

Profilaktyczne stosowanie probiotyków *Saccharomyces boulardii* w zapobieganiu biegunce związanej z antybiotykoterapią: Jednośrodkowe szpitalne badanie kliniczno-kontrolne w Serbii

NIKOLA PANIC⁽¹⁾, MAJA TUFEGDZIC^(1,2), STEFANIA BOCCIA⁽³⁾, MARIJA STOKIC⁽¹⁾, MILUTIN BULAJIC^(1,4)

ABSTRACT

KONTEKST BADAŃ: Biegunka związana z antybiotykoterapią (AAD) rozwija się na skutek zniszczenia prawidłowej flory bakteryjnej jelit. Przeprowadziliśmy badanie kliniczno-kontrolne, aby ocenić, czy profilaktyczne podawanie *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) zapobiega występowaniu AAD u dorosłych hospitalizowanych pacjentów.

METODY: Jednośrodkowe badanie kliniczno-kontrolne zostało przeprowadzone w Klinice Uniwersyteckiej „Dr Dragisa Misovic-Dedinje” w Belgradzie, w Serbii. Dokumentacja szpitalna została zbadana w celu identyfikacji wszystkich pacjentów, u których rozwinęła się AAD w okresie od 1 stycznia 2010 – 31 sierpnia 2015. Dla każdej osoby zakwalifikowanej do grupy badawczej wybrano losowo osobę z grupy kontrolnej, odpowiadającą wiekiem i płcią, wśród pacjentów hospitalizowanych w tym samym czasie na tym samym oddziale, którzy otrzymywali antybiotyki i u których nie rozwinęła się AAD. Zarówno w grupie badawczej, jak i kontrolnej zebrano dane demograficzne, wywiad medyczny, informacje dotyczące wskazań do antybiotykoterapii, stosowanych antybiotyków i profilaktycznego przyjmowania probiotyków *S. boulardii*. Związek pomiędzy wystąpieniem AAD a domniemanymi czynnikami ryzyka zmierzono przy użyciu współczynnika szans (OR) i przedziału ufności (CI) na poziomie 95% uzyskanych z analizy regresji logistycznej.

WYNIKI: W badaniu uczestniczyła grupa badawcza składająca się z 59 osób i grupa kontrolna składająca się również z 59 osób. Większość osób, u których wystąpiła AAD była w podeszłym wieku (średnia wieku 78,05), a prawie połowa osób (49,15%) była hospitalizowana na oddziale geriatrycznym. Najczęściej stosowaną u pacjentów grupą antybiotyków były cefalosporyny III generacji (50,85%), a następnie fluorochinolony (28,81%) i trimetoprim z sulfametoksazolem (20,34%). Znacznie więcej osób w grupie badawczej niż w grupie kontrolnej leczono karbapenemami (odpowiednio 16,95% w porównaniu z 5,08%, $p = 0,04$). Znacznie mniej osób z grupy badawczej przyjmowało profilaktyczne probiotyki *S. boulardii* (18,64% w porównaniu z 42,37% $p = 0,005$). Stwierdziliśmy, że profilaktyczne stosowanie *S. boulardii* zapobiega rozwojowi AAD. Do wniosku takiego doszliśmy zarówno na podstawie analizy jednoczynnikowej (OR: 0,31, 95% CI: 0,14-0,72), jak i wieloczynnikowej (OR: 0,36, 95% CI: 0,14-0,80). Stosowanie karbapenemów okazało się istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju AAD w analizie jednoczynnikowej (OR: 3,81, 95% CI: 0,99-14,64) i wieloczynnikowej (OR: 3,82, 0,91-16,08) (Tabela 3).

WNIOSEK: Profilaktyczne przyjmowanie probiotyków zawierających *Saccharomyces boulardii* zapobiega wystąpieniu biegunki związanej z antybiotykoterapią wśród hospitalizowanych pacjentów.

