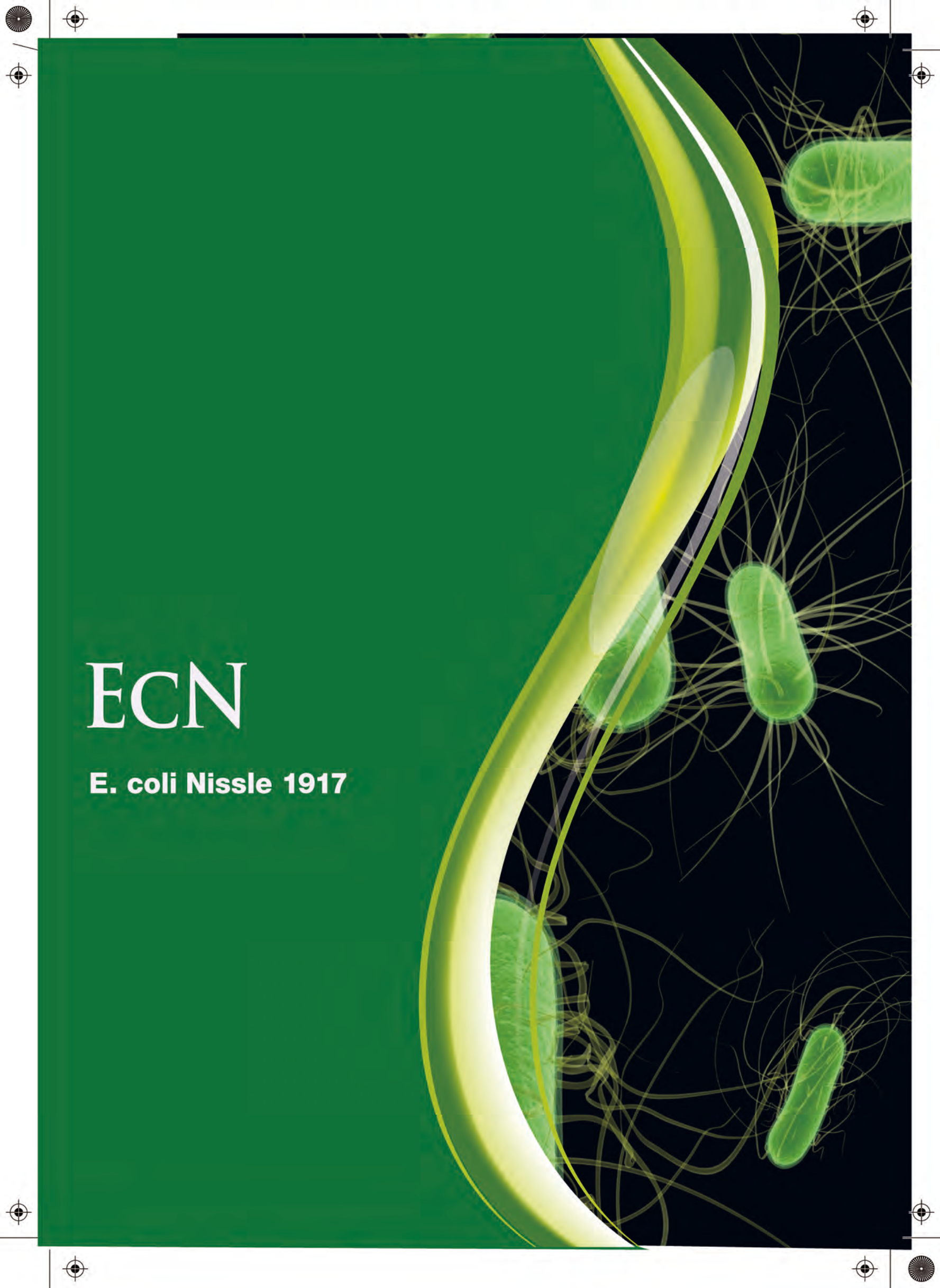


The image features a large, abstract graphic on the right side, composed of several overlapping, curved, translucent shapes in shades of green and yellow. These shapes are set against a black background that is populated with numerous thin, light green, hair-like lines representing bacterial flagella. Several larger, green, rod-shaped bacteria, characteristic of E. coli, are scattered across the black background. The overall composition is dynamic and modern, with a strong emphasis on organic and biological forms.

ECN

E. coli Nissle 1917

EcN®

Escherichia coli Nissle 1917

La specialità medicinale probiotica!

Un batterio si trasforma in farmaco!

La scoperta di EcN®

Il principio attivo di EcN® deve il suo nome al professore di Friburgo Alfred Nissle († 1965).

Durante la prima guerra mondiale, mentre stava conducendo una ricerca su ceppi di batteri E. coli con attività antagonista (inibizione della crescita) contro i patogeni intestinali Nissle isolò uno speciale ceppo di E. coli dalle feci di un soldato che, durante la campagna militare nei Balcani, contrariamente alla maggior parte dei suoi compagni, non aveva sofferto di problemi intestinali e non aveva contratto né il tifo, né il paratifo né altre enteriti.

Per tale ragione, ancora oggi, in onore del professor Alfred Nissle, il ceppo porta la denominazione "Escherichia coli Nissle 1917", abbreviato EcN®.

Usando questo ceppo di E. coli il Prof. Nissle ha sviluppato il farmaco probiotico Mutaflor® che da allora è stato ampiamente e continuamente utilizzato nella pratica clinica. Dal 1917, Mutaflor® è disponibile nel mercato farmaceutico tedesco senza interruzioni e da qualche anno **CADIGROUP** lo distribuisce anche in Italia con il nome **EcN®**.

Oggi, i batteri vengono coltivati in fermentatore e, una volta liofilizzati, sono conservabili per più mesi a temperature comprese tra 2 °C ed 8 °C.

BATTERIOTERAPIA - l'ampia gamma di applicazioni di E. coli Nissle 1917

E. coli Nissle 1917 è attualmente registrato come **FARMACO** in molti Paesi europei ed extraeuropei e viene utilizzato come **specialità medicinale probiotica** nel trattamento e nella profilassi di diverse malattie. Come farmaco, dunque, deve rispondere a requisiti di sicurezza, efficacia e GMP (Good Manufacturing Practice) molto più severi rispetto a quelli previsti per gli integratori probiotici.

Indicazioni attuali, studi clinici e case report dimostrano e supportano l'ampia gamma di applicazioni di EcN® che va dalle malattie croniche intestinali alla colonizzazione e profilassi dei neonati prematuri e a termine, fino al trattamento di patologie extraintestinali.

I limiti della terapia antibiotica, che stanno diventando sempre più evidenti con lo sviluppo di ceppi patogeni multi-resistenti, e le sempre maggiori conoscenze sulla rilevanza medica del microbiota intestinale, accrescono sempre più l'interesse per le caratteristiche e le potenzialità di EcN®, contenente E. coli Nissle 1917 come principio attivo.

In questa monografia, vi presentiamo una panoramica completa sulle proprietà uniche del ceppo di E. coli Nissle 1917, nonché sulle sue più rilevanti evidenze cliniche, precliniche e *in-vitro*.

Immagine al Microscopio Elettronico di E. coli Nissle 1917. Ingrandimento: 1: 10,000



Indice dei contenuti

I	L'importanza fisiologica di E. coli	4
	Le funzioni della flora intestinale	4
	Il ruolo fisiopatologico dei batteri intestinali	4
	Lo sviluppo naturale del microbiota intestinale	5
	E. coli è il tipico colonizzatore iniziale dell'intestino umano	5
	I colibatteri autoctoni dell'intestino	5
II	Proprietà ceppo-specifiche di E. coli Nissle 1917	6
	E. coli Nissle 1917 forma acidi grassi	7
III	Meccanismi d'Azione di E. coli Nissle 1917	9
	E. coli Nissle 1917 protegge contro le infezioni	9
	Competizione nella formazione di Biofilm	12
	E. coli Nissle 1917 rafforza la barriera intestinale	13
	Strategie di comunicazione di EcN® e attività immunomodulante e anti-infiammatoria	17
IV	Efficacia clinica di EcN®	20
	Colite ulcerosa	20
	Malattia di Crohn	24
	Malattia Diverticolare Sintomatica non Complicata (SUDD)	24
	Sindrome dell'Intestino irritabile (IBS)	25
	Infezioni Ricorrenti delle Vie Urinarie	26
	Il microbiota intestinale sano previene le malattie atopiche	28
	EcN® in altre malattie	28
V	Applicazioni e Modo d'uso	29
	Il ceppo E. coli Nissle 1917 è sensibile agli antibiotici	29
	Raccomandazioni posologiche	30
	Precauzioni per la conservazione	30
	Forma farmaceutica di EcN®	30
VI	Sicurezza del trattamento con EcN®	31
	Il ceppo E. coli Nissle 1917 non è patogeno	31
	Il ceppo E. coli Nissle 1917 non possiede plasmidi di resistenza agli antibiotici	32
	Stabilità genetica e proprietà anti-cancro	32
VII	Bibliografia	33

Informazioni aggiornate al Gennaio 2022

L'importanza fisiologica di E. coli

Le funzioni della flora intestinale

Ospitando una popolazione di circa 10^{14} batteri, la microflora intestinale rappresenta un ecosistema complesso e differenziato dotato di alta attività metabolica.

Dieci volte più numerosi delle circa 10^{13} cellule che costituiscono il corpo umano, i microrganismi della flora intestinale possono essere paragonati, per quanto riguarda il peso e la capacità metabolica, ad un vero e proprio organo come il fegato. La microflora intestinale aiuta l'organismo umano svolgendo un'importante funzione metabolica, trofica e protettiva⁽¹⁾. Essa controlla la proliferazione e la differenziazione dell'epitelio intestinale e stimola lo sviluppo e l'omeostasi del sistema immunitario (animali da laboratorio allevati in assenza di batteri non hanno, ad esempio, un sistema immunitario funzionante). I batteri autoctoni del tratto intestinale svolgono un ruolo essenziale nel mantenimento della tolleranza immunologica.

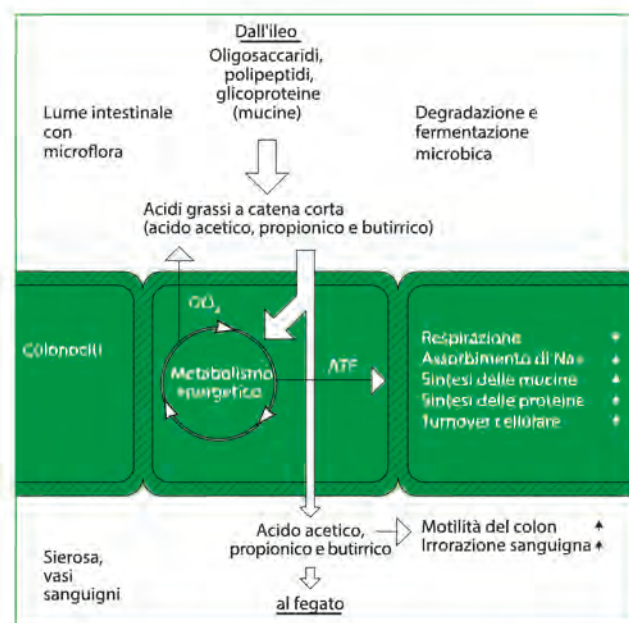


FIG. 1: Ruolo svolto sul metabolismo energetico dell'epitelio colico dagli acidi grassi a catena corta generati per intervento dei batteri.

La flora intestinale, inoltre, svolge un ruolo fondamentale nel proteggere l'organismo dall'attacco di eventuali microrganismi nocivi.

Gli acidi grassi a corta catena, sintetizzati dai batteri del "gut microbiota" (principalmente acido acetico, propionico e butirrico) servono da nutrimento per le cellule epiteliali del colon e svolgono anche una importante funzione antinfiammatoria. (FIG. 1)

Il ruolo fisiopatologico dei batteri intestinali

L'importanza della flora intestinale autoctona si evidenzia soprattutto in presenza di alterazioni della sua omeostasi micro-ecologica (disbiosi). Oltre ai patogeni primariamente responsabili delle infezioni gastrointestinali, anche alcuni batteri "fisiologici" intestinali possono rivestire un importante ruolo patogenetico come ad esempio:

- nell'insorgenza e nel mantenimento di malattie infiammatorie croniche dell'intestino nonché di manifestazioni extraintestinali ad esse correlate;
- nello sviluppo di una sindrome del colon irritabile post-infettiva;
- nello sviluppo della sindrome metabolica;
- nella comparsa della colite pseudomembranosa secondaria ad antibiotici;
- nella sindrome dell'overgrowth batterico nel piccolo intestino (SIBO);
- nella disregolazione della funzione di barriera dell'intestino ("leaky-gut").

Abbiamo inoltre sempre maggiori evidenze del collegamento tra la flora intestinale e la genesi di malattie extraintestinali quali, ad esempio, le infezioni ricorrenti delle vie urinarie, l'artrite, le allergie e le intolleranze alimentari ed il carcinoma colico⁽²⁾.

Lo sviluppo naturale del microbiota intestinale

Secondo le attuali conoscenze, sembra che l'intestino sia per lo più sterile fino al momento della nascita. L'iniziale colonizzazione batterica del tratto gastrointestinale dei neonati inizia subito dopo la nascita, nelle prime ore di vita, e condiziona la successiva composizione della flora intestinale.

La colonizzazione intestinale primaria procede in modo casuale, influenzata dalla modalità del parto (naturale o cesareo), dalla tipologia di alimentazione (allattamento al seno o formula artificiale), dal tipo di ambiente e da molteplici altri fattori esterni. Recentissime analisi di biologia molecolare hanno però avviato una discussione sul fatto che la colonizzazione microbica possa già verificarsi durante l'embriogenesi⁽³⁾.

E. coli è il tipico colonizzatore iniziale dell'intestino umano (4) (5) (6)

Escherichia coli è un batterio clinicamente importante appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae.

E. coli è uno dei primi e più importanti batteri che si insediano nell'intestino del neonato.

Il contenuto di ossigeno del colon, ancora elevato subito dopo la nascita, inizia a diminuire proprio grazie alla colonizzazione da parte di E. coli. Il consumo di ossigeno è causato dalle attività metaboliche di E. coli

che portano a condizioni anaerobiche nell'intestino crasso. Solo allora inizia l'ulteriore colonizzazione del tratto intestinale da parte di batteri strettamente anaerobici (es. Bacteroides, Bifidobatteri).

I colibatteri autoctoni dell'intestino

I colibatteri autoctoni si insediano preferenzialmente sulla mucosa dell'intestino crasso, dove formano una vera e propria barriera microbica contro i bacilli esterni contribuendo, grazie alla loro spiccata immunogenicità, ad «allenare» il sistema immunitario intestinale (FIG.2). Come abbiamo visto, E. coli sono tra i primi colonizzatori intestinali e, nell'arco della vita, giocano un ruolo pivotale nell'equilibrio tra benessere e malattia. Nella maggior parte dei casi, infatti, si tratta di batteri non patogeni che vivono, come commensali, nell'intestino. Accanto a questi ceppi, ve ne sono però altri patogeni che sono causa della maggior parte delle infezioni sia intestinali che extraintestinali (ad es E. coli uropatogeno causa l'80% delle infezioni vie urinarie) e sistemiche. Questo deriva dal fatto che E. coli è una famiglia di batteri batteriologicamente molto forte, che riesce a predominare sulla maggior parte delle altre specie. Proprio per tale ragione del "E. coli" si sente parlare spesso, sempre in negativo, mentre in realtà i coli autoctoni sono fondamentali per l'omeostasi e la salute del colon.

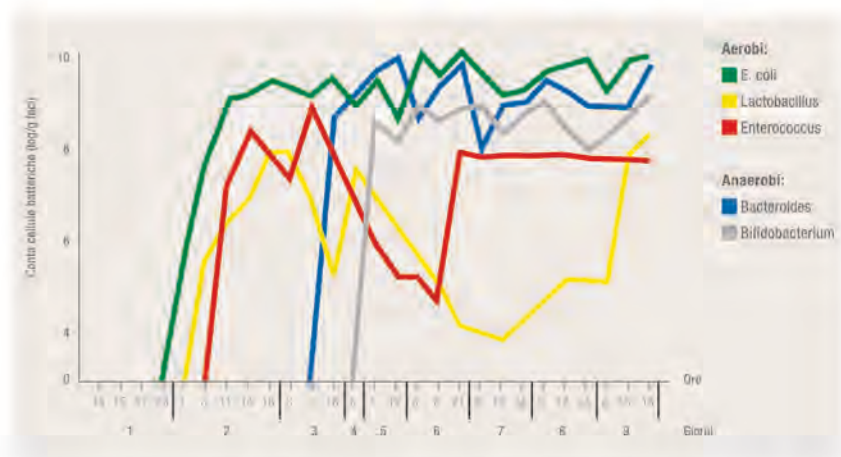


FIG.2: Colonizzazione progressiva tipica dell'intestino neonatale da parte di specie batteriche aerobie ed anaerobie.

Proprietà ceppo-specifiche di E. coli Nissle 1917

Escherichia coli Nissle 1917 (EcN®) è un ceppo di E. coli che, oltre a non essere patogeno, ha dimostrato spiccate proprietà benefiche per l'organismo e, ad oggi, è **l'unico probiotico di E. coli in commercio in Italia**.

Il ceppo di E. coli Nissle 1917 contenuto in EcN® possiede una serie di proprietà importanti per la sua sopravvivenza, per la sua capacità di colonizzazione e persistenza nell'ecosistema intestinale, nonché per la sua efficacia terapeutica^{(7) (8) (9)}. Queste proprietà sono elencate nella Tabella 1 a pag. 8.

E. coli Nissle 1917 possiede tre diversi tipi di **fimbrie** (fimbrie Curli, di tipo F1A ed F1C) che gli permettono l'ancoraggio di EcN® allo strato di mucina della mucosa intestinale umana, facilitando la colonizzazione intestinale⁽¹⁰⁾. Dotato di **flagelli di tipo H1**, il ceppo può muoversi attivamente all'interno dello strato viscoso di muco, ad es. in direzione della mucosa. I flagelli sono anche importanti per il cross-talk del batterio con l'epitelio colico (vedi avanti)⁽¹¹⁾.

Studi disegnati per chiarire i meccanismi molecolari dell'azione di EcN® sulla mucosa intestinale, hanno rivelato che esso è in grado di indurre nei colonociti la sintesi del peptide antimicrobico beta-defensina-2 (HBD-2), e che questa attività HBD-2-stimolante dipende proprio dalla presenza del flagello H1 del batterio⁽¹²⁾. Ulteriori esperimenti con ceppi mutanti hanno rivelato infatti che solo i batteri EcN® in grado di sintetizzare un flagello intatto erano in grado di stimolare la produzione di HBD-2 nelle cellule dell'epitelio del colon. La proteina strutturale flagellina che costituisce

il filamento del flagello è stata identificata come l'induttore della sintesi di HBD-2 nelle cellule dell'epitelio del colon (FIG.4).

Il ceppo EcN® esprime due **microcine** ad attività antibatterica⁽¹³⁾ contro le quali lo stesso ceppo produttore è immune^{(14) (15) (16) (17) (18) (19)}.

Tra i **fattori di "fitness biologico"** che gli consentono di sopravvivere ed insediarsi temporaneamente nel colon, vanno menzionati, tra gli altri, diversi meccanismi di assorbimento del ferro⁽²⁰⁾ (ad es. la secrezione di siderofori quali l'aerobactina, la colibactina, l'entrobactina e la yersiniabactina, la fissazione e l'assorbimento dell'emina nonché un sistema dipendente dal citrato).

Il **genoma** di E. coli Nissle 1917 è stato in gran parte sequenziato e codificato e sono stati identificati tutti i loci genetici relativi alle strutture di importanza funzionale attualmente note⁽²¹⁾.

