

L'INTEGRATORE NUTRIZIONALE®

Poste Italiane SpA. Spedizione in abbonamento postale DL 353/2003
(conv. in L. 2702/2004 N° 46) Art 1, comma 1 DCB Milano - ISSN 1127-6320

La rivista è online

CEC
EDITORE

2 Apr
Giu 2017

Probiotici & prebiotici



*L. Kefiri LKF01
e microbiota
intestinale*

*Cranberry +
D-mannosio +
Lattobacilli selezionati
nella cistite acuta*

*Lactobacillus reuteri
tindalizzato
nell'infezione
da H.Pylori*

*Probiotici orali
per la salute
della donna*

L. plantarum PBS067, L. rhamnosus LRH020 e B. lactis BL050

Complesso probiotico orale per la salute della donna

Marco Boccarusso (Roelmi HPC)
marco.boccarusso@roelmihpc.com

Parole chiave Probiotici, Vaginosi, Candida, Microbiota, Brevetto

Riassunto

Attraverso uno studio clinico condotto su 40 donne in premenopausa è stato dimostrato che, grazie all'assunzione orale di 3 miliardi di probiotici vivi al giorno, contenuti in una singola dose di prodotto, è possibile modulare la composizione del microbiota vaginale reintegrandolo, già dopo una settimana di trattamento, con le specie benefiche assunte. Si tratta dei ceppi *L. plantarum* PBS067, *L. rhamnosus* LRH020 e *B. lactis* BL050 selezionati per le loro proprietà antimicrobiche e immunomodulanti. Tali proprietà, intrinseche ai singoli ceppi, sono state confermate anche in seguito alla loro combinazione in un'unica formula. Inoltre è stato dimostrato che tale modulazione positiva è stabile per oltre una settimana dopo l'interruzione del trattamento, a evidenziare l'abilità dei tre ceppi di colonizzare l'epitelio vaginale anche quando introdotti per via orale. Questi dati supportano la scelta del complesso probiotico descritto nella prevenzione e nel trattamento complementare delle infezioni del tratto urogenitale femminile e in generale dei disturbi intimi della donna.

Introduzione

Il benessere intimo femminile è un delicato equilibrio di connessioni tra la donna e la composizione del suo microbiota vaginale (comunemente chiamato flora vaginale). Come evidenziato dallo *human microbiome project* (1), l'essere umano ospita una miriade di microrganismi che formano una comunità complessa e diversificata per ogni distretto corporeo, dall'intestino alla pelle. Queste comunità, nel corso della vita, sono soggette a cambiamenti in relazione allo stato fisiologico, all'invecchiamento, al tipo di alimentazione, all'as-

SUMMARY

L. plantarum PBS067, L. rhamnosus LRH020 and B. lactis BL050 *Oral probiotic complex for women's health*

Daily consumption of 3 billion live probiotics, contained in a single dose of innovative probiotic complex, is effective in modulating the vaginal microbiota composition. The reintegration of the orally intake species in the vaginal environment was asserted through a preclinical trial on 40 premenopausal women. This happens already in the first week of treatment. The administered strains *L. plantarum* PBS067, *L. rhamnosus* LRH020 e *B. lactis* BL050 were selected for their antimicrobial and immunomodulatory properties, useful for the maintenance of women's intimate health.

These intrinsic properties, showed by each strain individually, were also confirmed by their combination in a synergistic formula. In addition, it has been proved that this positive modulation is stable for over a week after washout. It has been highlighted the ability of these three strains to colonize the vaginal epithelium when introduced orally. These data support the choice of the complex probiotic product in the prevention and in the complementary treatment of female urogenital infections and more generally in improving the intimate well-being.

sunzione di farmaci, alle caratteristiche genetiche o alle abitudini comportamentali tipiche di ciascun individuo. La presenza di questi batteri, la diversità di specie e l'equilibrio che essi hanno con il nostro organismo rappresentano un nuovo concetto di salute: quando questo equilibrio viene disturbato o alterato può verificarsi una serie di patologie (si parla sempre più spesso di disbiosi o disbatteriosi).