Słowa kluczowe: biegunka związana z antybiotykoterapią, zakażenie *Clostridium difficile*, probiotyki, profilaktyka, *Saccharomyces boulardii*

(1) Uniwersyteckie Centrum Kliniczno-Szpitalne „Dr Dragisa Misovic - Dedinje”, Belgrad, Serbia

(2) Szpital Ogólny „Euromedic”, Belgrad, Serbia

(3) Instytut Zdrowia Publicznego, Dział Higieny, Uniwersytet Katolicki, Largo Agostino Gemelli 8, Rzym, Włochy

(4) Katedra Gastroenterologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny „Santa Maria della Misericordia”, Udine, Włochy

AUTOR DO KORESPONDENCJI: Nikola Panic - Oddział Endoskopii Przehłykowej, Uniwersyteckie Centrum Kliniczno-Szpitalne „Dr Dragisa Misovic-Dedinje”, Milana Tepica 1, 11000 Belgrad, Serbia Tel: 381-64-3509133; Faks: 381-11-3672025; E-mail: nikola.panicmail@gmail.com

DOI: 10,2427/11607

Zaakceptowano 14 grudnia 2015 r

WPROWADZENIE

Biegunka związana z antybiotykoterapią (AAD) obejmuje wszelkie niewyjaśnione przypadki biegunki związane ze stosowaniem antybiotyków, w tym zakażenie wywołane przez *Clostridium difficile* (CDI). Coraz powszechniejsze zastosowanie antybiotyków prowadzi do częstszego występowania AAD. Obecnie AAD pojawia się u 5-35% pacjentów leczonych antybiotykami [1]. Od przypadków łagodnych po ciężkie - niektóre zagrażające życiu. Najcięższe przypadki, takie jak sepsa i wstrząs septyczny, ostre rozdęcie okrężnicy wymagające kolektomii i śmierć są głównie związane z CDI [2]. Dlatego największe znaczenie ma podejmowanie działań w celu ograniczenia wewnątrzszpitalnego zakażenia CDI [3].

AAD rozwija się na skutek zniszczenia prawidłowej flory bakteryjnej jelit. Probiotyki to żywe organizmy, które poprawiają równowagę mikrobiologiczną gospodarza, przeciwdziałają zaburzeniom flory jelitowej i zmniejszają ryzyko kolonizacji przez bakterie chorobotwórcze [4]. Utrzymują lub przywracają mikroekologię jelit poprzez rywalizację o receptory, rywalizując o składniki odżywcze, hamowanie przylegania nabłonka i błony śluzowej patogenów, obniżanie pH w okrężnicy sprzyjające wzrostowi gatunków dobroczynnych, stymulowanie odporności lub wytwarzanie substancji przeciwdrobnoustrojowych [5, 6]. Ponieważ probiotyki zmniejszają częstotliwość występowania niepożądanych zdarzeń [7], są relatywnie tanie i powszechnie dostępne, rośnie zainteresowanie ich stosowaniem w zapobieganiu AAD.

Do probiotyków należą zarówno bakterie, jak i drożdże. Istnieją doniesienia, że drożdże *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) wykazują w jelitach kilka potencjalnie korzystnych właściwości, w tym bezpośrednio hamują toksyny wytwarzane przez *C. difficile* [8]. Ponieważ poważne powikłania AAD są głównie związane z CDI, *S. boulardii* mogą okazać się przydatne w pierwotnej profilaktyce AAD, szczególnie wśród pacjentów przebywających na oddziałach szpitalnych.

Przeprowadziliśmy badanie kliniczno-kontrolne, aby ocenić, czy profilaktyczne podawanie *S. boulardii* zapobiega występowaniu AAD u dorosłych hospitalizowanych pacjentów.

METODY

Jednośrodkowe badanie kliniczno-kontrolne zostało przeprowadzone w Klinice Uniwersyteckiej „Dr Dragisa Misovic-Dedinje”, w Belgradzie (Serbia) w okresie od października do listopada 2015 r. Dokumentacja szpitalna została zbadana w celu identyfikacji wszystkich pacjentów, u których rozwinęła się AAD w okresie od 1 stycznia 2010 – 31 sierpnia 2015. Do badania włączeni zostali dorośli pacjenci w wieku > 18 lat, którzy byli leczeni doustnymi lub domięśniowymi antybiotykami, w efekcie czego rozwinęła się u nich AAD. AAD zdefiniowano jako biegunkę (≥ 3 luźne stolce/dzień przez co najmniej 2 dni lub ≥ 5 luźnych stolców/48 godzin) po

wewnątrzszpitalnym podawaniu antybiotyków. Z badania wykluczono pacjentów, u których biegunka wiązała się z chorobą podstawową (ostre zapalenie jelit, choroba zapalna jelit, popromienne zapalenie jelit, niedokrwiennie zapalenie jelita grubego), osoby u których zdiagnozowano zapalenie okrężnicy wywołane przez *C. difficile* w ciągu ostatnich 3 miesięcy oraz osoby, u których inne choroby leczone były środkami przeciwbiegunkowymi, przeciwskurczowymi lub zmniejszającymi ruchliwość jelit.