EcN® è un tipico enterobatterio Gram-negativo contenente un lipopolisaccaride (**LPS**) come componente strutturale della sua membrana cellulare esterna. La struttura molecolare dell' LPS di EcN®, però, differisce significativamente da quella di altri ceppi E. coli. In particolare la catena polisaccaridica laterale (O6) è molto corta poiché presenta una singola "repeating unit". Questa struttura insolita e finora inedita dell'LPS sembra spiegare il fenomeno per cui il ceppo mostra proprietà immunomodulanti senza mostrare effetti immunotossici^{(22) (23)}.

I due **plasmidi**, completamente codificati e non trasmissibili, non contengono geni di antibioticoresistenza.

E. coli Nissle 1917 forma acidi grassi

Dal punto di vista metabolico, EcN® è in grado di produrre acidi grassi a catena corta (SCFA) (acido formico, acetico, propionico e butirrico) come prodotti finali del metabolismo dei carboidrati solubili, sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. L'acido acetico, predominante tra questi, stimola la muscolatura anulare del colon e favorisce la circolazione sanguigna della mucosa. L'acido acetico ha quindi un effetto stimolante sulla motilità intestinale⁽²⁴⁾.

Inoltre i prodotti della fermentazione batterica, in particolare l'acido butirrico, sono molto ricchi di energia e indispensabili al metabolismo nell'epitelio del colon⁽⁶³⁾.

Recentissime evidenze dimostrano inoltre che EcN®, rispetto a E. coli patogeni, asintomatici e commensali,

produce alte concentrazioni di C18-3OH, un acido grasso libero a catena lunga idrossilato sul terzo carbonio (LCFA-3OH). Questo metabolita, che viene assorbito dagli enterociti e interagisce con PPAR-γ, sembra essere un potenziale componente dell'**effetto antinfiammatorio** del probiotico poiché, somministrato per os, è in grado di ridurre i parametri infiammatori della colite indotta da DSS nei topi⁽²⁵⁾. EcN® colonizza l'intestino in pochi giorni e rimane come flora del colon per mesi dopo somministrazione⁽²⁶⁾.

È l'insieme delle sue particolarità biologiche che conferisce a E. coli Nissle 1917 la sua efficacia specifica.

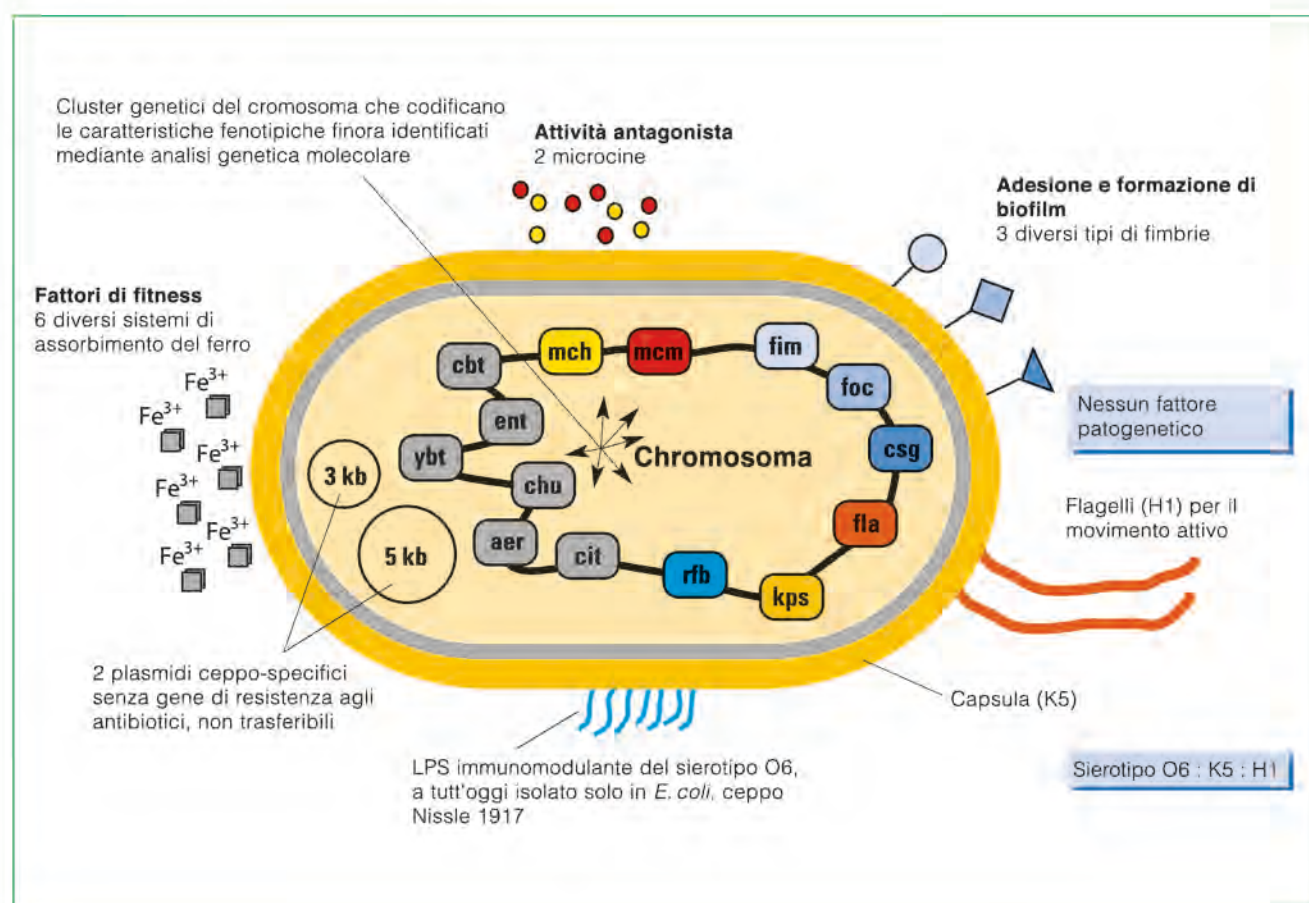


FIG.3: Caratteristiche fenotipiche di E. coli Nissle 1917.

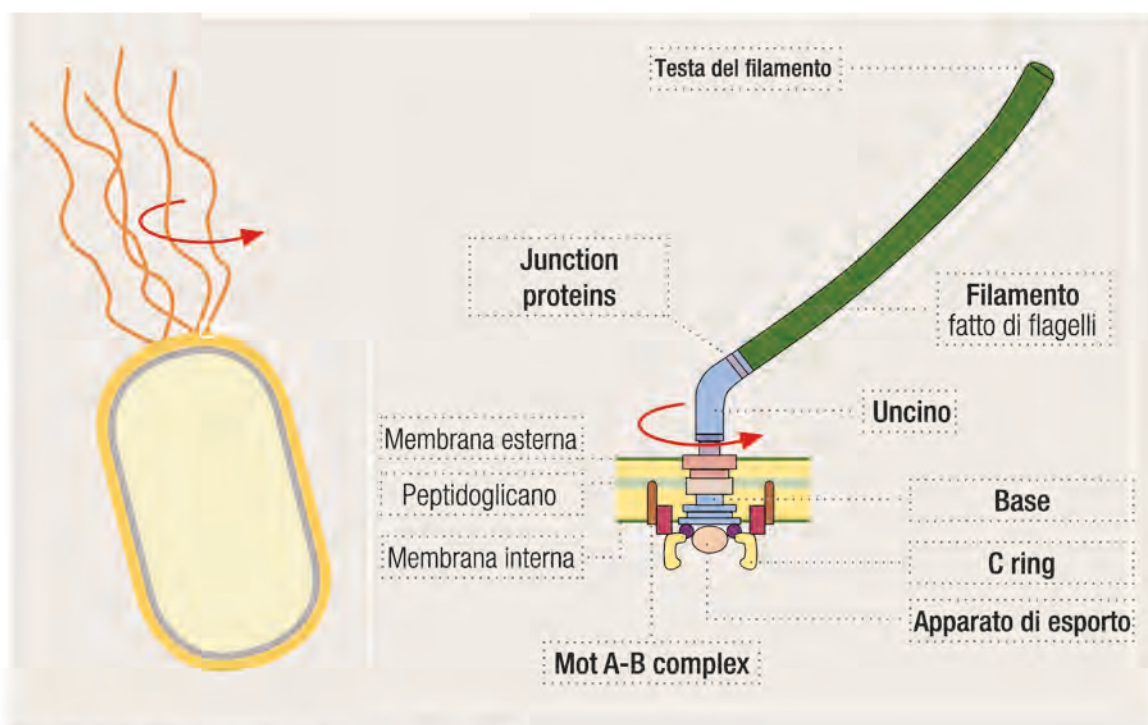


FIG.4: Struttura dell'apparato flagellare di *E. coli* Nissle 1917.

Caratteristiche ceppo-specifiche di *E. coli* Nissle 1917

- Mobilità dovuta al flagello di tipo H1
- Capacità di colonizzare grazie alla specifica interazione dei suoi flagelli con lo strato di mucina
- Capacità di formare biofilm legata ai 3 diversi tipi di fimbrie (F1A, F1C e Curli)
- Attività antagonista diretta contro i microbi estranei grazie al rilascio di microcine antimicrobiche
- Vitalità e resilienza ("fitness biologica") legata ai 7 diversi sistemi di uptake del Ferro
- Effetti immunomodulatori dovuti alle strutture superficiali specifiche del ceppo (speciale LPS = lipopolisaccaride) e sintesi di sostanze segnale immunomodulanti
- Effetti anti-infiammatori
- Effetto stabilizzante sulla funzione barriera della mucosa intestinale

Tabella 1

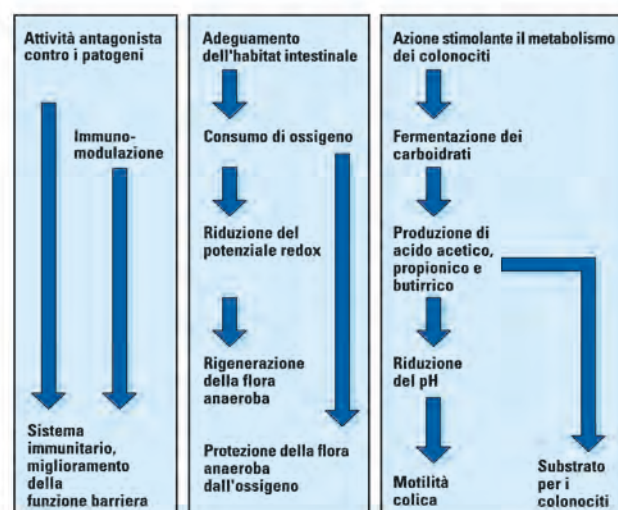


Tabella 2

Meccanismi d'Azione di E. coli Nissle 1917

E. coli Nissle 1917 protegge contro le infezioni

EcN[®] è stato scoperto da Nissle nel 1917 proprio grazie alla sua azione antagonista (inibizione della crescita) contro microorganismi enteropatogeni.

E. coli Nissle 1917 contrasta efficacemente la proliferazione di batteri patogeni enterici proteggendo l'intestino sia direttamente dalle infezioni (ad es. da EHEC) ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾ ⁽²⁷⁾, sia dai potenziali effetti avversi di una precedente infezione intestinale (sindrome dell'intestino irritabile post-infettiva).

L'azione antagonista di EcN[®] è dovuta, almeno in parte, alla produzione e rilascio delle microcine e alla stimolazione del rilascio di defensine. Le defensine sono peptidi antimicrobici propri dell'organismo che vengono prodotti, ad esempio, dall'epitelio intestinale. Fanno parte del sistema immunitario innato non specifico e proteggono il corpo da un gran numero di microorganismi patogeni. EcN[®] stimola la produzione di β -defensina-2 (HBD-2) nelle cellule dell'epitelio intestinale e quindi rafforza la capacità di difesa dell'organismo ⁽²⁸⁾ ⁽²⁹⁾.

L'attività antibatterica si esplica anche attraverso meccanismi diversi come lo spiazzamento competitivo e la

competizione per i nutrienti. Essendo un probiotico appartenente alla famiglia di E. coli, EcN[®] è batteriologicamente molto forte e ha dimostrato di riuscire a prevalere su diversi batteri patogeni, sia della stessa specie, che di specie diverse.

L'attività antagonista di EcN[®] verso microorganismi patogeni è stata testata sia *in vivo* che *in vitro*.

In vitro, gli effetti antagonisti di EcN[®] sono stati determinati mediante co-coltivazione con diversi enteropatogeni, uropatogeni e altri ceppi di E. coli, nonché con singoli ceppi della specie *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* e *Candida albicans* (FIG.6 -7) ⁽³⁰⁾ ⁽³¹⁾ ⁽³²⁾.

La co-coltivazione di EcN[®] con E. coli produttori di Shiga-tossine (STEC) ha determinato un abbattimento della carica batterica di STEC (fino a 72%) associata ad una diminuzione dose-dipendente di produzione e rilascio di Shiga-tossina ⁽³³⁾. I risultati di questi test sono molto interessanti in quanto forniscono una potenziale possibile alternativa di intervento in questo tipo di infezioni, dove l'uso di antibiotici può inizialmente indurre un aumento importante nella liberazione di Shiga-tossina con relativo peggioramento dei sintomi.

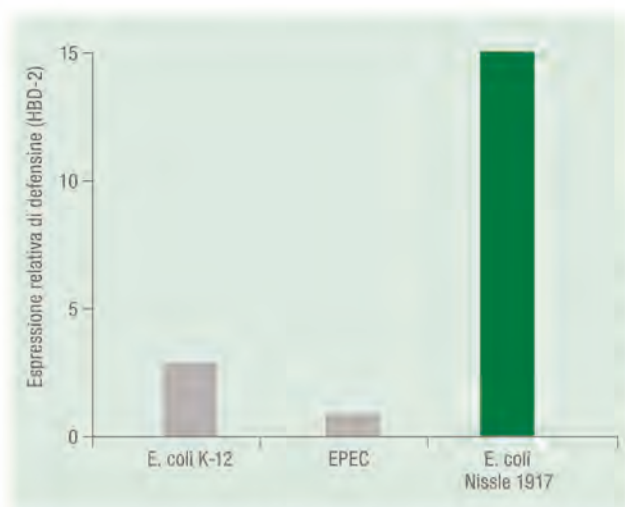


FIG.5: In co-culture di cellule CaCo2 e ceppi diversi di E.coli, il ceppo di E.coli Nissle 1917 induce l'espressione di HBD-2 in modo significativamente più efficace (Wehkamp J. et al., 2004) ⁽²⁹⁾.

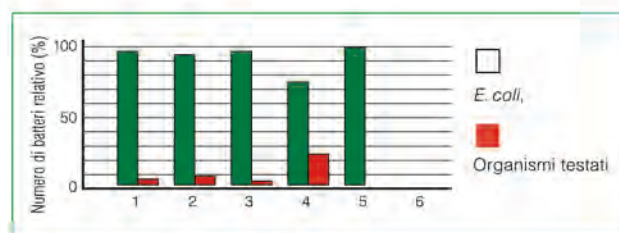


FIG.6: Antagonismo di E. coli, ceppo Nissle 1917, co-cultura con:

- 1 *Salmonella enteritidis*
- 2 *Shigella dysenteriae*
- 3 *E. coli* O112 ab (EPEC)
- 4 *E. coli* O6 : K15 : H31 (UPEC)
- 5 *Proteus vulgaris*
- 6 *Candida albicans*

L'attività antibatterica di EcN® è stata anche confermata *in vivo* mediante co-somministrazione di EcN® con altri microorganismi patogeni (*E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida Albicans*, *Liysteria monocytogenes*) in animali germ-free (ratti, topi, suinetti).

In questi modelli, la somministrazione per os di EcN, successiva ad una pregressa inoculazione con il batterio patogeno, ha portato una diminuzione o addirittura l'eradicazione completa dei ceppi patogeni dall'intestino e i sintomi di malattia che si verificavano a causa dell'inoculazione con il patogeno sono scomparsi (ATTIVITA' BATTERICIDA) (FIG.8)⁽³⁴⁾.



FIG.7: Azione inibitrice di *E. coli*, ceppo Nissle 1917, sugli *E. coli* enteroinvasivi O143 : H su substrato zuccherino minimo

Ulteriori esperimenti, hanno confrontato la mono-colonizzazione di maialini gnotobiotici con lattobacilli commensali, *L. amylovorus* e *L. mucosae*, e con il probiotico *E. coli* Nissle 1917 e la loro interferenza con *S. Typhimurium*. Nessuno dei due ceppi di *Lactobacillus* ha soppresso la reazione infiammatoria causata dall'infezione da *S. Typhimurium*, mentre il probiotico *E. coli* Nissle 1917 ha soppresso o ridotto sia i segni clinici che la risposta infiammatoria⁽³⁵⁾. Nei topi CD-1 trattati con streptomicina, la precolonizzazione dell'intestino con EcN® ha limitato la crescita di *E. coli* O157:H7 un ceppo di *E. coli* emorragico (EHEC) molto aggressivo (ATTIVITA' BATTERIOSTATICA) (FIG.9)⁽³⁶⁾.

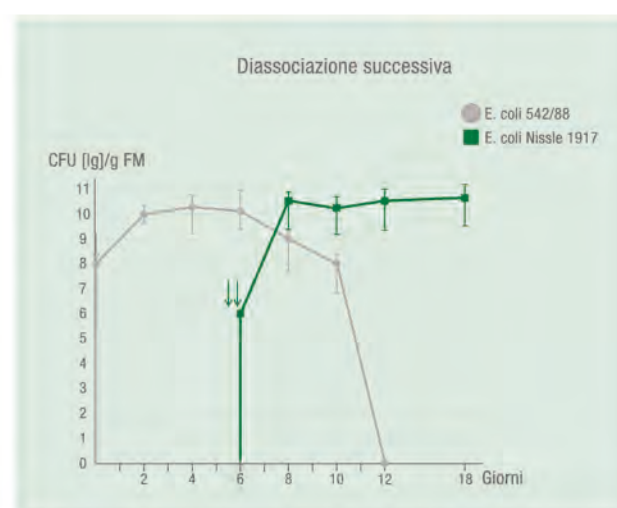


FIG.8: Azione antagonista di *E. coli* Nissle 1917 (EcN®) contro *E. coli* 542/88 enteropatogeno *in vivo* in suinetti gnotobiotici. Quattro suinetti germ-free sono stati infettati per via orale con 10^8 CFU di *E. coli* 542/88.

Il ceppo enteropatogeno di *E. coli* ha colonizzato rapidamente l'intestino (linea grigia) e ha raggiunto una conta batterica stabile (contenuto di circa 10^{10} CFU/g).

Poco dopo l'infezione gli animali hanno mostrato segni di malattia diarroica.

Al giorno 6 dell'esperimento, quando i suinetti erano visibilmente malati, hanno ricevuto una sospensione di EcN® (2×10^8 CFU) (doppia freccia).

Sebbene il ceppo patogeno di *E. coli* si fosse già insediato nell'intestino, anche EcN® ha colonizzato bene l'intestino (curva verde diritta).

Sei giorni dopo, l'agente patogeno è stato completamente espulso dall'intestino, mentre EcN® ha mostrato continuamente un'alta carica e i suinetti si sono ripresi⁽³⁴⁾.

