296

297 Fig. 1. Inhibitory effects of rifaximin on in vitro transcription by *B. infantis* BI07 enzymatic extracts  
298 (10  $\mu$ L). A, inhibition percentage (%) of RNA polymerase of *B. infantis* BI07-wt ( $\diamond$ ) and -res ( $\Delta$ )  
299 due to different concentration of rifaximin ( $\mu$ g/mL); B, differential inhibition between RNA  
300 polymerase of *B. infantis* BI07-wt and RNA polymerase of *B. infantis* BI07-res in relation to  
301 rifaximin concentration ( $\mu$ g/mL).

302



303