Dla każdej osoby zakwalifikowanej do grupy badawczej wybrano losowo osobę z grupy kontrolnej, odpowiadającą wiekiem i płcią, wśród pacjentów hospitalizowanych w tym samym czasie na tym samym oddziale, którzy otrzymywali antybiotyki i u których nie rozwinęła się AAD. W przypadku zarówno grupy badawczej, jak i kontrolnej zebrano dane dotyczące wieku, płci, oddziału, na którym pacjent był hospitalizowany, wywiadu medycznego, wskazań do antybiotykoterapii, stosowanych antybiotyków i profilaktycznego przyjmowania probiotyków *S. boulardii*. Profilaktyczne stosowanie *S. boulardii* zdefiniowano jako podawanie co najmniej 5 miliardów liofilizowanych komórek *S. boulardii* jeden raz dziennie (Bulardi plus 250 mg, Abela Pharm d.o.o. Belgrad), rozpoczęte jednocześnie z podawaniem antybiotyków i kontynuowane co najmniej dwa tygodnie po zakończeniu antybiotykoterapii.

Analiza statystyczna

Analizę opisową z wykorzystaniem odchyłeń standardowych proporcji i średnich \pm , została przeprowadzona odpowiednio dla zmiennych jakościowych i ilościowych. Różnice między grupami obliczono, stosując odpowiednio testy chi-kwadrat, test z dwiema grupami lub testy dokładne Fishera.

Związek pomiędzy wystąpieniem AAD a domniemanymi czynnikami ryzyka zmierzono przy użyciu współczynnika szans (OR) i przedziału ufności (CI) na poziomie 95% uzyskanych z analizy regresji logistycznej. Ostateczny zestaw zmiennych do analizy wielowymiarowej obejmował istotne zmienne z analizy jednowymiarowej, a także zmienne istotne klinicznie. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Stata (StataCorp. 2013. Oprogramowanie statystyczne Stata: Wersja 13. College Station, TX: StataCorp LP).

WYNIKI

W badaniu uczestniczyła grupa badawcza składająca się z 59 osób i grupa kontrolna składająca się również z 59 osób. Cechy demograficzne i wywiad medyczny osób należących do grupy kontrolnej i grupy badawczej przedstawiono w Tabeli 1. Większość osób, u których wystąpiła AAD była w podeszłym wieku (średnia wieku 78,05), a prawie połowa osób (49,15%) była hospitalizowana na oddziale geriatrycznym. (Tabela 1). Tabela 2 zawiera informacje dotyczące stosowania antybiotyków i profilaktycznych probiotyków *S. boulardii* u osób należących do grupy kontrolnej i grupy badawczej włączonych do badania. Większość osób z grupy badawczej było leczonych antybiotykami z powodu infekcji dróg moczowych (47,46%), infekcji dróg

oddechowych, w tym zapalenia płuc (28,81%) i sepsy (22,03%) (Tabela 2). Najczęściej stosowanymi antybiotykami u pacjentów z grupy badawczej były cefalosporyny III generacji (50,85%), nieco rzadziej fluorochinolony (28,81%) i trimetoprim z sulfametoksazolem (20,34%) (Tabela 2). Chociaż większość pacjentów, u których rozwinęła się AAD leczono tylko jedną klasą antybiotyków (61,02%), znaczącą liczbę leczono dwoma (27,12%), trzema (6,78%), a nawet czterema (5,08%) różnymi klasami (Tabela 2). Znacznie więcej osób z grupy badawczej niż z grupy kontrolnej leczono karbapenemami (odpowiednio 16,95% w porównaniu z 5,08%, $p = 0,04$) (Tabela 2). Jednak znacznie mniej osób z grupy badawczej otrzymała profilaktycznie probiotyki *S. boulardii* w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej, u których nie rozwinęła się AAD (odpowiednio 18,64% w porównaniu z 42,37%, $p = 0,005$).