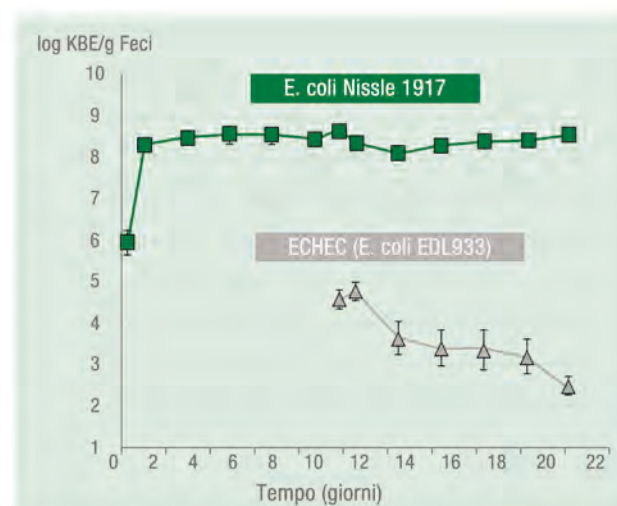


FIG.9: EcN® protegge dalla colonizzazione di EHEC patogeni. Topolini germ-free sono stati nutriti con EcN® (10^5 CFU) per 10 giorni e successivamente con *E. coli* EDL 993 (10^5 CFU), un *E. coli* enteroemorragico. La pre-colonizzazione intestinale con *E. coli* Nissle 1917 impedisce la crescita e la proliferazione di EHEC e ne abbassa la carica batterica⁽³⁶⁾.

La somministrazione orale di EcN® ha dimostrato di proteggere anche dalle infezioni sistemiche da parte di *Candida albicans* e *Listeria monocytogenes*.

Negli animali infetti da *Candida albicans* si è osservata una drastica riduzione della contaminazione microbica del principale organo bersaglio, i. e. il rene. Un effetto comparabile è stato osservato nel fegato e nella milza di animali infettati da *L. monocytogenes*⁽³⁷⁾.

Gli effetti inibitori di EcN® sui patogeni facoltativi e obbligati sono stati dimostrati anche nell'uomo mediante somministrazione orale preventiva del ceppo ai neonati (profilassi della colonizzazione)⁽³⁸⁾. Le feci dei neonati sono state analizzate microbiologicamente per confermare la colonizzazione con EcN®. Inoltre, è stato determinato l'effetto della colonizzazione con questo ceppo di *E. coli* sullo spettro di altri batteri intestinali aerobici. Tutti i neonati che hanno ricevuto EcN® sono stati colonizzati dal ceppo somministrato, la maggior parte dei quali ha mostrato una colonizzazione a lungo termine per diversi mesi. L'insediamento di microrganismi indesiderati, cioè agenti patogeni facoltativi e

obbligati, nell'intestino dei bambini è stato significativamente ridotto dalla colonizzazione intenzionale con EcN® (FIG.10).

In pazienti con colite ulcerosa in remissione, sono state ottenute biopsie della mucosa durante sigmoidoscopie, sia prima che dopo un trattamento orale di 6 settimane con EcN®. I campioni sono stati analizzati per il loro contenuto di batteri intestinali aerobi e anaerobi associati alla mucosa utilizzando metodi di coltura microbiologica classici e PCR quantitativa.

Il trattamento con EcN® ha determinato una diminuzione significativa della conta batterica di batteri aerobi e anaerobi associati alla mucosa nella maggior parte dei pazienti⁽³⁹⁾.

In un altro test pilota che ha utilizzato metodiche di sequenziamento 16S rRNA, il trattamento per 30 giorni con EcN® ha portato ad un miglioramento della composizione qualitativa del microbiota intestinale dei pazienti affetti da UC.

Questi effetti sono stati più marcati alla fine del trattamento, con una variabilità stabile tra i generi dopo 1 mese di trattamento⁽⁴⁰⁾.

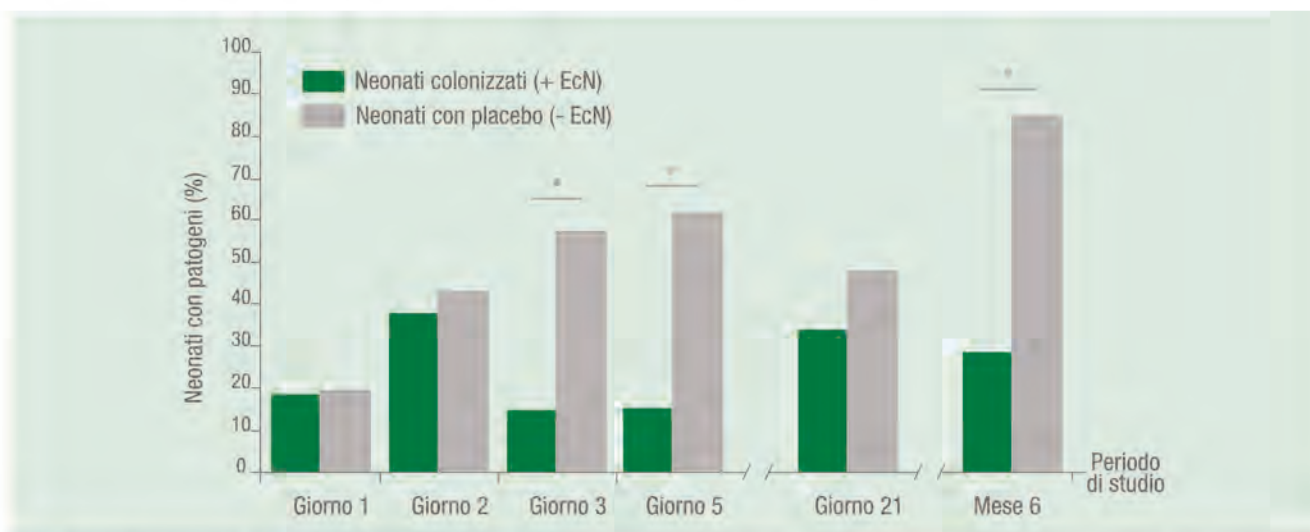


FIG.10: Attività antagonista di *E. coli* Nissle 1917 (EcN®) nell'uomo, come dimostrato dall'effetto della somministrazione preventiva di EcN® sulla colonizzazione dell'intestino del neonato con patogeni microbici veri e potenziali. Utilizzando un disegno di studio in doppio cieco, 54 neonati a termine sono stati assegnati in modo casuale a due gruppi di trattamento e hanno ricevuto per via orale 1 ml di una sospensione EcN® (10^8 CFU, barre verdi) o 1 ml di una sospensione placebo (barre grigie) una volta al giorno per i primi 5 giorni di vita. Durante la degenza ospedaliera (nei giorni 1, 2, 3 e 5) e successivamente (nel giorno 21 e durante il 6° mese), è stata determinata la colonizzazione dell'intestino con patogeni microbici in campioni fecali e viene presentata come percentuale di bambini portatori di microrganismi patogeni e potenzialmente patogeni. Per quanto riguarda la colonizzazione con patogeni, le differenze tra il gruppo EcN® e il gruppo placebo sono state significative il giorno 3 (15% vs 57%, $p < 0,003$), il giorno 5 (15% vs 62%, $p < 0,001$) e dopo 6 mesi (28% vs 85%, $p < 0,002$)⁽³⁸⁾.

Competizione nella formazione di Biofilm

Molta attenzione è stata data ultimamente al ruolo svolto dai biofilm nella colonizzazione batterica, ma fino a poco tempo fa erano poche le informazioni al riguardo.

In effetti, è stato dimostrato che i biofilm si formano negli strati di muco del grande intestino e sono spesso costituiti da un mix di specie batteriche che interagiscono tra loro. La formazione di biofilm è il risultato di interazioni dinamiche intra o interspecie.

Sembra che i biofilm della mucosa del colon e le comunità batteriche nelle feci differiscano notevolmente e che la disbiosi nella struttura comunitaria dei biofilm possa giocare un ruolo importante nel contribuire alle malattie infiammatorie croniche intestinale come Colite Ulcerosa e Malattia di Crohn⁽⁴¹⁾.

Anche molte infezioni croniche, sia intestinali che extraintestinali, come ad esempio le infezioni ricorrenti delle vie urinarie, coinvolgono i biofilm batterici. All'interno di queste strutture mucopolisaccaridiche i batteri patogeni si nascondono in forma quiescente, diventando insensibili ai disinfettanti e alla tradizionale

terapia antibiotica, e in tempi successivi possono uscire dalla loro roccaforte per dar luogo ad una nuova infezione.

Riuscire a demolire i biofilm patogeni esponendo i batteri all'azione dell'antibiotico e soprattutto evitare che si riformino promuovendo la formazione di biofilm di ceppi salutari che occupino lo spazio a disposizione diventa quindi un passo essenziale nel contrastare la recidivazione delle infezioni.

E. coli Nissle 1917 presenta una spiccata capacità di formare biofilm rispettosi dell'integrità della mucosa del colon. Protegge così efficacemente lo strato mucoso dei colonociti, migliora ulteriormente l'integrità delle tight junction e destruttura i biofilm formati dai germi patogeni, esponendoli alle difese immunitarie e agli antibiotici⁽⁴²⁾.

Inoltre uno studio in vitro pubblicato su Nature Scientific Reports, ha evidenziato che EcN® è un "formatore di biofilm" migliore rispetto ad altre specie patogene e, in particolare, è capace di inibire in maniera altamente significativa la formazione di biofilm da parte di EHEC, di *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Questa attività sembra essere correlata al rilascio di una proteina periplasmatica della DegP (FIG.11)⁽⁴³⁾.

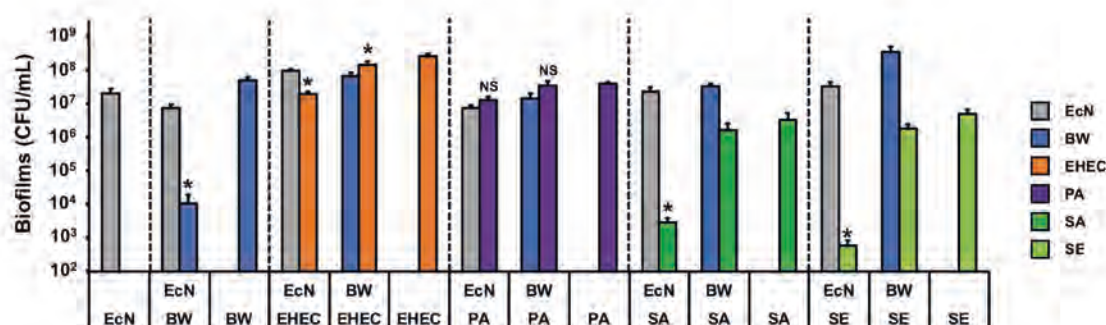


FIG.11: Biofilm a singola e doppia specie sono stati formati in provette di coltura in polipropilene in M9G per 24 ore a 37 ° C senza agitazione e le cellule di biofilm vitali sono state quantificate mediante unità formanti colonie (CFU). Il probiotico *E. coli* Nissle 1917 (EcN®), *E. coli* BW25113 (BW) commensale, *E. coli* enteroemorragico EDL933 (EHEC), *P. aeruginosa* PA01 (PA), *S. aureus* JE2 (SA) e *S. epidermidis* RP62A (SE) sono stati testati per determinare l'effetto di EcN® sulla formazione di biofilm degli altri batteri^{(43) (44)}.

E. coli Nissle 1917 rafforza la barriera intestinale

Le giunzioni strette (tight junctions) e alcuni desmosomi (giunzioni di aderenza) garantiscono la stretta coesione delle cellule epiteliali intestinali tra loro. Questo fenomeno impedisce il passaggio incontrollato di sostanze dall'intestino all'organismo (sindrome dell'intestino permeabile).

Si ritiene che un'aumentata permeabilità della mucosa intestinale ("leaky gut") ad antigeni macromolecolari e persino ad interi microrganismi nel tratto gastrointestinale sia di importanza fisiopatologica in vari tipi di malattie.

Le IBD sono un esempio in cui l'incremento della permeabilità intestinale gioca un ruolo centrale nella patogenesi della malattia. In questo caso, l'alterata permeabilità intestinale precede lo sviluppo della patologia, mentre la produzione di citochine, tra cui IFN- γ e TNF- α , secondaria al processo infiammatorio, servirebbe a perpetuare l'incremento della permeabilità intestinale con l'innescarsi di un circolo vizioso responsabile del cronicizzarsi della malattia⁽⁴⁴⁾.

Nel caso delle UTI ricorrenti, invece, l'alterazione della permeabilità risulta essere secondaria alla proliferazione di batteri uropatogeni intestinali che vanno ad alterare l'equilibrio del microbiota residente, inducono una riduzione dello strato di muco e compromettono la funzionalità dell'epitelio cellulare. L'aumento di permeabilità che ne consegue assume un ruolo pivotale non solo nel ripresentarsi ricorrente delle infezioni, ma anche nell'accensione di uno stato infiammatorio

cronico latente che si traduce in uno stato doloroso cronico (dolore pelvico cronico, fibromialgia, vulvodinia)⁽⁴⁵⁾.

E. coli Nissle 1917 ha un'influenza positiva su una mucosa enterica danneggiata che mostra una maggiore permeabilità. EcN[®] è in grado di rafforzare alcuni elementi strutturali che spiegano la coesione degli enterociti nella mucosa intestinale e stabilizza la funzione di barriera intestinale. Ad esempio, EcN[®] suscita un effetto sia curativo che profilattico nei casi in cui la barriera intestinale è disturbata da batteri E. coli enteropatogeni^{(46) (47)}.

Come M. Alexander Schmidt e i suoi colleghi hanno potuto dimostrare, EcN[®] aumenta l'espressione delle proteine di tight junction zona occludens 1 e 2 (ZO1 e ZO2) e della proteina desmosoma denominata pinina, stabilizzando e rafforzando così la barriera intestinale (FIG.12)^{(46) (47) (48)}.

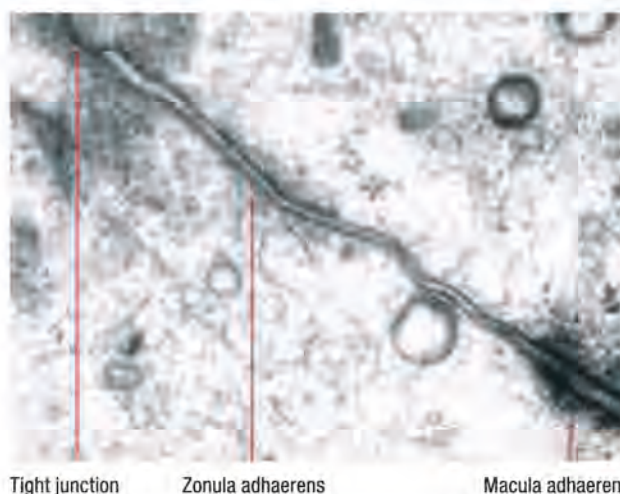


FIG.12: Immagine al microscopio elettronico: cellule dell'epitelio intestinale con Tight junction serrate.

Ulteriori esperimenti sono stati in grado di dimostrare che EcN[®] è in grado di ripristinare la barriera epiteliale precedentemente distrutta dall'infezione con ceppi enteroinvasivi, come Salmonella, Shigella e EHEC, ricostituendo le giunzioni strette e ristabilendo quindi l'integrità dell'epitelio intestinale. (FIG.13)

E' stato dimostrato che per l'azione anti-invasiva non è necessario alcun contatto fisico, né tra EcN[®] e le cellule epiteliali né tra EcN[®] e i batteri patogeni invasivi, ma si ottiene tramite il rilascio di OMV (Outer Membrane Vescicle) diffusibili da parte del probiotico^{(49) (50)}.

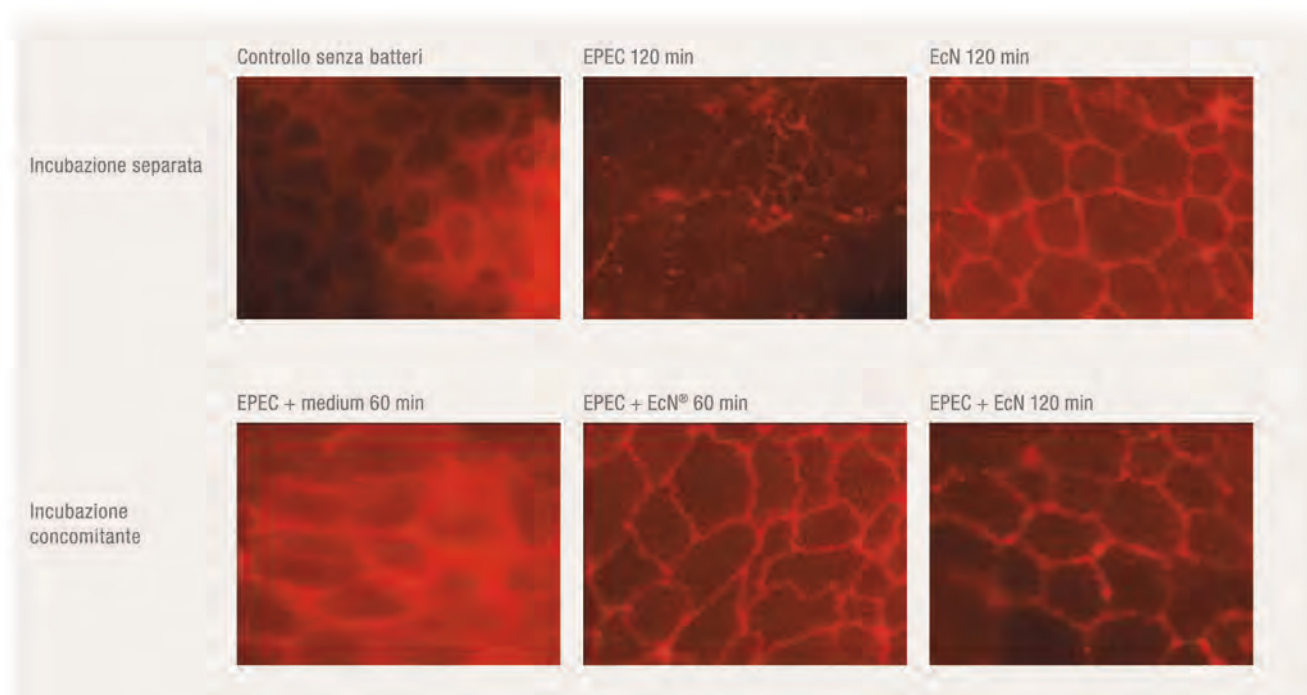


FIG.13: Effetti del ceppo E. coli non patogeno Nissle 1917 (EcN[®]) e del ceppo E. coli enteropatogeno (EPEC) E2348/69 sulla distribuzione della proteina a giunzione stretta zonula occludens-2 (ZO-2) nelle cellule epiteliali T84. I monostrati cellulari T84 sono stati incubati con batteri per diversi periodi di tempo e colorati per ZO-2 utilizzando un anticorpo fluorescente anti-ZO-2. Un'incubazione con E. coli ceppo Nissle 1917 (EcN[®]) per 120 minuti non ha alterato la distribuzione della proteina ZO-2. Al contrario, un'incubazione di 120 minuti con un ceppo di E. coli enteropatogeno (EPEC) ha indotto una ridistribuzione di ZO-2 e una riduzione della tenuta delle giunzioni strette.

La co-incubazione dei due ceppi ha evidenziato che EcN[®] abolisce l'impatto negativo di EPEC sulla distribuzione di ZO-2⁽⁴⁶⁾.

La capacità di EcN[®] di inibire l'enteroinvasività di E. coli enteroemorragici e uropatogeni è stata più recentemente valutata utilizzando un innovativo modello sperimentale su organoidi, che rappresentano un modello più affidabile per la pratica clinica rispetto ai tradizionali approcci sperimentali. I risultati confermano che EcN[®] migliora la funzione di barriera epiteliale negli HIO coinfectati sia con EHEC che con UPEC (FIG.14)⁽⁵¹⁾.