TABELA 1

DANE DEMOGRAFICZNE I WYWIAD MEDYCZNY 59 HOSPITALIZOWANYCH OSÓB Z GRUPY BADAWCZEJ, U KTÓRYCH ROZWINĘŁA SIĘ BIEGUNKA ZWIĄZANA Z ANTYBIOTYKOTERAPIĄ (AAD) I 59 OSÓB Z GRUPY KONTROLNEJ WŁĄCZONYCH DO BADANIA

	OSOBY Z GRUPY BADAWCZEJ	GRUPA KONTROLNA	
Wiek	78,05±9,16	78,45±9,80	p=0,83
PLEĆ			
Kobieta	31 (52,54%)	32 (54,24%)	p=0,85
Mężczyzna	28 (47,46%)	27 (45,76%)	
ODDZIAŁ SZPITALNY			
Geriatrya	29 (49,15%)	30 (50,85%)	p=1,00
Kardiologia	8 (13,56%)	8 (13,56%)	
Endokrynologia	7 (11,86%)	7 (11,86%)	
Pulmonologia	6 (10,17%)	6 (10,17%)	
Gastroenterologia	5 (8,47%)	4 (6,78%)	
Hematologia	4 (6,78%)	4 (6,78%)	
WYWIAD MEDYCZNY			
Nadciśnienie tętnicze	31 (50,85%)	29 (49,15%)	p=0,71
Migotanie przedsionków	15 (25,42%)	14 (23,73%)	p=0,83
Dusznicza bolesna	13 (22,03%)	16 (27,12%)	p=0,52
Niewydolność serca	18 (30,51%)	22 (37,29%)	p=0,44
Inne choroby sercowo-naczyniowe	17 (28,81%)	25 (42,37%)	p=0,12
Anemia	22 (37,93%)	26 (44,07%)	p=0,50
Cukrzyca typu 1	9 (15,25%)	7 (11,86%)	p=0,59
Cukrzyca typu 2	13 (22,03%)	13 (22,03%)	p=1,00
Przewlekła obturacyjna choroba płuc	9 (15,52%)	12 (20,69%)	p=0,47
Przewlekła niewydolność nerek	21 (35,59%)	19 (32,20%)	p=0,70
Nowotwór złośliwy	6 (10,17%)	7 (11,86%)	p=0,77

*AAD: biegunka związana z antybiotykoterapią

TABELA 2

STOSOWANIE ANTYBIOTYKÓW I PROFILAKTYCZNYCH SACCHAROMYCES BOULARDII (S. BOULARDI†) U 59 HOSPITALIZOWANYCH OSÓB Z GRUPY BADAWCZEJ, U KTÓRYCH ROZWIĘŁA SIĘ BIEGUNKA ZWIĄZANA Z ANTYBIOTYKOTERAPIĄ (AAD) I 59 OSÓB Z GRUPY KONTROLNEJ WŁĄCZONYCH DO BADANIA

	OSOBY Z GRUPY BADAWCZEJ	GRUPA KONTROLNA	
WSKAZANIA DO ZASTOSOWANIA ANTYBIOTYKOTERAPII			
Zakażenie dróg moczowych	28 (47,46%)	30 (50,85%)	p=0,75
Zakażenie dróg oddechowych	17 (28,81%)	15 (25,42%)	
Sepsa	13 (22,03%)	14 (23,73%)	
Inne	1 (1,59%)	0 (0,0%)	
KLASA ANTYBIOTYKÓW			
Cefalosporyny III generacji	30 (50,85%)	38 (64,41%)	p=0,14
Fluorochinolony	17 (28,81%)	19 (32,76%)	p=0,65
Trimetoprim z sulfametoksazolem	12 (20,34%)	7 (11,86%)	p=0,21
Aminoglikozydy	11 (18,64%)	12 (18,64%)	p=1,00
Karbapenemy	10 (16,95%)	3 (5,08%)	p=0,04
Penicylina	7 (11,86%)	5 (8,47%)	p=0,54
Glicylcyklina	3 (5,08%)	4 (6,78%)	p=0,70
Makrolidy	2 (3,39%)	3 (5,08%)	p=0,65
Cefalosporyny II generacji	0 (0,0%)	1 (1,59%)	p=0,31
KLASY PODAWANYCH ANTYBIOTYKÓW			
Jedna	36 (61,02%)	37 (62,71%)	p=0,95
Dwie	16 (27,12)	15 (25,42%)	
Trzy	4 (6,78%)	5 (8,47%)	
Cztery	3 (5,08%)	2 (3,39%)	
PROFILAKTYCZNE PROBIOTYKI (S.BOULARDI†)			
Tak	11 (18,64%)	25 (42,37%)	p=0,005
Nie	48 (81,36%)	34 (57,63%)	

*AAD: biegunka związana z antybiotykoterapią; † S.Boulardii: Saccharomyces boulardii