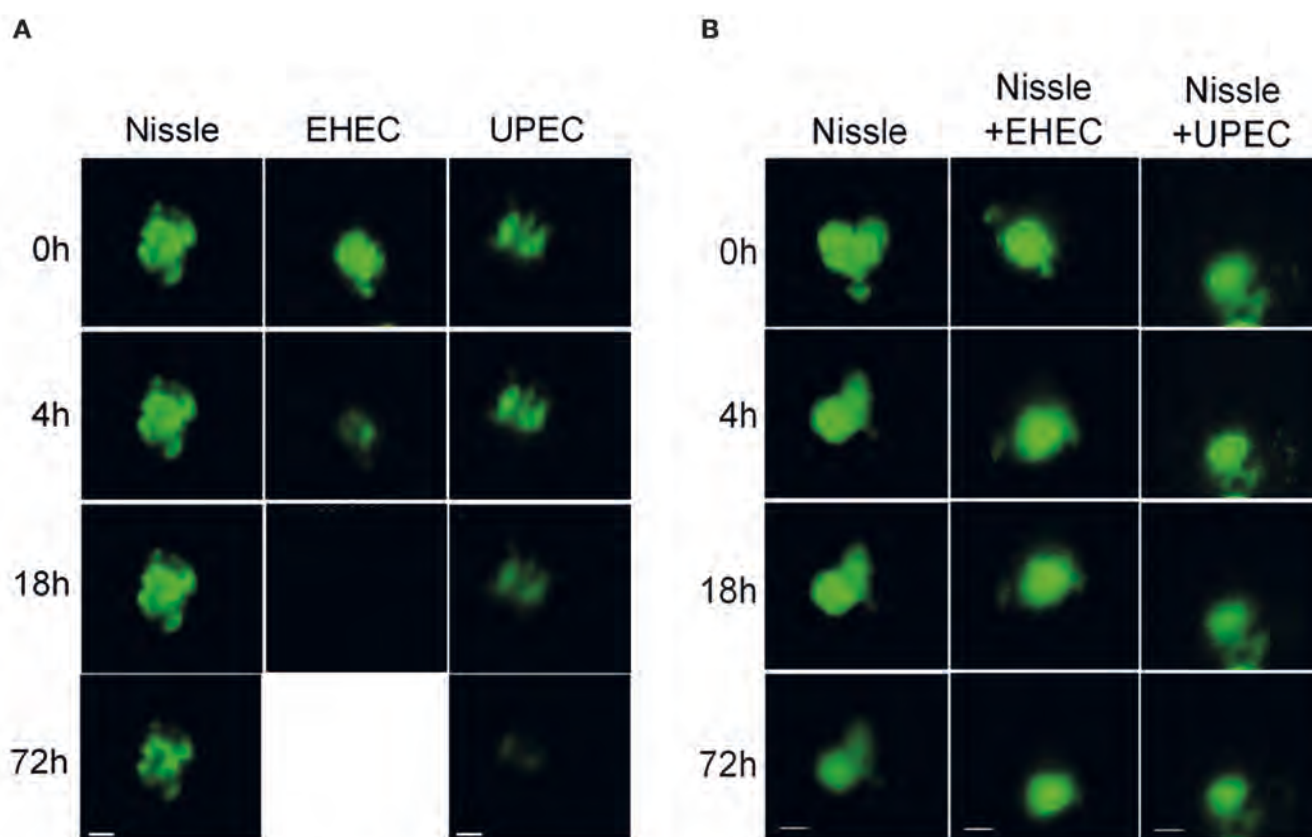


FIG.14: Variazione della permeabilità cellulare negli organoidi (HIO) (valutata tramite ritenzione del colorante fluorescente FITC-destrano) a seguito di iniezione di 10^3 CFU di Nissle, EHEC e UPEC. Nelle colture singole (A) EHEC e UPEC distruggono la barriera intestinale, mentre EcN® la preserva. In co-incubazione (B) EcN® protegge la funzione di barriera epiteliale dall'infezione con UPEC ed EHEC patogeni⁽⁵¹⁾.

Questo effetto stabilizzante di EcN® sulla barriera intestinale è stato riprodotto in vari esperimenti di coltura cellulare per applicazioni sia profilattiche che terapeutiche, anche in situazioni di alterazione della permeabilità indotta non da batteri patogeni, bensì da sostanze ad attività pro-infiammatoria.

In particolare Barbara G. e colleghi⁽⁵²⁾ hanno dimostrato, con uno studio in vitro, come EcN® sia capace di ridurre la permeabilità intestinale fortemente alterata da stimoli infiammatori (TNF α , IFN γ , SLIGRL) (FIG.15). Da un'analisi più approfondita è stato rilevato come la capacità di rafforzamento della barriera intestinale sia legata alla capacità di EcN® di aumentare l'espressione delle proteine di tight junction (in particolare ZO-1 e Occludine). (FIG.16)

Nello stesso studio gli autori hanno anche testato la stessa capacità di rafforzamento della barriera intestinale

di EcN® utilizzando il surnatante di biopsie ottenute da pazienti affetti da IBS (nelle varianti stitica, diarroica e mista). Anche in questo caso, sono stati ottenuti risultati significativi in termini di riduzione della permeabilità e di aumentata espressione delle proteine di tight junction (FIG.17)⁽¹⁷⁾.

La conseguenza per la pratica clinica di questi risultati sperimentali è che il ceppo di E. coli Nissle 1917 è in grado di rafforzare e rigenerare la funzione di barriera intestinale. Questo può essere di importanza centrale per l'efficacia di EcN® in varie malattie gastroenterologiche, epatologiche e allergologico-immunologiche, che sono secondarie o in qualche modo correlate al "fenomeno dell'intestino permeabile" (**leaky gut**) e può offrire un innovativo approccio per il miglioramento del quadro clinico di patologie croniche fortemente debilitanti.

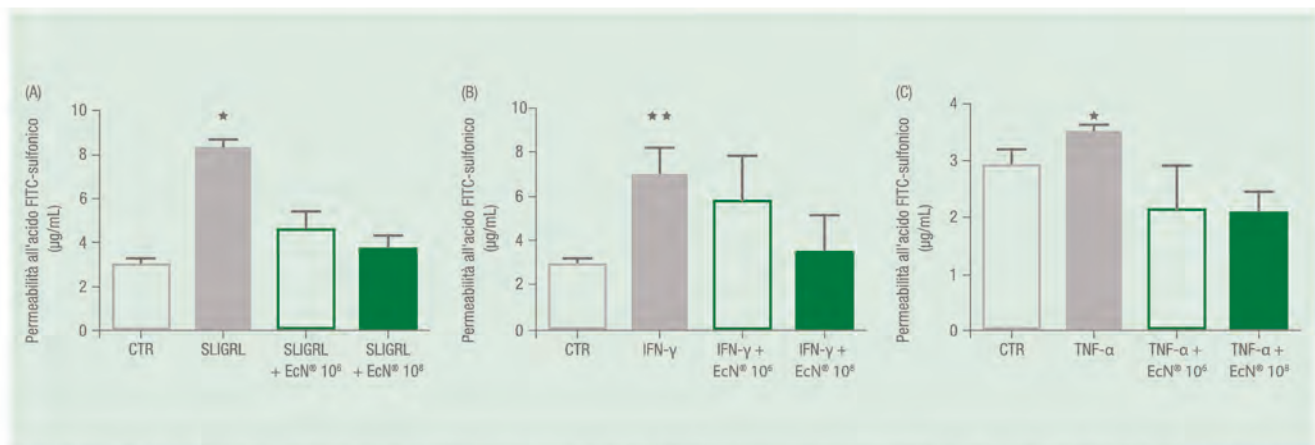


FIG. 15: Effetto di EcN[®] sulla permeabilità di un monostato cellulare di Caco-2 durante il trattamento con SLIGRL e citochine. (A) effetto sulla permeabilità dopo 6 h di co-incubazione con SLIGRL (50 μmol L⁻¹) con o senza EcN[®]; (B) effetto sulla permeabilità dopo 6 h di co-incubazione con interferone-γ (IFN-γ, 200 ng/mL) con o senza EcN[®]; (C) effetto sulla permeabilità dopo 6 h di co-incubazione con fattore di necrosi tumorale-α (TNF-α, 50 ng/mL) con o senza EcN[®]. CTR: cellule Caco-2 incubate con il solo terreno. *p < 0.05 rispetto a CTR, **p < 0.01 rispetto a CTR⁽⁵²⁾.

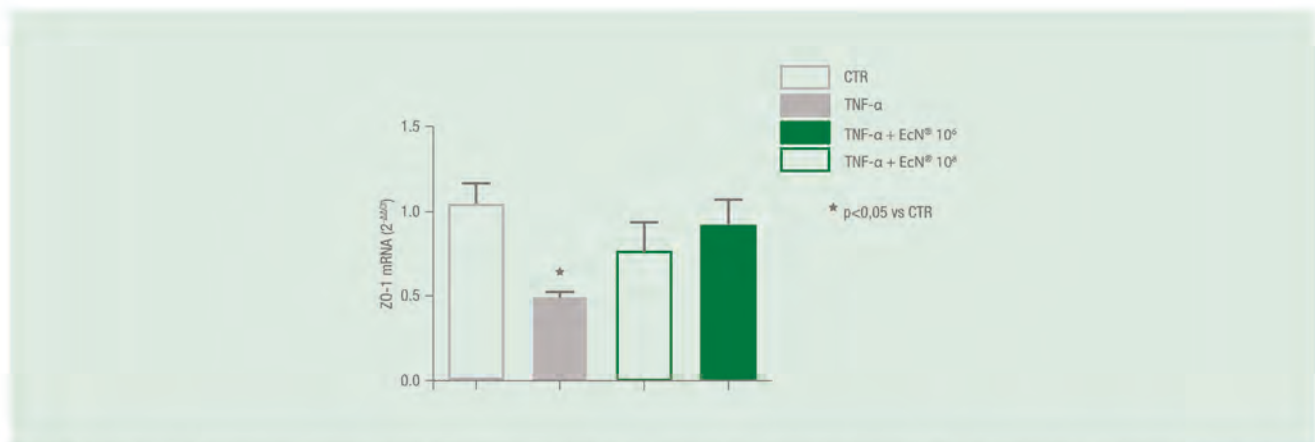


FIG. 16: EcN[®] aumenta l'espressione genica di ZO-1 e occludina e induce un recupero dell'espressione genica di ZO-1 e occludina in presenza di TNF-α⁽⁵²⁾.

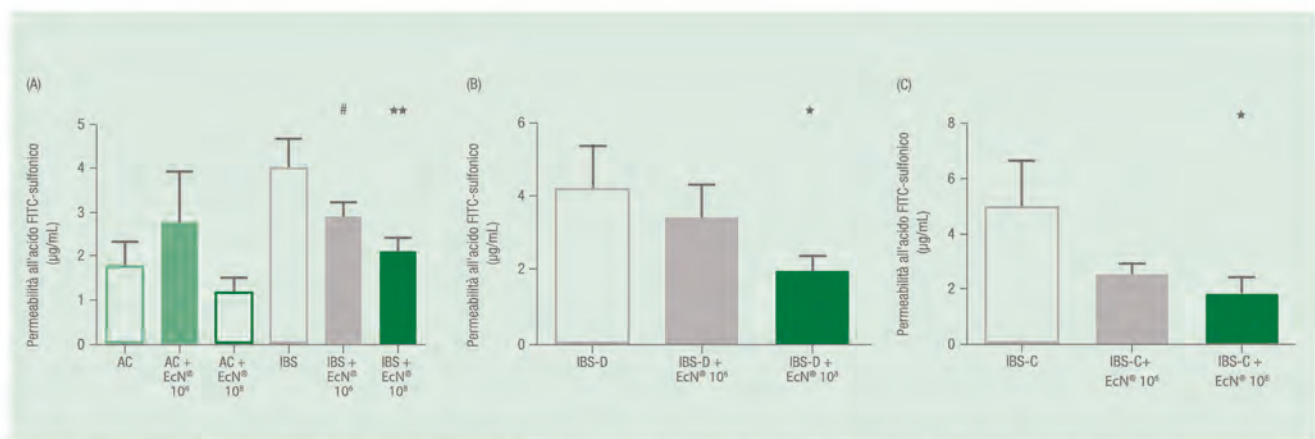


FIG. 17: Effetto EcN[®] sulla permeabilità di Caco-2 dopo 6 h di incubazione con mediatori mucosali. (A) Effetto di mediatori (SUP) rilasciati spontaneamente da controlli asintomatici e biopsie della sindrome dell'intestino irritabile (IBS), sulla permeabilità paracellulare con o senza EcN[®]. (B) Effetto di IBS-D SUP con o senza EcN[®]. (C) Effetto di IBS-C SUP con o senza EcN[®]. *p < 0.05; **p < 0.01; #p < 0,05⁽⁵²⁾.

Strategie di comunicazione di EcN® e attività immunomodulante e anti-infiammatoria

E. coli Nissle 1917 comunica con l'epitelio e con la flora intestinale («Crosstalk» e «Quorum sensing»). (FIG.18)

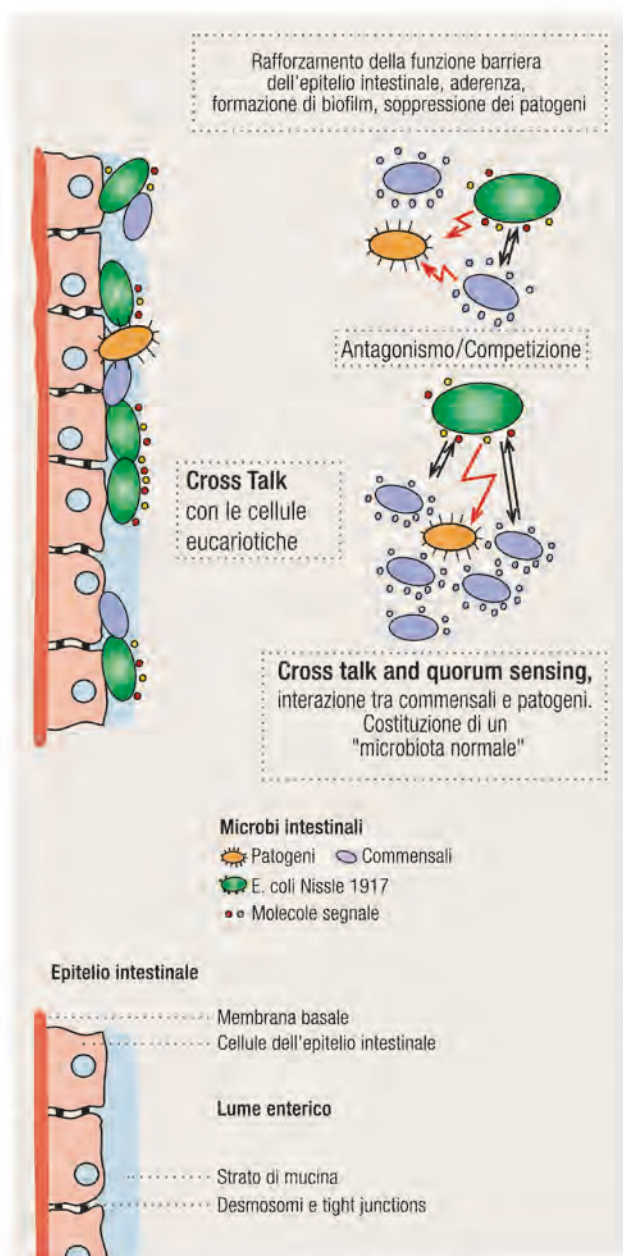


FIG.18: Strategie di comunicazione di E. coli Nissle 1917⁽⁵³⁾.

Alcuni studi mostrano che questo meccanismo di comunicazione coinvolge la regolazione di circa 300 geni diversi negli enterociti⁽⁴⁸⁾. È stato inoltre dimostrato che il "dialogo" di E. coli Nissle 1917 con le cellule dell'epitelio intestinale inibisce la produzione ed il rilascio delle citochine proinfiammatorie⁽⁵⁴⁾, stimola le difese innate aspecifiche dell'organismo⁽²³⁾ e induce la sintesi *de novo* e la redistribuzione delle proteine di tight junction.

Esperimenti in vitro e in vivo hanno evidenziato che EcN® possiede notevoli attività immunomodulanti, che si rivolgono sia al sistema immunitario innato che adattivo. Per quanto riguarda l'immunità adattativa, EcN® influenza sia il ramo umorale che cellulare del sistema immunitario.

Esperimenti con linee cellulari epiteliali e linfociti isolati hanno mostrato che EcN® mostra diverse attività immunomodulanti, e queste dipendono fortemente dai tipi di cellule/linee cellulari impiegate. Un esempio è l'inibizione dose-dipendente della secrezione di IL-8 indotta da TNF- α da parte di EcN nelle cellule epiteliali intestinali HCT-15⁽⁵⁵⁾. L'inibizione si riflette nel ridotto livello di espressione dell'mRNA di IL-8 nelle cellule epiteliali, come mostrato dalla real-time PCR. È interessante notare che l'inibizione mediata da EcN® della trascrizione di IL-8 indotta da TNF- α è indipendente dall'espressione genica regolata da AP-1 e dal fattore nucleare κ B (NF- κ B). Otte et al. hanno scoperto che il contatto delle cellule epiteliali intestinali (cellule Colo320 e SW480) con EcN® portava all'inibizione della risposta infiammatoria mediante la down regulation dell'attività della cicloossigenasi-2 (COX-2) indotta da TNF- α o gastrina. Questo portava ad una ridotta secrezione di prostaglandina proinfiammatoria E2 (PGE2)⁽⁵⁶⁾.

Utilizzando cellule mononucleate del sangue periferico umano, Helwig et al. hanno confrontato le attività immunomodulanti dei ceppi Gram-positivi Lactobacillus e Bifidobacterium con quelle del ceppo Gram-negativo EcN®.

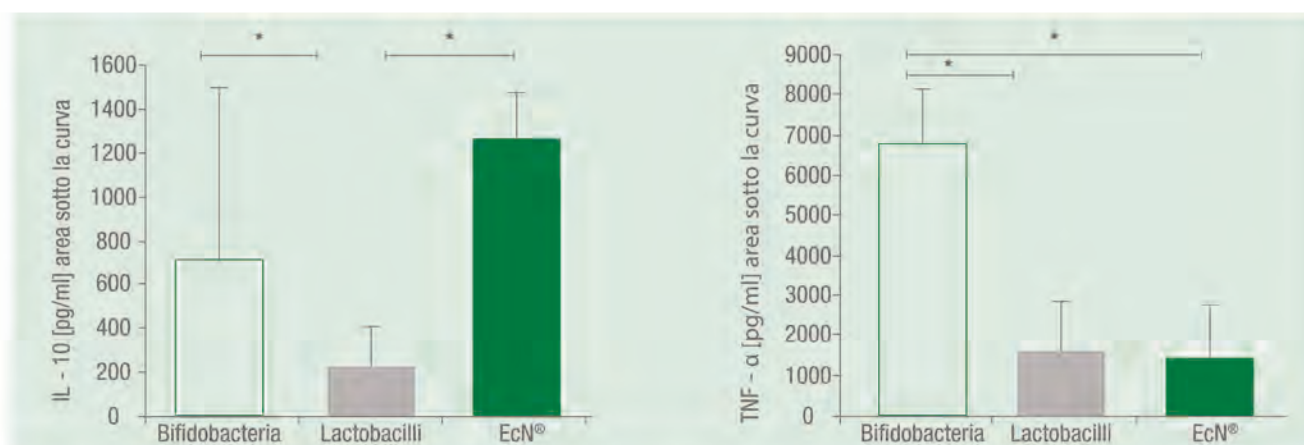


FIG. 19: Attività immunomodulatoria di batteri gram-positivi (bifidobatteri, lattobacilli) e gram-negativi (E. coli Nissle 1917, EcN®) su cellule mononucleate del sangue periferico umano (PBMC) in vitro⁽⁵⁷⁾.