Stwierdziliśmy, że profilaktyczne stosowanie probiotyków *S. boulardii* zapobiega rozwojowi AAD. Wniosek taki wysnuliśmy zarówno na podstawie analizy jednoczynnikowej [współczynnik szans (OR): 0,31, 95% przedział ufności (CI): 0,14-0,72], jak i wieloczynnikowej (OR: 0,36, 95% CI: 0,14-0,80) (Tabela 3). Stosowanie karbapenemów okazało się istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju AAD w analizie jednoczynnikowej (OR: 3,81, 95% CI: 0,99-14,64) i wieloczynnikowej (OR: 3,82, 0,91-16,08) (Tabela 3).

DYSKUSJA

Stwierdzamy, że profilaktyczne stosowanie probiotyków zawierających *S. boulardii* zapobiega AAD wśród hospitalizowanych pacjentów. Stosowanie karbapenemów wydaje się być czynnikiem ryzyka rozwoju AAD.

Sugerowano, że profilaktyczna rola *S. boulardii* w zapobieganiu AAD i CDI może wynikać z różnych mechanizmów [8, 9]. W świetle jelita *S. boulardii* wykazują działanie troficzne i inicjując procesy przeciwwzapalne błony śluzowej [10-12]. Zakłócają działanie toksycznych patogenów, wspierają fizjologię komórkową, zapobiegają przyleganiu patogenów, wspomagają prawidłową florę bakteryjną i pomagają przywrócić prawidłowy poziom krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [8]. Wykazują działania antytoksyczne poprzez bezpośrednie niszczenie toksyn patogennych, blokowanie miejsc receptorowych toksyny patogenne [13] lub pełnienie roli receptora wabiącego toksyny patogenne [14].

TABELA 3

CZYNNIKI RYZYKA ROZWOJU BIEGUNKI ZWIĄZANEJ Z ANTYBIOTYKOTERAPIĄ (AAD) NA PODSTAWIE ANALIZY JEDNO- I WIELOCZYNNIKOWEJ

	OR	CI 95%	ADJ OR*	CI 95%
Zastosowanie probiotyków (<i>S. Boulardii</i>)†	0,31	0,14-0,72	0,36	0,14-0,80
Karbapenemy	3,81	0,99-14,64	3,82	0,91-16,08

† *S. Boulardii*: *Saccharomyces boulardii*

* skorygowane względem wieku, płci, wskazania do stosowania antybiotyków

OR = współczynnik szans; CI = przedział ufności

Istnieją doniesienia, że *S. boulardii* stymulują wewnątrzjelitową odpowiedź immunologiczną immunoglobuliny A odpowiedź na toksynę *C. difficile* w modelach myszy [15]. Ponadto wytwarzają proteazę serynową 54 kDa, która dezaktywuje receptor dla toksyny A i *C. difficile* i rozkłada toksyny A i B *C. difficile* [16]. W końcu zaś *S. boulardii* mogą łagodzić zapalenie błony śluzowej [17], przywracać szlaki transportu płynów [18] i stymulować wytwarzanie białek i energii [19] w enterocytach. Ze względu na właściwości *S. boulardii*, w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie ich profilaktycznym stosowaniem w przypadku AAD i CDI. Niedawno przeprowadzona metaanaliza z randomizowanych badań kontrolowanych wykazała, że *S. boulardii* skutecznie zmniejszają ryzyko wystąpienia AAD u dzieci i dorosłych o 18,7% do 8,5% w porównaniu do braku leczenia lub placebo [20]. Metaanaliza obejmowała 21 badań z całego świata. Jednak żadne z tych badań nie zostało przeprowadzone w regionie Europy Południowo-Wschodniej, w tym w Serbii. Niedawno przeprowadzone badania wykazały, że CDI jest najpoważniejszą przyczyną biegunki szpitalnej w Serbii, rozwijającej się głównie u starszych hospitalizowanych pacjentów z chorobami współistniejącymi [21]. Ponadto stwierdzono, że w szpitalach posiadających oddziały intensywnej opieki medycznej w Serbii dominuje CDI PCR-rybotyp 027 [22]. Profilaktyka jest o tyle ważna, że rybotyp 027 powoduje cięższe formy CDI, jest bardziej odporny na standardowe leczenie i w jego przypadku bardziej prawdopodobny jest nawrót choroby [23]. Niemniej nie przeprowadzono dotychczas w Serbii żadnych badań dotyczących tego ważnego problemu.