È interessante notare che in questo studio il ceppo EcN®, rispetto agli altri batteri considerati, ha indotto un'elevato rilascio della citochina antinfiammatoria IL-10 ed una riduzione del rilascio delle citochine proinfiammatorie (IL-2, TNF-α, IFN-γ) (FIG. 19)⁽⁵⁷⁾.

Esperimenti in vivo

Nei giovani suinetti gnotobiotici, la colonizzazione con EcN® ha portato a un rapido sviluppo del sistema immunitario associato all'intestino con aumento significativo del numero di linfociti produttori di anticorpi IgA, IgM e IgG nella lamina propria dei villi intestinali e nei follicoli linfatici intestinali, e un aumento delle cellule CD4-positive in tutti i tessuti della mucosa e della sottomucosa, senza alcun segno di reazione infiammatoria (infiltrazione di granulociti)⁽⁵⁸⁾. In un modello sperimentale di colite acuta indotta da DSS nei topi, Rodriguez e colleghi, in coerenza con precedenti studi, hanno dimostrato che la somministrazione profilattica del probiotico EcN® mostra un importante effetto antinfiammatorio intestinale^{(54) (59)}.

I meccanismi coinvolti potrebbero essere associati alla capacità immunomodulatoria di EcN®. Questo trattamento probiotico mostra un impatto positivo sulla risposta immunitaria innata, preservando l'integrità della barriera intestinale e diminuendo la produzione di

citochine proinfiammatorie. Per quanto riguarda la risposta immunitaria adattativa, EcN® modula l'espressione delle citochine correlate a Th1, Th17 e Treg (FIG. 20-21)⁽⁶⁰⁾.

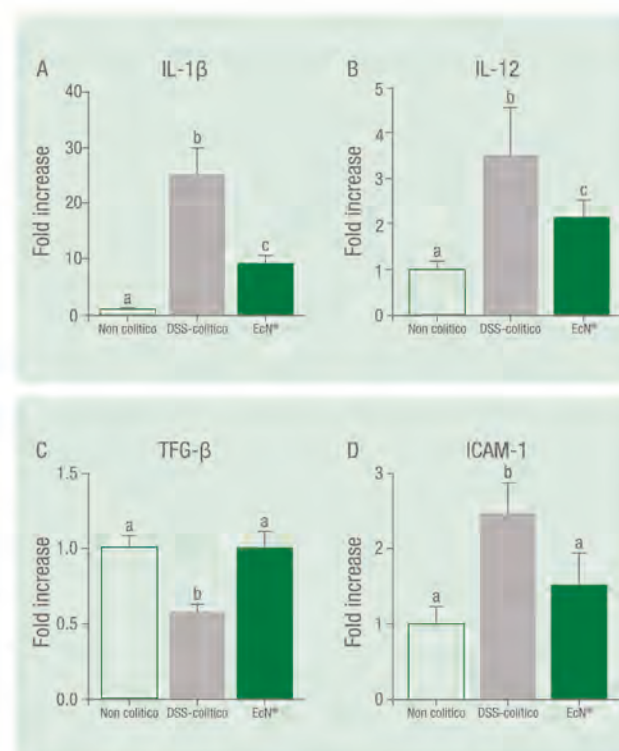


FIG. 20: Valutazione biochimica degli effetti di Escherichia coli Nissle 1917 (EcN®). L'espressione dell'mRNA delle citochine (A) IL-1β, (B) IL-12, (C) TGF-β e (D) ICAM-1 è stata quantificata mediante real-time PCR. Le barre con lettere diverse sono significativamente diverse (p < 0,05). Non colitico: gruppo sano non trattato; DSS-colitico: gruppo colitico indotto da DSS non trattato; EcN®: gruppo colitico indotto da DSS trattato con probiotico⁽⁶⁰⁾.

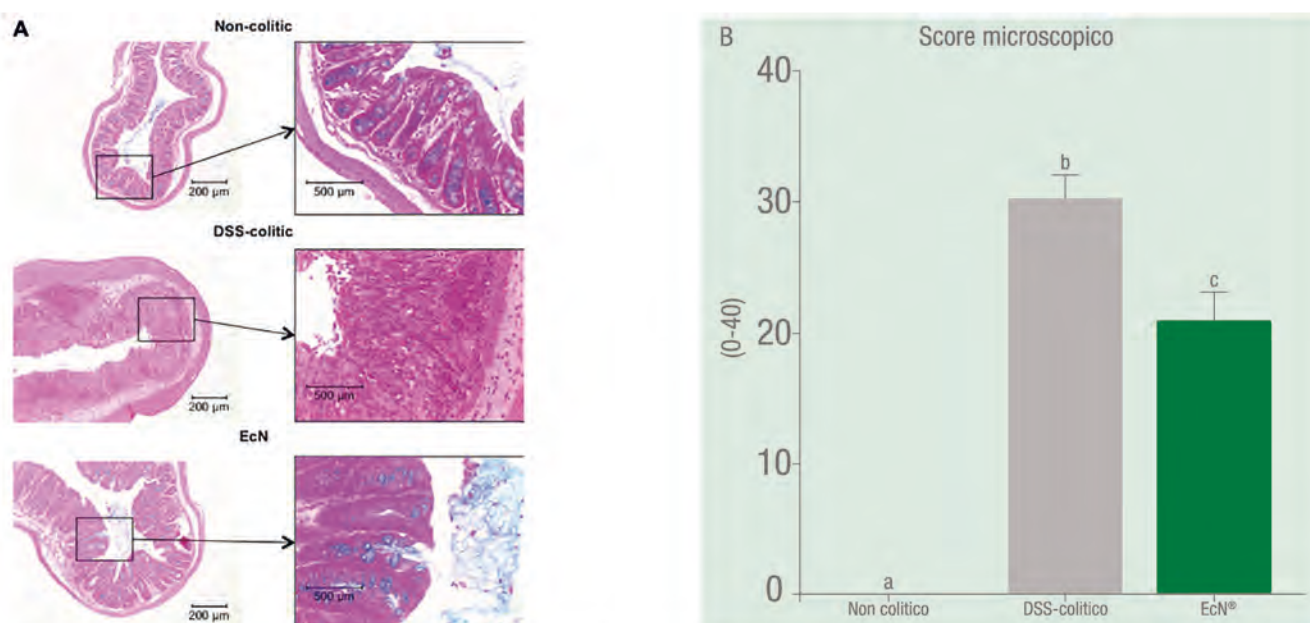


FIG.21: Il trattamento con *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN[®]) promuove il recupero del danno intestinale e dell'infiammazione indotti da DSS nei topi. (A) Immagini istologiche del tessuto del colon colorato con ematossilina ed eosina che mostrano l'effetto di EcN[®] sulla colite indotta da DSS. Vengono mostrate immagini rappresentative di ciascun gruppo sperimentale: non colitico, DSS-colitico ed EcN[®]. Nei topi non colitici, le immagini mostrano l'aspetto normale della mucosa intatta contenente le cripte con cellule caliciformi piene di mucina. Nel gruppo DSS-colitico, le immagini mostrano cambiamenti nella mucosa con aree di ulcerazione sullo strato epiteliale, oltre a un numero inferiore di cellule caliciformi che sono state impoverite in mucina e un intenso infiltrato di cellule infiammatorie. Nel gruppo EcN[®] si riscontra un miglioramento dell'istologia del colon, con ridotta area di ulcerazione, per lo più in via di guarigione, e presenza di cellule caliciformi rifornite del loro contenuto di mucina e ridotto infiltrato di cellule infiammatorie. (B) Punteggi istologici calcolati dopo analisi microscopiche di sezioni longitudinali del colon. I risultati sono espressi come media $\pm$ SEM. Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi ($p < 0,05$)⁽⁶⁰⁾.

Indagini sui neonati umani hanno rivelato che sia i neonati a termine che i neonati prematuri mostrano un aumento significativo dei livelli di immunoglobuline (IgA e IgM) nel siero del sangue e di IgA e IgM secretorie nei filtrati fecali entro pochi giorni dalla colonizzazione intenzionale con EcN[®] (FIG.22)⁽⁶¹⁾. Oltre a questi effetti immunomodulatori sullo sviluppo del ramo umorale del sistema immunitario, in uno studio clinico controllato con neonati prematuri è stata rilevata anche la stimolazione delle risposte immunitarie cellulo-mediate e dell'immunità naturale aspecifica dopo somministrazione orale di EcN[®](62).

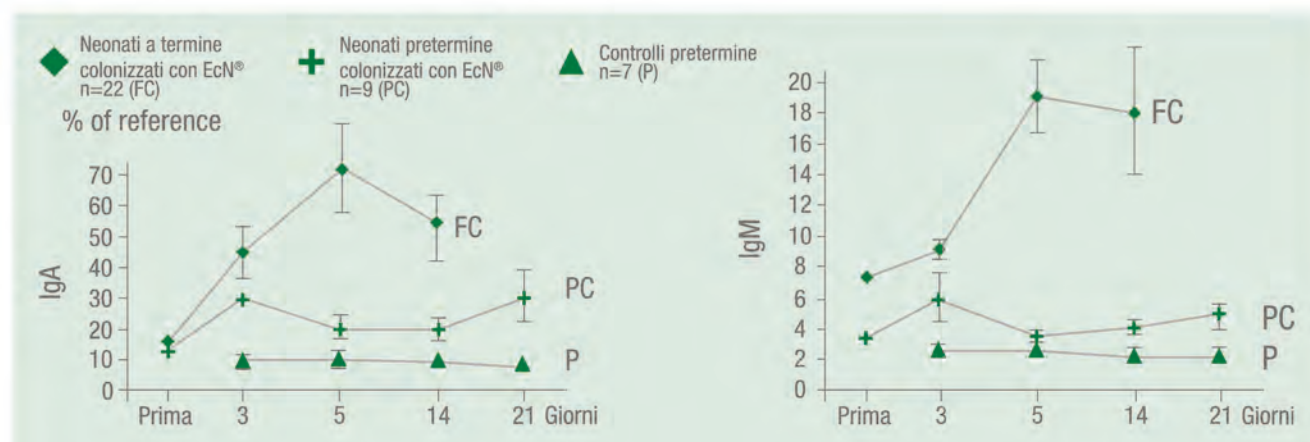


FIG.22: Effetto della colonizzazione intenzionale dell'intestino dei neonati da parte di *E. coli* Nissle 1917 (EcN[®]) sui livelli di IgA e IgM secretorie⁽⁶¹⁾.

Efficacia clinica di EcN®

IV

Le attuali autorizzazioni all'immissione in commercio, nonché gli studi clinici e i case reports rivelano l'ampio spettro di applicazioni di EcN®. Abbiamo raccolto di seguito i campi di applicazione più importanti e i risultati degli studi più significativi.

Colite Ulcerosa

Tra i singoli ceppi probiotici, *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN® 1917) è tra i più ampiamente studiati nel trattamento della colite ulcerosa. (Tabella 3)

Tre studi clinici di ottima qualità, randomizzati, in doppio cieco, verso gold standard therapy (mesalazina) hanno permesso di valutare l'efficacia di EcN® sul mantenimento della remissione nei pazienti con colite ulcerosa. In questa indicazione EcN®, somministrato in una dose di due capsule al giorno, ha dimostrato di essere equivalente alla mesalazina (assunta con dosaggio di 1,5 g).

Patients	Design/ Duration	Author/Year
50 EcN® 53 Mesalazina	randomizzato, doppio-cieco, multicentrico, 12 settimane,	Kruis et al., 1997 ⁶⁴
57 EcN® 59 Mesalazina	randomizzato, doppio-cieco, 1 anno,	Rembacken et al., 1999 ⁶⁵
162 EcN® 165 Mesalazina	randomizzato, doppio-cieco, multicentrico, 1 anno	Kruis et al., 2004 ²⁶
52 EcN® 11 Mesalazina	aperto, 1 anno	Henker et al., 2008
46 EcN® 11 Placebo	randomizzato, doppio-cieco, 8 settimane	Matthes et al., 2010 ⁶⁶

Tabella 3: Studi clinici in doppio cieco randomizzati con EcN® in pazienti con colite ulcerosa per la valutazione del mantenimento della remissione della malattia.

Nel primo di questi studi, condotto da Kruis et al. su 103 pazienti affetti da colite ulcerosa, 43 hanno confrontato l'efficacia della terapia con 2 capsule di EcN® al giorno rispetto al trattamento base con 3 x 500 mg di mesalazina nel mantenimento della remissione, per un periodo di 12 settimane. Da questo studio non sono emerse differenze significative tra i due gruppi per i seguenti parametri ⁽⁶⁴⁾:

- "Clinical Activity Index" (CAI)
- "Relapse Rate" (16,0 % con EcN® contro 11,3% con mesalazina)
- "Time-to-Remission" ($10^6 \pm 5$ giorni con EcN® contro $10^3 \pm 4$ giorni con mesalazina). (FIG.23)

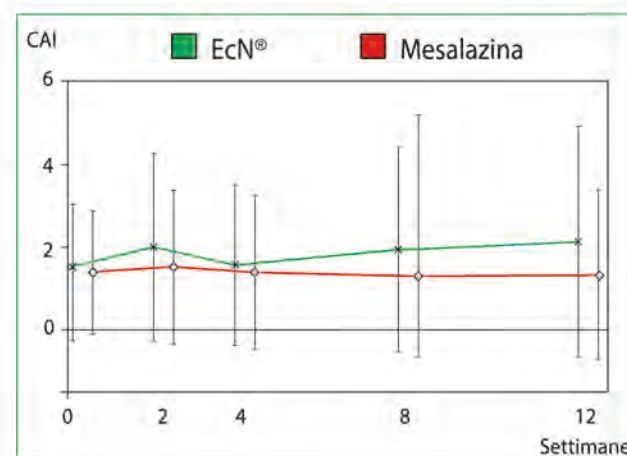


FIG.23: Colite ulcerosa, CAI con EcN® vs. mesalazina (Kruis et al. 1997)⁽⁶⁴⁾.

Nel secondo studio clinico ⁽⁶⁵⁾, 116 pazienti affetti da colite ulcerosa sono stati inclusi già durante la fase acuta della malattia e trattati con 80 mg di gentamicina 3 volte al dì (dal 1° al 7° giorno) e prednisolone a dosaggio decrescente. I pazienti dei due gruppi di studio hanno ricevuto 2 x 2 capsule di EcN®/die oppure mesalazina 3 x 800 mg come farmaco di controllo. Ottenuta la remissione, la terapia di mantenimento è proseguita con 2 x 1 capsula di EcN®/d o 3 x 400 mg/d mesalazina per un periodo di 12 mesi. I pazienti che non avevano raggiunto la remissione al termine delle prime 12 settimane sono stati esclusi dallo studio.

La durata media della remissione è stata rispettivamente di 185 giorni (EcN®) e/o 175 giorni (mesalazina). Nel corso di un anno, il 67 % dei pazienti del gruppo EcN® ed il 73 % dei pazienti del gruppo mesalazina hanno sviluppato una recidiva. Tra i due gruppi non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa (test di equivalenza unilaterale). (FIG.24)

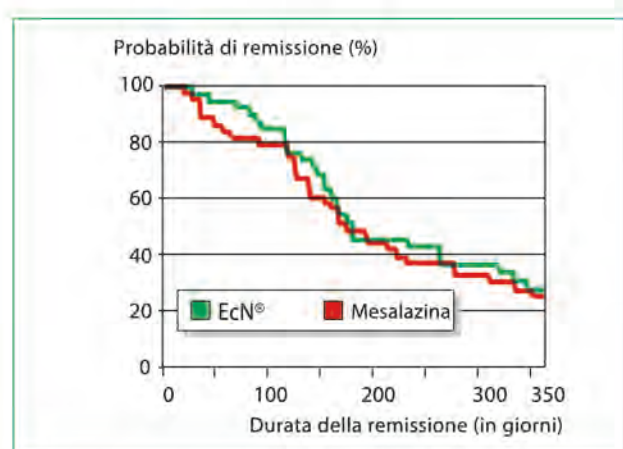


FIG.24: Colite ulcerosa, evoluzione della remissione nell'arco di 12 mesi; curva di Kaplan-Meier (Rembacken et al. 1999)⁽⁶⁵⁾.

I tassi ragguardevolmente elevati delle recidive sono riconducibili da una parte al fatto che i pazienti sono stati inclusi nel trial durante la fase acuta della malattia, situazione questa che è, di per sé, causa di un incremento della percentuale di recidive rispetto ai pazienti con remissione prolungata. Dall'altra, gli autori hanno adottato una definizione in recidiva più severa rispetto a quella prevista dagli standard internazionali; a differenza di altri studi, sono stati classificati come in recidiva anche pazienti con cambiamenti minimi del quadro clinico ed endoscopico.

Per il terzo, più importante, studio clinico sul mantenimento della remissione con EcN®, che è stato condot-

to in dieci Paesi europei, sono stati arruolati 327 pazienti con UC in remissione ($n = 110$ EcN®, $n = 112$ mesalazina). I pazienti sono stati randomizzati a ricevere 1 x 2 capsule di EcN® oppure di 3 compresse da 500 mg di mesalazina al giorno, per la durata di un anno (12 mesi). La recidiva era stata definita dalla presenza di un CAI ≥ 6 oppure dall'aumento del CAI di minimo 3 punti in concomitanza con un CAI superiore a 4 nonché dalla comparsa di un'inflammatione confermata endoscopicamente ed istologicamente⁽²⁶⁾.

Al termine dello studio 222 dei 327 pazienti arruolati (122 pazienti con mesalazina, 110 pazienti con EcN®) hanno completato lo studio in conformità con il protocollo. Il tasso di recidiva ottenuto è stato 38/112 pazienti nel gruppo mesalazina (33,9 %) e 40/110 pazienti nel gruppo EcN® (36,4 %).

Sia l'analisi PP ($p < 0,01$) che l'analisi ITT ($p < 0,02$) hanno indicato un'efficacia equivalente dei due farmaci (test di equivalenza unilaterale). Il profilo di tollerabilità è risultato buono per entrambi trattamenti. (FIG. 25)

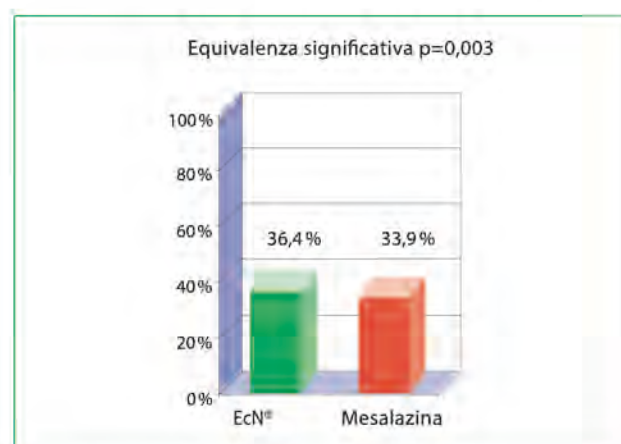


FIG.25: Tasso di recidive in pazienti con colite ulcerosa nell'arco di un anno, Analisi per protocollo (PP) (Kruis et al. 2004)⁽²⁶⁾.

Uno studio pilota ⁽⁶⁶⁾ è stato anche condotto su 57 pazienti che hanno ricevuto dei clismi con vari volumi (10 ml, 20 ml o 40 ml) di un placebo o di E. coli Nissle 1917 (10⁸ CFU/ml) per via rettale per un massimo di otto settimane. L'instillazione rettale del ceppo di E. coli Nissle 1917 produce un miglioramento dose-dipendente dei risultati clinici, endoscopici e istologici di una colite ulcerosa distale attiva lieve-moderata DAI 4-9 (Disease Activity Index secondo Sutherland).

La remissione (DAI di 2) è stata raggiunta nel gruppo placebo 2/11 (18,2%), il 10-ml-E. coli ceppo Nissle 1917 gruppo 3/11 (27,3 %), il 20-ml-E. coli ceppo Nissle 1917-gruppo 8/18 (44,4 %) e il 40-ml-E. coli ceppo Nissle 1917-gruppo 9/17 (52,9%). Non ci sono state differenze significative tra il placebo e EcN[®] per quanto riguarda la tollerabilità. (FIG.26)

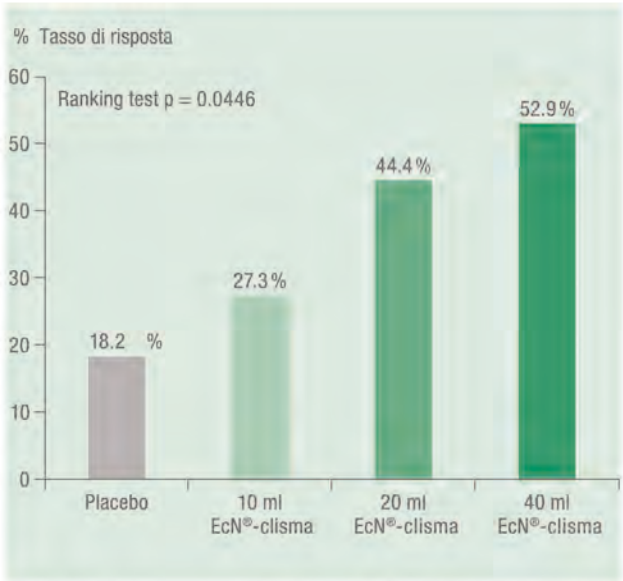


FIG.26: Tasso di remissione (%) in casi di colite ulcerosa distale dopo applicazione rettale di E. coli Nissle 1917 o placebo. Analisi per-protocol (N=57) (Matthes et al. 2010)⁽⁶⁶⁾.

Recenti metanalisi che hanno preso in considerazione questi ed altri studi di confronto di efficacia tra EcN[®] e mesalazina hanno confermato l'equivalenza di efficacia di EcN[®] con la mesalazina nel mantenimento della remissione della Colite Ulcerosa (FIG.27)^{(67) (68)}.

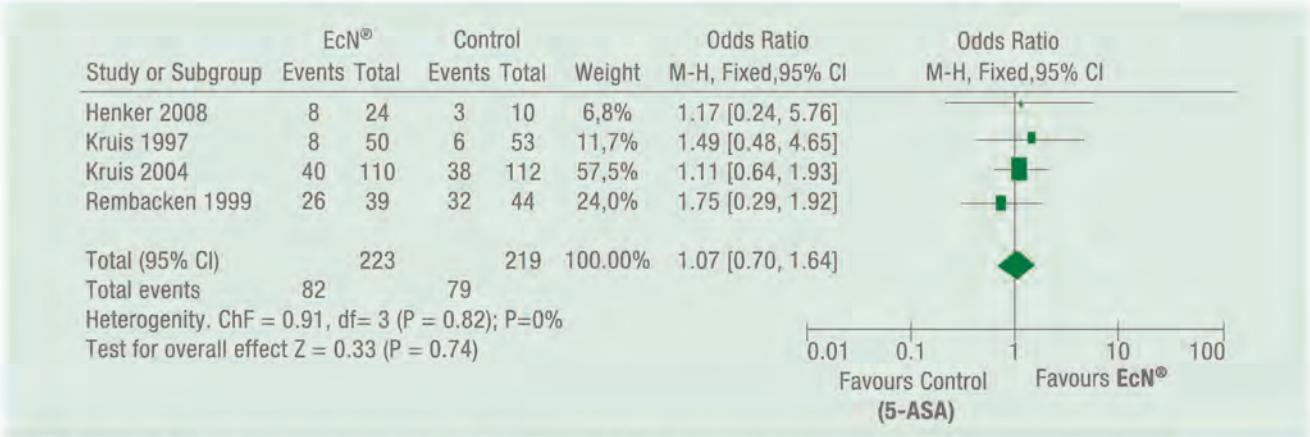


FIG.27: Metanalisi di studi randomizzati controllati che valutano il ruolo di E. coli Nissle 1917 nel mantenimento della remissione della Colite Ulcerosa rispetto alla terapia standard mesalazina (Losurdo et al. 2015)⁽⁶⁸⁾.

Oggi E. coli Nissle 1917 è l'unico farmaco probiotico inserito nelle Linee Guida della ECCO (European Crohn and Colitis Organization) come possibile alternativa alla mesalazina per i pazienti con UC in remissione⁽⁶⁹⁾.

Secondo le linee guida Europee della ECCO l'Escherichia coli Nissle 1917 viene riconosciuto come l'unico probiotico alternativo alla Mesalazina per il mantenimento della remissione della colite ulcerosa.



**Third European evidence-based
consensus on diagnosis and
management of Ulcerative Colitis Part 2:
Current management**



Marcus Harbord et al.
Journal of Crohn's and Colitis, 2017, 1–24

**“It was concluded that EcN is not inferior
to the established standard 5-ASA
for maintenance of remission in UC”**

Linee guida della "European Crohn and Colitis Organization" (ECCO)⁽⁶⁹⁾.

Malattia di Crohn

Per ciò che riguarda il trattamento della malattia di Crohn le evidenze di efficacia di EcN® sono meno solide, anche se disponiamo di una vasta esperienza raccolta nella pratica clinica nonché dei risultati di uno studio clinico pilota.

Malchow ha trattato 28 pazienti con malattia di Crohn attivo nella regione dell'intestino crasso per oltre un anno con prednisolone a dosaggio decrescente ed una terapia adiuvante con EcN® vs. placebo. Ottenuta la remissione, le percentuali di recidive nel gruppo dei pazienti trattati con EcN® sono state inferiori che nel gruppo di controllo (33,3 % vs. 63,6 %). (FIG.28)

La terapia adiuvante con EcN® ha inoltre consentito di ridurre la dose del corticosteroide. Il rischio di effetti secondari legati al trattamento adiuvante con EcN® è nettamente inferiore rispetto al trattamento con il corticosteroide (FIG.29)⁽⁷⁰⁾.

Questo fattore assume un'importanza ancora maggiore tenendo conto del fatto che una terapia di mantenimento della remissione può protrarsi per molti mesi.

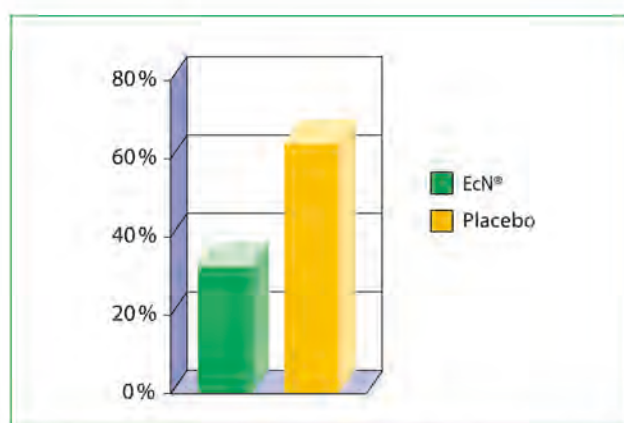


FIG.28: Malattia di Crohn dell'intestino crasso, tasso di recidive con EcN® rispetto ad un placebo (Malchow et al. 1997)⁽⁷⁰⁾.

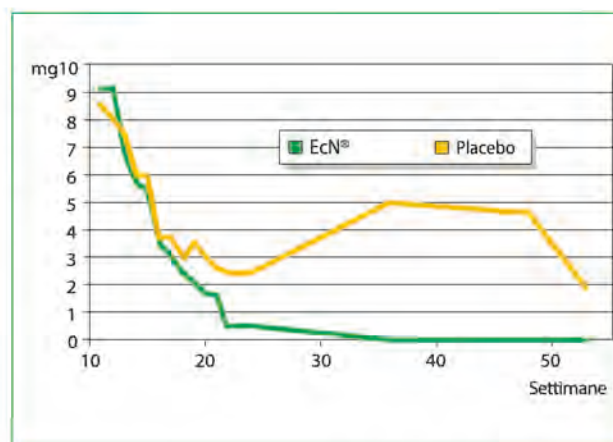


FIG.29: Malattia di Crohn dell'intestino crasso, consumo medio di prednisolone a paziente (tra la 11ª e la 53ª settimana)(Malchow et al. 1997)⁽⁷⁰⁾.

Malattia Diverticolare Sintomatica non Complicata (SUDD)

In pazienti sintomatici con malattia diverticolare semplice (SUDD) la sintomatologia è fortemente influenzata dalla proliferazione batterica nei diverticoli e dall'infiammazione del colletto del diverticolo.

Le ipotesi fisiopatologiche che supportano l'uso di EcN® nel trattamento della SUDD includono l'azione inibitoria verso i patogeni, l'aumentata secrezione di IgA all'interno delle placche di Peyer e la modulazione del sistema immunitario tramite l'inibizione del rilascio di citochine pro-infiammatorie⁽⁴⁰⁾.

Fric et al. in uno studio prospettico aperto hanno paragonato l'efficacia della somministrazione di un antimicrobico intestinale verso lo stesso trattamento fatto seguire da EcN® in pazienti che avevano già precedentemente avuto episodi di diverticolite con sanguinamento rettale e che al momento, pur non soffrendo di attacchi acuti, continuavano a manifestare dolore addominale, defecazione irregolare, bloating ed eccessiva flatulenza (SUDD)⁽⁷¹⁾.

La supplementazione della terapia antimicrobica convenzionale con un trattamento one-shot di 5 settimane con E. coli Nissle 1917 permette di ridurre l'intensità di tutti i sintomi addominali ($p < 0,001$) e soprattutto di allungare in modo sostanziale e altamente significativo (di 7 volte) il periodo di remissione dai sintomi (FIG.30)⁽⁷¹⁾.

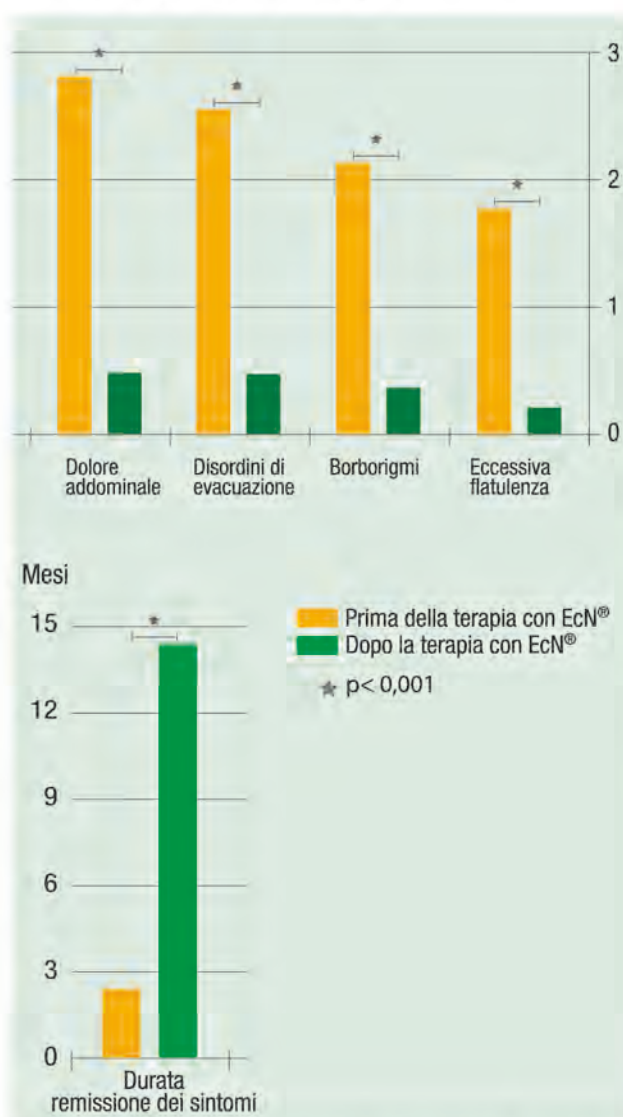


FIG.30: L'integrazione della terapia antibiotica con EcN® permette di ridurre la sintomatologia addominale e di allungare significativamente il periodo privo di sintomi (da 2,43 mesi con la sola terapia antibiotica a 14,1 mesi con la terapia di associazione con EcN®) (Fric et al, 2003)⁽⁷¹⁾.

Sindrome dell'intestino irritabile (IBS)

Sebbene i dati aggregati di una metanalisi ⁽⁷²⁾ siano a favore dell'efficacia dei probiotici nel trattamento dei sintomi dell'IBS, i risultati dei diversi studi mostrano un'ampia variabilità con risultati spesso contraddittori. Apparentemente, non tutti i probiotici sono uguali, e non tutti i probiotici possono essere efficaci. E' inoltre plausibile che probiotici specifici siano attivi solo in tipi specifici di IBS.

La sindrome dell'intestino irritabile (IBS) appartiene a quelle malattie funzionali intestinali che in circa il 25% dei pazienti si sono sviluppate qualche tempo dopo un episodio di diarrea infettiva acuta o una terapia antibiotica prolungata⁽⁷³⁾. Questa IBS post-infettiva è caratterizzata da un'ipersensibilità del sistema sensoriale viscerale dell'intestino (la cosiddetta iperalgesia viscerale).

In un modello di ratto consolidato di iperalgesia viscerale indotta da TNBS, la somministrazione orale di EcN® ha portato a una significativa riduzione dei riflessi visceromotori (VMR) dei muscoli intestinali, che in precedenza erano aumentati come conseguenza dell'infiammazione a breve termine indotta da TNBS⁽⁷⁴⁾.

In uno studio multicentrico pilota, 41 pazienti sono stati trattati con EcN® per un periodo di quattro settimane. La terapia con EcN® ha prodotto un miglioramento dei sintomi nella maggior parte dei pazienti. In particolare si è osservato un miglioramento del meteorismo e dei sintomi dolorosi ad esso associati con un conseguente miglioramento anche della qualità della vita. Il 78% dei pazienti ha valutato la tolleranza della terapia con EcN® da "buona" a "molto buona" (FIG.31)⁽⁷⁵⁾.

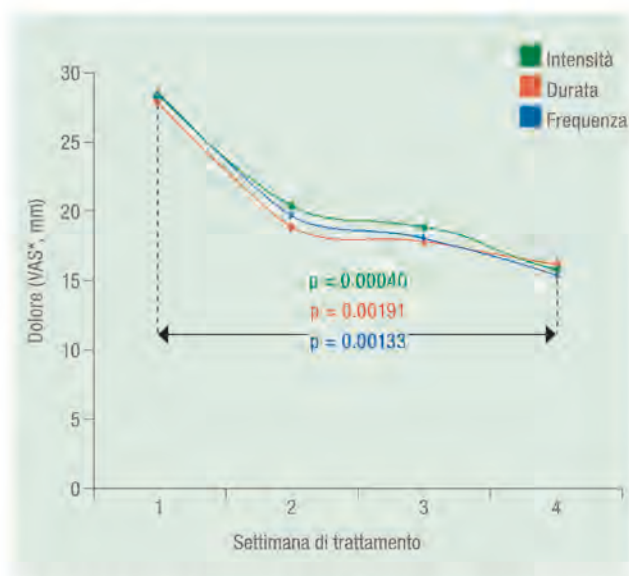


FIG.31: Valutazione del dolore (intensità, durata e frequenza) dei pazienti nei diari, rappresentati come valori medi settimanali (Keller 2010)⁽⁷⁵⁾. *VAS = Scala analogica visiva.

In uno studio monocentrico, randomizzato, in doppio cieco, 120 pazienti affetti da IBS sono stati randomizzati ad assumere EcN® (2 capsule al dì) oppure placebo per 12 settimane. Complessivamente, il tasso di risposta è stato più alto nel gruppo trattato con EcN® rispetto al gruppo placebo. Tuttavia, solo dopo 10 e 11 settimane, le differenze sono state significative (20,0 % punti $p=0,01$ e 18,3% punti $p=0,02$, rispettivamente). La risposta migliore è stata osservata nel sottogruppo di pazienti che avevano sviluppato la sindrome dell'intestino irritabile a seguito di un evento infettivo (IBS post-infettiva) o dopo trattamenti antibiotici prolungati (IBS post-terapia antibiotica) (45,7% punti, $p=0,029$)⁽⁷⁶⁾.

Da un recente studio pubblicato su Nature Communication è emerso inoltre che EcN® è in grado di produrre un lipopeptide analgesico capace di attraversare la barriera epiteliale e inibire il flusso di calcio indotto dall'attivazione dei nocicettori nei neuroni sensoriali tramite il recettore GABA-B. L'assunzione di EcN®, quindi, potrebbe contribuire attivamente a ridurre il dolore viscerale associato all'IBS⁽⁷⁷⁾.

Infezioni Ricorrenti delle Vie Urinarie

Negli ultimi anni, la ricerca si è concentrata sull'associazione tra disbiosi urinaria e intestinale per comprendere e spiegare lo sviluppo di malattie uro-ginecologiche croniche, in particolar modo le infezioni, come cistiti, vaginiti, candidosi e prostatiti.

Diversi studi di popolazione hanno reso sempre più evidente la stretta correlazione tra rUTI (recurrent Urinary Tract Infections) e disordini gastrointestinali (IBS, stipsi, diarrea). Ad esempio, Vicari e al. hanno dimostrato che la prostatite sintomatica (PS) è frequentemente associata ad IBS (~ 30%) e che questi pazienti hanno una frequenza significativamente più alta di prostatite cronica batterica (CPB) e prostatite non infiammatoria rispetto ai pazienti con solo PS. In questo contesto, è importante sottolineare come una disbiosi intestinale possa favorire le rUTI, ma allo stesso tempo l'assunzione di antibiotici e/o antimicotici possa favorire una disbiosi intestinale⁽⁷⁸⁾.

La letteratura scientifica internazionale dimostra inequivocabilmente che nei pazienti con batteriuria asintomatica o con infezioni recidivanti delle vie uro-genitali si riscontrano con elevata frequenza:

- alterazioni della permeabilità intestinale
- modificazioni delle caratteristiche chimico-fisiche del muco intestinale
- danno ultrastrutturale delle tight junction
- iperespressione delle citochine ad azione proinfiammatoria
- sbilanciamento del rapporto Th1/Th2
- dismicrobismo intestinale

Tutti i fattori enunciati sono riconosciuti responsabili di un processo flogistico con tendenza alla cronicizzazione e del fenomeno ultimo della traslocazione batterica il quale sarebbe responsabile del passaggio di flora patogena (*E. Coli*, *Candida*, *Proteus*, etc) attraverso la mucosa intestinale direttamente nel circolo linfatico che, essendo comune tra le vie intestinali e quelle urinarie, è in grado di colonizzare attivamente le vie genitourinarie determinando la comparsa di infezioni spesso a tendenza cronico-recidivante.

Lo stato infiammatorio cronico latente, con proliferazione mastocitaria e ipersviluppo dei neuroni sensoriali del dolore, causato dal ripresentarsi cronico e spesso con elevata frequenza delle infezioni, è correlato anche a vulvodinia e dolore pelvico cronico ^{(79) (80)}, condizioni che contribuiscono in modo sostanziale all'ulteriore peggioramento della già pessima qualità di vita dei pazienti che soffrono di rUTI.

In questo contesto appare evidente come EcN® possa ricoprire un ruolo fondamentale nel contrastare e soprattutto nel prevenire questo tipo di problematiche, attraverso differenti meccanismi d'azione. EcN® infatti ha dimostrato elevata efficacia nell'antagonizzare i batteri uropatogeni sia della stessa specie (*E. coli*, UPEC), sia di specie diverse (*Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus*...), anche in presenza di batteri resistenti agli antibiotici. EcN® agisce inibendone la capacità di colonizzazione e di proliferazione e mostrando in taluni casi una vera e propria attività battericida diretta mediata dal rilascio di specifiche microcine. (Vedi paragrafi precedenti).