Dlatego nasze wyniki sugerują, że bardzo ważne jest profilaktyczne stosowanie probiotyków *S. boulardii* w zapobieganiu AAD wśród pacjentów przebywających w serbskich szpitalach.

Istnieją wcześniejsze doniesienia, że karbapenemy zwiększają ryzyko wystąpienia AAD, a zwłaszcza związanej z CDI [24-26]. Jako że karbapenemy są antybiotykami β -laktamowymi o najszerszym spektrum działania, należy założyć, że mają one silną skłonność do zakłócania mikroflory jelitowej.

Nasze badanie napotkało na kilka ograniczeń. Przede wszystkim nie byliśmy w stanie przeprowadzić RCT, w związku z tym musieliśmy polegać na wynikach studium przypadku. Po drugie przeprowadziliśmy badanie jednoosrodkowe, dlatego nasza próbka była ograniczona. Niemniej nasze wyniki są ważne, ponieważ jest to pierwsze badanie w Serbii dotyczące problemu profilaktycznego stosowania probiotyków w zapobieganiu AAD.

WNIOSEK

Profilaktyczne przyjmowanie probiotyków zawierających *Saccharomyces boulardii* zapobiega wystąpieniu biegunki związanej z antybiotykoterapią wśród hospitalizowanych pacjentów. Zastosowanie karbapenemów stanowi czynnik ryzyka rozwoju biegunki związanej z antybiotykoterapią.

Źródła.

- [1] McFarland LV. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future microbiology*. 2008;3(5):563-78.
- [2] Hurley BW, Nguyen CC. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Archives of internal medicine*. 2002;162(19):2177-84.
- [3] Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, et al. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14 Suppl 5:2-20.
- [4] Sullivan A, Nord CE. Probiotics in human infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2002;50(5):625-7.
- [5] Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*. 2000;130(2S Suppl):396s-402s.

- [6] Cremonini F, Di Caro S, Santarelli L, et al. Probiotics in antibiotic-associated diarrhoea. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2002;34 Suppl 2:S78-80.
- [7] Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2012;307(18):1959-69.
- [8] McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(18):2202-22.
- [9] Kelesidis T, Pothoulakis C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 2012;5(2):111-25.
- [10] Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology*. 2007;23(6):679-92.
- [11] Pothoulakis C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2009;30(8):826-33.
- [12] Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(2):300-10.
- [13] Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N, O'Keane CJ, Castagliuolo I, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology*. 1993;104(4):1108-15.
- [14] Brandao RL, Castro IM, Bambirra EA, et al. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(2):564-8.
- [15] Qamar A, Aboudola S, Warny M, et al. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infection and immunity*. 2001;69(4):2762-5.
- [16] Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and immunity*. 1999;67(1):302-7.
- [17] Sezer A, Usta U, Cicin I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2009;26(3):350-7.
- [18] Schroeder B, Winckler C, Failing K, Breves G. Studies on the time course of the effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on electrolyte transport in pig jejunum. *Digestive diseases and sciences*. 2004;49(7-8):1311-7.
- [19] Buts JP, Stilmant C, Bernasconi P, Neirincx C, De Keyser N. Characterization of alpha,alpha-trehalase released in the intestinal lumen by the probiotic *Saccharomyces boulardii*. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2008;43(12):1489-96.
- [20] Szajewska H, Kolodziej M. Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015;42(7):793-801.
- [21] Korac M, Milosevic I, Markovic M, et al. *Clostridium difficile* infection: a Serbian single-center experience. *Journal of infection in developing countries*. 2015;9(2):136-40.
- [22] Arvand M, Volland D, Bettge-Weller G, Harmanus C, Kuijper EJ. Increased incidence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Hesse, Germany, 2011 to 2013. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(10).
- [23] Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Annals of internal medicine*. 2006;145(10):758-64.
- [24] Pakyz AL, Jawahar R, Wang Q, Harpe SE. Medication risk factors associated with healthcare-associated *Clostridium difficile* infection: a multilevel model case-control study among 64 US academic medical centres. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(4):1127-31.
- [25] Zhou FF, Wu S, Klena JD, Huang HH. Clinical characteristics of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital in China. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2014;33(10):1773-9.
- [26] Metzger R, Swenson BR, Bonatti H, et al. Identification of risk factors for the development of *clostridium difficile*-associated diarrhea following treatment of polymicrobial surgical infections. *Annals of surgery*. 2010;251(4):722-7.