Queste peculiari azioni antibatteriche, si uniscono alla capacità di EcN® di rafforzare la barriera intestinale (con aumentata espressione delle proteine di tight junction e riduzione del leaky gut) che permette di inibire la traslocazione dei batteri patogeni dall'intestino alle vie urinarie e, contemporaneamente, di ridurre i sintomi gastrointestinali concomitanti, quali gonfiore ed alterazione dell'alvo.

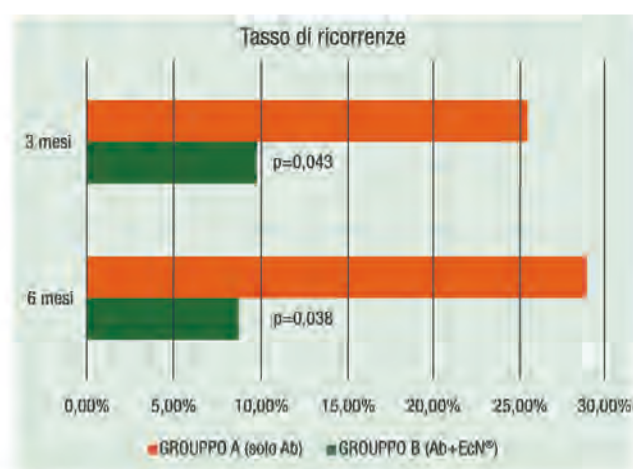


FIG.32: Tasso di ricidiva a 3 e 6 mesi (Arcaniolo 2021) ⁽⁸¹⁾.

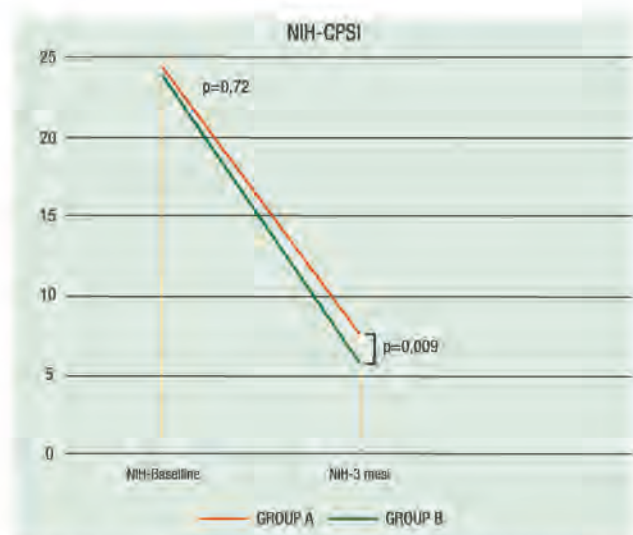


FIG.33: Punteggio NIH-CPSI: baseline vs 3 mesi NIH-CPSI National Institutes of Health-Chronic Prostatitis Symptom Index (Arcaniolo 2021) ⁽⁸¹⁾.

Infine, la dimostrata azione antinfiammatoria e immunomodulante di EcN® a livello del colon distale, lo rendono il probiotico di elezione per le rUTI sia per ridurre la frequenza delle ricorrenze biologiche di infezione, sia per ridurre e gestire il dolore pelvico cronico associato all'infiammazione cronica.

Arcaniolo et al., ⁽⁸¹⁾ in uno studio spontaneo randomizzato e controllato su pazienti con prostatite cronica batterica (CPB), hanno dimostrato che far seguire EcN® alla terapia antibiotica convenzionale porta una riduzione significativa delle ricorrenze biologiche sia

durante il trattamento ($p=0,043$), sia dopo 3 mesi dalla sospensione dello stesso ($p=0,038$). In tutto nel gruppo che aveva assunto EcN dopo la terapia antibiotica, rispetto a quello con la sola terapia antibiotica, nei 6 mesi di follow-up sono state riscontrate il 36% in meno di ricorrenze biologiche. (FIG.32)

Il trattamento con EcN®, inoltre, ha permesso un significativo migliore controllo dei sintomi rispetto alla sola terapia antibiotica ($p=0,009$), risultato che dimostra l'importanza dell'attività antinfiammatoria unitamente a quella antibatterica del ceppo probiotico nella risoluzione dei sintomi (FIG.33)⁽⁸¹⁾.

Il microbiota intestinale sano previene le malattie atopiche

Il microbiota dell'intestino ha un'influenza sulle reazioni immunitarie regolate dai linfociti Th1 e dai linfociti Th2. Un equilibrio disturbato tra i vari sottoinsiemi di cellule T helper sembra essere responsabile dell'aumento dell'incidenza di malattie atopiche. Studi immunologici relativi alla colonizzazione di EcN® nei neonati hanno dimostrato che lo sviluppo del sistema immunitario del neonato è stimolato⁽⁶¹⁾.

Ciò può anche essere associato a una riduzione del rischio di sviluppare un'allergia. Uno studio pilota condotto su 62 neonati prematuri tardivi fornisce una prima prova che EcN® è in grado di ridurre l'incidenza e la severità delle ARI (infezioni respiratorie acute). EcN®, inoltre, dimostra una eccellente biocompatibilità individuale senza reazioni avverse⁽⁸²⁾.

EcN® in altre malattie

Uno studio prospettico di sorveglianza post-marketing (comprendente 3.807 pazienti) ha rivelato la straordinaria ampiezza dello spettro terapeutico empirico e delle azioni del ceppo di E. coli Nissle 1917 (FIG.34)⁽⁸³⁾.

Oltre alle infezioni delle vie urinarie, EcN® è stato applicato anche in caso di altre malattie extraintestinali come dermatosi⁽⁸⁴⁾, infezioni delle vie respiratorie⁽⁸²⁾ e peritoniti ricorrenti in pazienti in dialisi peritoneale⁽⁸⁵⁾.

I risultati degli studi ottenuti con EcN® non sono applicabili o trasferibili ad altri probiotici perché sono correlati alle proprietà ceppo-specifiche di E. coli Nissle 1917

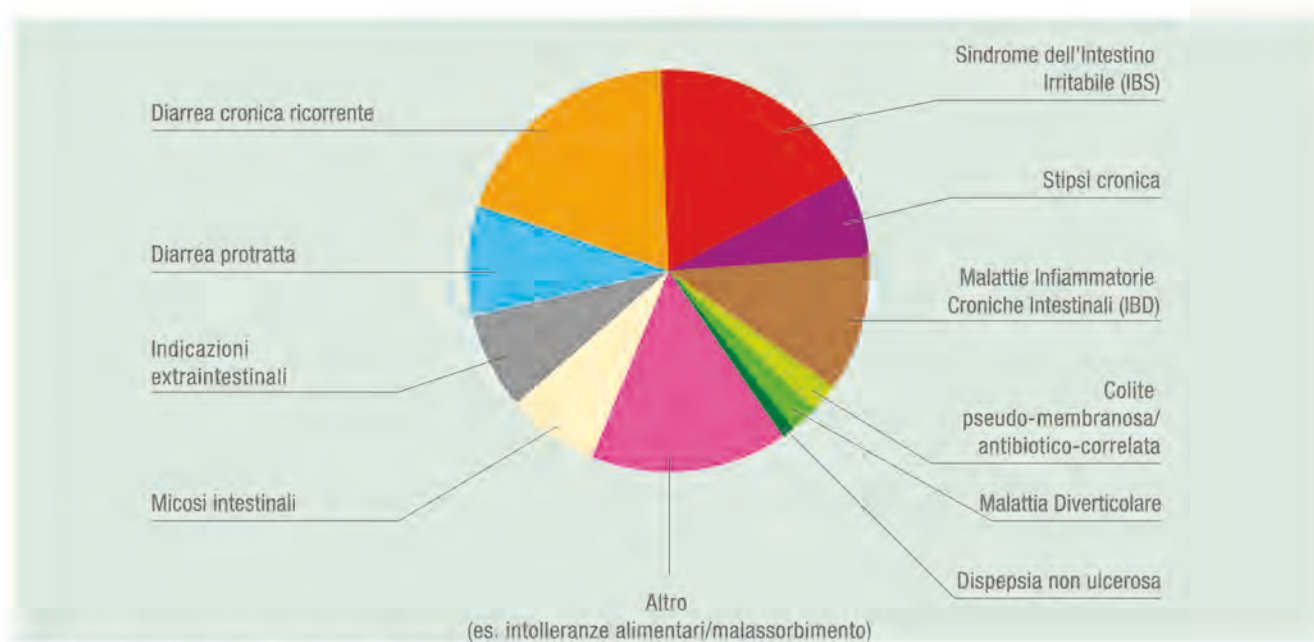


FIG.34: Esperienze terapeutiche con E. coli Nissle 1917 (Krammer 2006)⁽⁸³⁾.

Applicazioni e modo d'uso

V

Indicazioni ed esperienze medico-terapeutiche realizzate con EcN®

Secondo le attuali autorizzazioni all'immissione in commercio	Secondo gli studi clinici	Secondo i case-reports
- Colite Ulcerosa in fase di remissione - Stipsi cronica - Colonizzazione profilattica in neonati prematuri e a termine - Rinforzo del sistema immunitario postnatale in neonati prematuri e a termine - Diarrea in neonati, bambini e adulti	- Malattia di Crohn - Pauchite - Colite collagenosica - Colite pseudomembranosa/antibiotico-correlata - IBS - Malattia diverticolare - Prostatite batterica cronica - Infezioni respiratorie acute - Dermatosi/rosacea	- Cistite ricorrente - Candidosi ricorrente - Micosi del tratto gastrointestinale - Peritonite ricorrente - Dispepsia non ulcerosa - Intolleranze alimentari - Altre, es. neurodermatiti, coliti ed enteriti da radiazioni, artrite reattiva

Tabella 4

Il ceppo E. coli Nissle 1917 è sensibile agli antibiotici

Come isolato batterico dell'era pre-antibiotica, il ceppo di E. coli Nissle 1917 (EcN®) è sensibile a tutti gli antibiotici che sono prevalentemente diretti contro i batteri Gram-negativi (Tabella 5). Nell'uso concomitante di EcN con questo tipo di antibiotici, quindi, si deve tener conto di una certa riduzione di efficacia di EcN®. Tuttavia dovrebbe essere comunque iniziata una terapia protettiva con EcN® in associazione alla terapia antibiotica. EcN® non è invece sensibile agli antibiotici che sono diretti prevalentemente contro i batteri Gram-positivi (Tabella 6). Ecco perché EcN® può essere combinato con questi antibiotici senza alcuna riduzione dell'efficacia.

Sensibilità agli antibiotici di E. coli Nissle 1917

– Amikacin	– Gentamicin
– Amoxicillin/Clavulanic acid	– Imipenem
– Ampicillin	– Latamoxef
– Azlocillin	– Mezlocilin
– Cefaclor	– Nitrofurantoin
– Cefazolin	– Norfloxacin
– Cefoperazone	– Pipemidic acid
– Cefotaxime	– Piperacillin
– Ceftriaxone	– Tetracycline
– Cephalotin	– Ticarcillin
– Chloramphenicol	– Tobramycin
– Ciprofloxacin	– Trimethoprim
– Doxycycline	– Sulfamethoxazole

Tabella 5

Natural antibiotic resistance of *E. coli* strain Nissle 1917

- | | |
|-----------------|-----------------------------|
| – Cefsulodin | – Quinupristin/Dalfopristin |
| – Clindamycin | – Rifampin |
| – Erythromycin | – Teicoplanin |
| – Metronidazole | – Vancomycin |
| – Penicillin G | |

Tabella 6

Raccomandazioni posologiche

In generale, le capsule vengono somministrate come segue: per gli adolescenti e gli adulti la posologia standard è di una capsula di EcN® al dì dal 1° al 4° giorno, poi di 2 capsule di EcN® al dì. In caso di necessità, potrebbe essere ragionevole assumere fino a 4 capsule EcN® al giorno. Nei pazienti in fase di remissione della colite ulcerosa, si consiglia un trattamento continuo a lungo termine con EcN® per mantenere la remissione. La dose standard deve essere ingerita durante un pasto, di preferenza durante la cena, senza masticare le capsule e con abbondante acqua. Per evitare la comparsa iniziale di meteorismo, si consiglia di iniziare il trattamento gradualmente. La comparsa occasionale di meteorismo è da ricondurre ad una dose troppo elevata e/o ad una marcata disbiosi intestinale del paziente che lo assume. Nella maggior parte dei casi il fenomeno scompare riducendo il dosaggio o suddividendo la dose giornaliera di più capsule in diverse assunzioni, sempre durante i pasti.

Precauzioni per la conservazione

EcN® deve essere conservato in frigorifero ad una temperatura compresa tra 2 °C ed 8 °C. Un'interruzione della refrigerazione di pochi giorni (72 ore) non influenza generalmente il numero dei microrganismi vivi e vitali. In caso di esposizione prolungata al calore, i batteri possono perdere parzialmente la loro vitalità, senza che tuttavia si formino sostanze tossiche o dannose.

Forma farmaceutica di EcN®

EcN® in Italia è disponibile in confezioni da 20 capsule. Queste capsule possiedono un rivestimento enterico brevettato che ne garantisce l'apertura solo nell'ileo terminale o all'inizio del colon (FIG. 35 e 36) dove rilasciano il principio attivo. Ciò permette di veicolare il probiotico direttamente al sito d'azione, preservandone la vitalità e la carica batterica lungo il passaggio gastro-duodeno-ileale.

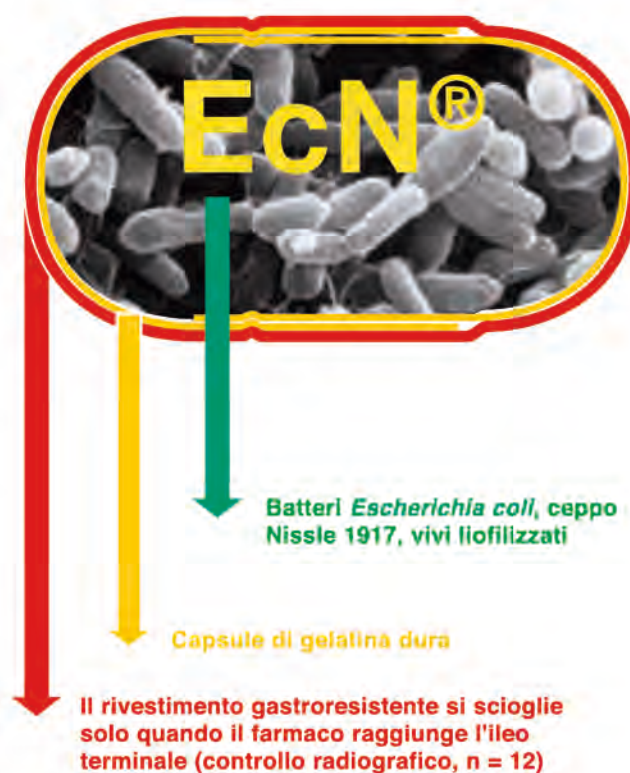


FIG.35: Rivestimento delle capsule brevettato.

Ileo prossimale:
la capsula è intatta.



Ileo terminale:
la capsula è aperta.



FIG.36: Immagine radiologica di una capsula di EcN® contenente palline di ferro.

Sicurezza del trattamento con EcN®

Un **probiotico registrato come medicinale** deve rispettare standard elevati. A differenza degli integratori alimentari, devono essere presentate prove di efficacia clinica per indicazioni mediche definite e sono richiesti documenti sull'efficacia e sui meccanismi di azione. Inoltre, deve essere garantito il rispetto di speciali criteri di qualità e sicurezza del prodotto (ad es. purezza microbiologica e conte cellulari vitali definite, nonché non patogenicità e stabilità genetica del microrganismo)⁽⁹⁾.

Il ceppo di *E. coli* Nissle 1917 è depositato nella German Collection of Microorganisms and Cell Cultures a Brunswick con la denominazione di *E. coli* DMS 6601 ed è probabilmente **il ceppo di *E. coli* ad utilizzo terapeutico meglio studiato al mondo**.

La sua apatogenicità è stata dimostrata fino a livello genetico^{(86) (87)}. I progressi compiuti nella decifrazione del genoma di EcN® hanno portato allo sviluppo di uno specifico metodo di identificazione PCR basato sul DNA, che consente una determinazione diretta di EcN® nei campioni di feci dei pazienti (FIG.37)⁽⁸⁸⁾.

Il genoma di EcN® è stato ormai completamente sequenziato⁽⁸⁹⁾. L'analisi comparativa della sequenza indica quali segmenti di DNA codificano le proprietà note del ceppo e definisce dove nel genoma sono localizzati altri geni responsabili di caratteristiche finora sconosciute. (Tabella 7)

EcN® viene impiegato in medicina da quasi 90 anni, durante i quali si è potuta constatare la buona tollerabilità della specialità medicinale probiotica, ampiamente evidenziata anche da numerosi studi clinici. Eventuali effetti collaterali si limitano alla comparsa di fenomeni di meteorismo, riconducibili all'attività metabolica dei microrganismi, generalmente scompaiono in seguito a riduzione del dosaggio.

EcN®, essendo distribuito come farmaco in diversi Paesi europei ed extraeuropei, soddisfa in modo completo tutti i requisiti di sicurezza moderni di un medicinale microbico e può quindi essere applicato anche a dosi elevate e per lunghi periodi a pazienti di qualsiasi fascia di età, perfino nei lattanti e nei neonati (prematuri e a termine) e anche durante la gravidanza e l'allattamento.

Il ceppo *E. coli* Nissle 1917 non è patogeno

I risultati di una indagine completa dimostrano che il ceppo di *E. coli* Nissle 1917 contenuto in EcN® non ha proprietà patogene. Non produce né emolisina né altre tossine, non presenta emoagglutinazione mannosio-resistente; non è siero-resistente, non possiede caratteristiche tipiche di uropatogenicità e non è invasivo. Le caratteristiche di patogenicità tipiche dei batteri patogeni di *E. coli* non sono presenti nel ceppo *E. coli* Nissle 1917. (Tabella 8)

Il Comitato centrale per la sicurezza biologica (ZKBS) ha quindi assegnato *E. coli* Nissle 1917 al gruppo di rischio 1 (microrganismi sicuri; nessun rischio per umani, animali e ambiente)

Tipizzazione di *E. coli*, ceppo Nissle 1917

Sierologica	O6 : K5 : H1
biochimica / microbiologica	«Serie multicolore» (21 attività metaboliche tipiche del ceppo) Spettro delle proteine cellulari Profilo delle proteine della membrana Struttura del lipopolisaccaride
Genetico-molecolare	Analisi del genoma/dei plasmidi, individuazione specifica mediante PCR

Tabella 7

Aspetti di sicurezza relativi a E. coli Nissle 1917

Stabilità genetica

No	• produzione di enterotossine
	• produzione di citotossine
	• produzione di emolisine
	• fattori patogeni di adesione
	• invasività
	• immunotossicità
	• resistenza al siero (no rischio di sepsi)
	• uropatogenicità
	• tossicità in animali germ-free e convenzionali

Tabella 8

Il ceppo E. coli Nissle 1917 non possiede plasmidi di resistenza agli antibiotici

In un'epoca in cui l'antibiotico resistenza è ormai una problematica sempre più frequente e preoccupante, è importante garantire che il ceppo di E. coli Nissle 1917 non possiede plasmidi di resistenza agli antibiotici. E. coli Nissle 1917 (EcN[®]) possiede due piccoli plasmidi criptici che sono stati rilevati utilizzando metodi di genetica molecolare standard. Questi plasmidi sono chiamati pMUT1 e pMUT2. Entrambi i plasmidi sono geneticamente stabili e sono non trasferibili ad altri ceppi di E. coli ⁽⁹⁰⁾.

I metodi di identificazione PCR più specifici sono stati ottenuti con primer basati su sequenze di DNA da plasmide pMUT2 e possono essere utilizzati per rilevare il ceppo di E. coli Nissle 1917 nelle feci di pazienti senza previa coltura. (Blum-Oehler 2014)

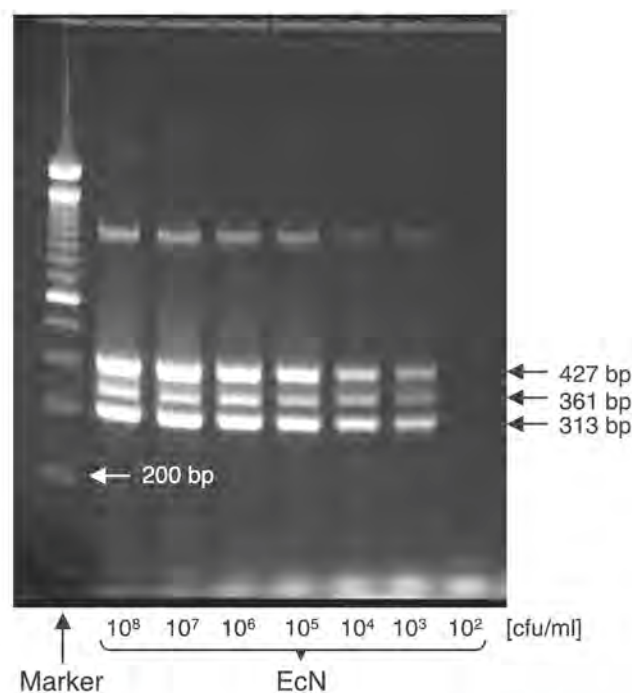


FIG.37: PCR Multiplex ceppo-specifica per l'identificazione di E. coli Nissle 1917 (EcN[®]). Utilizzando questo sistema di test, il limite di rilevazione di EcN[®] è compreso tra 10² e 10³ cellule batteriche/mL. ⁽⁹⁸⁾

Stabilità genetica e proprietà anti-cancro

E. coli Nissle 1917 non solo è geneticamente stabile, ma ha anche dimostrato di ridurre l'attività mutagenica di vari composti potenzialmente cancerogeni⁽⁹¹⁾.

Recenti studi hanno valutato l'efficacia e il meccanismo d'azione dell'attività pro-apoptotica di EcN[®] sulle cellule tumorali del colon proponendo EcN[®] come medicina complementare e suggerendo ulteriori indagini per riconvalidare il suo potenziale terapeutico nell'inibizione e nel trattamento del cancro al colon⁽⁹²⁾. Grazie alle sue caratteristiche di sicurezza e alle le sue peculiari caratteristiche batteriologiche EcN[®] viene al giorno d'oggi sempre più spesso utilizzato dai ricercatori anche nel campo delle biotecnologie ricombinanti come vettore selettivo di farmaci chemioterapici⁽⁹³⁾ ⁽⁹⁴⁾.

1. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Adak A, Khan MR.** 2019, *Cell Mol Life Sci*, p. 76(3):473-493.
2. Differential immunomodulating effects of inactivated probiotic bacteria on the allergic immune response. **Rasche C et al.** 2007, *Acta Derm Venereol*, p. 87: 305-311.
3. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Milani, Christian et al.** 2017, *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR .
4. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. **T, Escherich.** 1885, *Fortschr Med*, p. 515-522, 547-554.
5. Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehung zur Physiologie der Verdauung. **T.Escherich.** 1886, Stuttgart: Verlag Ferdinand Enke.
6. Die Entwicklung der aeroben Darmflora bei Neugeborenen. **Sonnenborn U, Stobermack HP, Proppert Y.** 1990, *Fortschr Med*, p. 108:420-424.
7. Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O 6. **Blum G et al.** 1995, *Infection*, p. 23: 234-236.
8. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. **Sonnenborn U, Schulze J.** 2009, *Microbial Ecol Health Dis*, p. 21: 122-158.
9. 125 Jahre *E. coli* – Bedeutung in Forschung und Medizin. Alfred-Nissle-Gesellschaft (Hrsg.) **Schiemann M et al.** 2010, Hagen, p. ISBN 3-9811198-4-3.
10. More than a marine propeller – the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating. **Troge A et al.** 2012, *Int J Med Microbiol*, p. 302: 304-314.
11. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. **Cario E. et al.** 2005, *Gut*, p. 54:1182-93.
12. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. **Schlee M et al.** 2007, *Infect Immun*. 75 (5): 2399-407
13. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IronP. **Patzet S I et al.** 2003, *Microbiology*, p. 149: 2557-2570.
14. Inhibition of *Salmonella typhimurium* invasion into intestinal cells by the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. **Oelschlaeger TA et al.** 2001, *Gastroenterology*, p. 120: A326.
15. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. **Boudeau J et al.** 2003, *Aliment Pharmacol Ther*, p. 18: 45-56.
16. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. **Altenhoefer A et al.** 2003, *FEMS Immunol Med Microbiol*, p. 40: 223-229.
17. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. **Leatham MP et al.** 2009, *Infect Immun*, p. 77: 2876-2886.
18. Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*. **Reissbrodt R et al.** 2009, *FEMS Microbiol Lett*, p. 290: 62-69.
19. Role of F1C fimbriae, flagella, and secreted bacterial components in the inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* al. 2014, *Infect Immun* , p. 82(5):1801-1812.
20. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. **Grose C, Scherer J, Koch D, Otto M, Taudte N, Grass G.** 2006, *Mol Microbiol*, p. 62:120-31. .
21. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, et al.** 2004, *J Bacteriol*, p. 186:5432-41.
22. A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **Grozdanov L, Zahringer U, Blum-Oehler G, Brade L, Henne A, Knirel YA, et al.** 2002, *J Bacteriol*, p. 184:5912-25.
23. A single nucleotide exchange in the wzy. **Grozdanov L et al.** 2002, *J Bacteriol*, p. 184:5912-25.
24. Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an in vitro organ bath study. **Bär F et al.** 2009, *Neurogastroenterol Motil*, p. 21: 559-e17.
25. Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits anti-inflammatory properties in colitis. **Pujo J, Petitfils C, Le Faouder P, et al.** 2021, *Gut*, p. 70:1088-1097.
26. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. **Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, et al.** 2004, *Gut*, p. 53:1617-1623.
27. Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. **Rund SA et al.** 2013, *Int J Med Microbiol*, p. 303: 1-8.
28. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. **Schlee M et al.** 2007, *Infect Immun*, p. 75(5): 2399-2407.
29. 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. **Wehkamp J et al.** 2004, *Infect Immun*, p. 72(10):5750-5758.
30. Role of F1C Fimbriae, Flagella, and Secreted Bacterial Components in the Inhibitory Effect of Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on Atypical Enteropathogenic *E. coli* Infection. **Sylvia Kleta, Marcel Nordhoff et al.** 2014, *American Society for Microbiology, Infection and Immunity*, Vol.82, p. Pages 1801-1812.
31. Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*. **Reissbrodt R, Hammes WP, Dal Bello F, Prager R, Fruth A, Hantke K, et al.** 2009, *FEMS Microbiol Lett* , p. 290:62-9.
32. In Vitro Evaluation of the Impact of the Probiotic *E. coli* Nissle 1917 on *Campylobacter jejuni*'s Invasion and Intracellular Survival in Human Colonic Cells. **Helmy YA, Kassem II, Kumar A, Rajashekar G.** 2017, *Front Microbio*.
33. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces growth, Shiga toxin expression, release and thus cytotoxicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **M Mohsinac, S Guenther et al.** 2015, *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 305, p. 20-26.
34. Colonisation of *Escherichia coli* in different gnotobiotic animal models. **Schulze J et al.** 1992, *Microb Ecol Health Dis*.
35. Colonization of Germ-Free Piglets with Commensal *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus mucosae*, and Probiotic *E. coli* Nissle 1917 and Their Interference with *Salmonella Typhimurium*. **I Splichal, SM.Donovan et al.** 2019, *Microorganisms* 7(8):273

36. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. **Leatham MP, Cohen PS. et al.** 2009, *Infect Immun*, p. 77:2876–86.
37. Establishment of *E. coli* Nissle 1917 and its interaction with *Candida albicans* in gnotobiotic rats. **Lorenz A, Schulze J.** 1996, *Microecol Ther*, p. 24:45–51.
38. Effect of Preventive Administration of a Nonpathogenic *Escherichia coli* Strain on the Colonization of the Intestine with Microbial Pathogens in Newborn Infants. **UB Lodinová-Žádníková, RA Sonnenborn.** 1997, *Biol Neonate*, p. 71:224–232.
39. Therapy with *E. coli* Nissle reduces concentrations of mucosa associated colonic flora in patients with ulcerative colitis. **Swidsinski A, Swidsinski S, Godzun A, Orthner M, Lochs H.** 2000, *Gastroenterology*, p. 118:A1138.
40. *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate gut microbiota composition in ulcerative colitis patients. **Scaldaferri F et al.** 2017, poster P115, ECCO Congress.
41. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. **Cohen, Tyrrell Conway and Paul S.** 2015, *Microbiol Spectr*. 3(3):10.1128
42. Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. **Jingjing Quan MS, Xi Li PhD, Yan Chen PhD et al.** 2017, *The Lancet Infectious Diseases*, p. 400–410.
43. Probiotic *Escherichia coli* inhibits biofilm formation of pathogenic *E. coli* via extracellular activity of DegP. **Kuili Fang, Xing Jin & Seok Hoon Hong.** 2018, *Scientific Reports*, 8(1):10.1038
44. Leaky gut and autoimmune diseases. **Fasano A.** 2012, *Clinical reviews in allergy & immunology*, p. 42(1):71–78.
45. Association of Pelvic Inflammatory Disease with Risk of Endometriosis: A Nationwide Cohort Study Involving 141,460 Individuals. **Tai FW et al.** 2018, *J of Clinical Medicine*, p. 7, 379; doi:10.3390.
46. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. **Zyrek AA et al.** 2007, *Cell Microbiol*, p. 9:804–816.
47. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. **Ukena SN et al.** 2007, *PLOS ONE*, 2(12):e1308,1–9.
48. DNA-Microarray-based comparison of cellular responses in polarized T84 epithelial cells triggered by probiotics: *E. coli* Nissle 1917 (EcN) and *Lactobacillus acidophilus* PZ1041. **Cichon C et al.** 2004, *Gastroenterology*, p. 126(4): A-578.
49. Extracellular vesicles and soluble factors secreted by *Escherichia coli* Nissle 1917 and ECOR63 protect against enteropathogenic *E. coli*-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. **Carina-Shianya Alvarez, Rosa Giménez et al.** 2019, *BMC Microbiology*, p. 19:166.
50. Activation of immune and defense responses in the intestinal mucosa by Outer membrane vesicles of commensal and probiotic *Escherichia coli* Strains. **Maria José Fabrega et al.** 2016, *Front. Microbiol*, 7:705
51. Probiotic Properties of *Escherichia coli* Nissle in Human Intestinal Organoids. **Suman Pradhan, a Alison Ann Weiss.** 2020, *American Society for Microbiology*, 11(4):10.1128
52. *Escherichia coli* Nissle 1917 restores epithelial permeability alterations induced by irritable bowel syndrome mediators. **M. R. Barbaro, D. Fuschi, C. Cremon, G. Barbara.** 2018, *Neurogastro-*
- alterations induced by irritable bowel syndrome mediators.* **M. R. Barbaro, D. Fuschi, C. Cremon, G. Barbara.** 2018, *Neurogastroenterol & Motility*, doi 10.1111
53. Receptor structure for F1C Fimbriae of Uropathogenic *Escherichia coli*. **J Hacker et al.** 2000, *Infection and immunity*.
54. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. **Schultz M et al.** 2004, *Clin Diagn Lab Immunol*, p.11(2): 372–378.
55. Nonpathogenic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 inhibits Signal Transduction in Intestinal Epithelial. **Nobuhiko Kamada et al.** 2008, *Am Soc Microbiol*, 76(1), doi:10.1128.
56. probiotics regulate the expression of COX-2 in intestinal epithelial cells, **JM Otte et al.** 2009, *Nutr and Cancer*, 61(1) 103–113.
57. *Lactobacilli*, *bifidobacteria* and *E. coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. **Ulf Helwig, Karen M Lammers, Fernando Rizzello et al.** 2006, *World J Gastroenterol*, 12(37) 5978–986
58. Association of germ-free piglets with two non-pathogenic *E. coli* strains: Nissle 1917 stimulates the immune system more than O86 strain. **Cukrowska B, et al.** 1998, *J Mol Med*, p. 76:B-9.
59. The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. **Natividad Garrido-Mesa, Pilar Utrilla et al.** 2011, *Biochemical Pharmacology*.
60. The administration of *e. coli* Nissle 1917 ameliorates development of DSS-induced colitis in mice. **J Garrido-Mesa, P Utrilla et al.** 2018, *Front Pharmacol*, 9:468.
61. Local and serum antibody response in full-term and premature infants after artificial colonization of the intestine with *E. coli* strain Nissle 1917 (Mutaflor®). **R. Lodinová-Žádníková, H. Tlaskalová-Hogenová, U. Sonnenborn.** 1992, *Pediatric allergy and immunology*, 3: 43–48
62. Specific Proliferative and Antibody Responses of Premature Infants to Intestinal Colonization with Nonpathogenic Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917. **B. Cukrowska et al.** 2002, *Scandinavian journal of immunology*, vol. 55, p.204–209
63. Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an in vitro organ bath study. **Bär F et al.** 2009, *Neurogastroenterol Motil*, p. 21: 559–e17.
64. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. **Kruis W et al.** 1997, *Aliment Pharmacol Ther*, p. 11: 853–858.
65. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. **Rembacken BJ et al.** 1999, *Lancet*, p. 354: 635–639.
66. Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). **Matthes H et al.** 2010, *BMC Complement Altern Med*, p. 10:13.
67. Role and mechanisms of action of *escherichia coli* nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update. **Franco Scaldaferri et al.** 2016, *World Journal of Gastroenterology*.
68. *Escherichia coli* Nissle 1917 in Ulcerative Colitis Treatment: Systematic Review and Meta-analysis. **Giuseppe Losurdo et al.** 2015, *J Gastrointest Liver Dis*.
69. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management.

Harbord Met et al. 2017, European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]. J Crohns Colitis.

70. Crohn's Disease and E. coli. **HA, Malchow.** 1997, J Clin Gastroenterol., 25:653-658.

71. The effect of non-pathogenic Escherichia coli in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. **Fric P et al.** 2003, Eur J Gastroenterol Hepatol., 15:313-315.

72. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. **Ford AC et al.** 2018, Aliment Pharmacol Ther., 48(10):1044-1060.

73. Post-infectious irritable bowel syndrome. **Spiller R, Campbell E.** 2006, Curr Opin Gastroenterol., 22:13-7.

74. Effect of E. coli Nissle 1917 on post-inflammatory visceral sensory function in a rat model. **Liebrechts T, Adam B, Bertel A, Jones S, Schulze J, et al.** 2005, Neurogastroenterol Motil., 17:410-14

75. Reizdarm-Patienten mit Meteorismus als dominantem Symptom profitieren von einer Therapie mit E. coli Nissle 1917 – Ergebnisse einer Pilotstudie. **Keller J et al.** 2010, Z Gastroenterol., 48:955.

76. A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. **Kruis W et al.** 2012, Int J Colorectal Dis, p. 27(4):467-474.

77. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. **Pérez- Berezo T et al.** 2017, Nat Commun., 8(1):1314.

78. High frequency of chronic bacterial and non-inflammatory prostatitis in infertile patients with prostatitis syndrome plus irritable bowel syndrome. **Vicari E et al.** 2011, Vol. PLoS ONE 6(4):e18647.

79. Local and Systemic Inflammation in Localized, Provoked Vestibulodynia: A Systematic Review. **Chalmers KJ, Madden VJ, Hutchinson MR, Moseley GL.** 2016, Obstet Gynecol., p. 128(2):337-47.

80. Mast cells in chronic inflammation, pelvic pain and depression in women. **Graziottin A, Skaper SD, Fusco M.** 2014, Gynecol Endocrinol., 30(7):472-7

81. Escherichia coli Nissle 1917 as adjuvant therapy in patients with chronic bacterial prostatitis: a non-blinded, randomized, controlled trial. **Manfredi C, Calace FP, Fusco F, Quattrone C, Giordano D, Crocetto F, Creta M, De Sio M, Arcaniolo D.** 2021, World J Urology., 39(12):4373-4379.

82. Prophylaxis of acute respiratory infections via improving the immune system in late preterm newborns with E. coli strain Nissle 1917: a controlled pilot trial. **Aryayev, M.L., Senkivska et al.** 2018, Pilot Feasibility Stud.

83. Probiotische Arzneimitteltherapie mit E. coli Stamm Nissle1917 (EcN): Ergebnisse einer prospektiven Datenerhebung mit 3807 Patienten. **Krammer H et al.** 2006, Z Gastroenterol., 44:651-656.

84. Intestinal-borne dermatoses significantly improved by oral application of Escherichia coli Nissle 1917. **Elina Manzhali, Daniel Hornuss, and Wolfgang Stremmel.** 2016, World J Gastroenterol., 22(23):5415-5421.

85. Prevention of recurrence of enteric peritonitis in peritoneal dialysis with Escherichia coli Nissle 1917: A case-series study. **G Argentino, S Borrelli et al.** 2021, Clinical Nephrology.

86. A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of Escherichia coli strain Nissle 1917. **Grozdanov L et al.** 2002, J Bacteriol, p. 184: 5912-5925.

87. Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic Escherichia coli Strain Nissle 1917. **Grozdanov L et al.** 2004, J Bacteriol, p. 186:5432-5441.

88. Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 in fecal samples. **Blum-Oehler G et al.** 2003, Res Microbiol, p. 154: 59-66.

89. Complete genome sequence of the Gram-negative probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. **Reister M et al.** 2014, J Biotechnol, p. 187:106-107.

90. Strain Characterization: Escherichia coli Nissle 1917. **U Sonnenborn** 2013.

91. Antimutagenic activity of the probiotic E. coli strain Nissle 1917. **Sonnenborn U et al.** 2009, J Crohns Colitis, 3:5136.

92. Anti-cancer properties of Escherichia coli Nissle 1917 against HT-29 colon cancer cells through regulation of Bax/Bcl-xL and AKT/PTEN signaling pathways. **Alizadeh S, Esmaeili A, Omid Y.** 2020, Iran J Basic Med Sci, 23(7):886-893.

93. Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention. **Ho CL et al.** 2018, Nat Biomed Eng., 2(1):27-37.

94. E. coli Nissle 1917-Derived Minicells for Targeted Delivery of Chemotherapeutic Drug to Hypoxic Regions for Cancer Therapy. .

Zhang Y, Ji W, He L, Chen Y, Ding X, Sun Y, Hu S, Yang H, Huang W, Zhang Y, Liu F, Xia L. 2018, Theranostics, 8(6):1690-1705.

Ulteriori letture:

In aggiunta alle referenze menzionate esistono altre numerose pubblicazioni, specialmente di trial pre-clinici. Se ne vuoi sapere di più su un argomento in particolare, non esitare a contattarci:

cadigroup@cadigroup.it



ECN_EXP_001_2022 Informazioni riservate ai signori medici, farmacisti e operatori del settore.



Ca.Di.Group SpA - Via Salernò 58 -60, 00124 Roma - Tel. +39 06 50930490 - Fax +39 06 87728777
www.cadigroup.eu - cadigroup@cadigroup.it