L'ambiente vaginale ospita un ecosistema molto complesso e dinamico che può comprendere oltre 200 specie batteriche diverse (2). È stato osservato che, in condizioni fisiologiche, più del 90% di questa comunità appartiene al genere *Lactobacillus*. Squilibri nella composizione del microbiota vaginale, generalmente definiti

disbiosi vaginali, vedono la diminuzione dei lattobacilli in favore di altre specie microbiche, sia batteriche che fungine, come *Gardnerella vaginalis* e *Candida albicans* (3). Le disbiosi del microbiota sono state inequivocabilmente associate a patologie e a stati infiammatori e alcuni ricercatori hanno ipotizzato una correlazione tra la disbiosi del microbiota vaginale e l'aumento del rischio di contrarre virus sessualmente trasmissibili, come l'HIV o il *Papilloma virus* (HPV), e del rischio di infezioni micotiche da parte di *Trichomonas vaginalis* (4,5).

Uno studio osservazionale italiano riporta che oltre il 45% delle donne lamenta almeno un episodio di infezione vaginale all'anno (6). Tra le infezioni del tratto urogenitale femminile, le vaginosi batteriche sono tra le più comuni: è stato stimato che l'epidemiologia nelle donne in età fertile sia intorno al 12% nei paesi UE e superiore al 20% nel resto del mondo (7,8). Inoltre secondo i dati dello statunitense *Center for Disease Control and prevention* (CDC), nell'84% dei casi la vaginosi batterica risulta asintomatica e quindi molto spesso non diagnosticata (9). Trattare la vaginosi è molto importante, specialmente in gravidanza perché i batteri possono arrivare a svilupparsi nell'utero con l'aumento del rischio di parto prematuro (10-12). In questi casi il medico può prescrivere antibiotici che, però, hanno impatto anche sul resto del microbiota, generando possibili resistenze ed effetti collaterali (13). Quando il trattamento con antibiotici non si rivela efficace nella completa remissione della patologia e si presentano casi recidivanti, un secondo trattamento con antibiotici potrebbe essere controproducente (14). Per questo motivo la prevenzione rimane sempre la cura migliore.

Le cellule dell'epitelio vaginale costituiscono la prima barriera contro gli attacchi esterni e i batteri lattici del microbiota vaginale ne costituiscono la prima linea difensiva (15,16). Prendersi cura di entrambi è il primo passo per proteggersi dalle infezioni. L'attività benefica dei probiotici è possibile grazie ad una molteplicità di meccanismi d'azione, quali l'occupazione di specifici siti di adesione all'epitelio uro-vaginale, il mantenimento di un pH intimo acido e la produzione di metaboliti antimicrobici come acidi organici, batteriocine, perossido di idrogeno e polisaccaridi con proprietà anti-adesive (17-18). Inoltre, grazie ad un riconoscimento specifico dei probiotici da parte dei recettori delle cellule epiteliali, è possibile giustificarne la capacità di modulare la nostra risposta alle infezioni esterne (19). Infatti i batteri probiotici possiedono la capacità di interagi-

re positivamente con il nostro sistema immunitario attraverso la modulazione di citochine, difensine e degli altri attori della nostra immunità (20-21).

Il raggiungimento dell'omeostasi vaginale, mediante l'uso topico di probiotici (specialmente *Lactobacillus*), è già stato dimostrato (22-25), tuttavia la possibilità di prevenire questi squilibri reintegrando il microbiota vaginale, per via orale è stata scarsamente indagata.

Oltre all'azione locale, è importante riflettere sull'azione dei probiotici a livello intestinale. In questa sede possono verificarsi eventi infiammatori che si ripercuotono sul benessere e il buon funzionamento di altri distretti (26,27). Inoltre l'intestino è un serbatoio di numerose specie batteriche che possono migrare verso l'apparato genitale e causare infezioni (28). I Bifidobatteri giocano un ruolo primario nel benessere intestinale grazie alla loro capacità protettiva e immunostimolante delle mucose intestinali (29-31). La scelta di coadiuvare l'azione dei lattobacilli con quella dei bifidobatteri risulta importante per un prodotto ad assunzione orale proprio per contrastare quei fenomeni infiammatori che possono originarsi a livello intestinale. Il complesso probiotico presentato in questo studio* offre una soluzione innovativa, sicura ed efficace per il reintegro e il mantenimento di una sano microbiota vaginale, attraverso l'assunzione per via orale: i ceppi sono stati selezionati tra i migliori in grado di modulare positivamente l'infiammazione e contrastare l'azione di patogeni del tratto uro-genitale.

La sinergia probiotica agisce attraverso tre meccanismi d'azione:

- La traslocazione e la migrazione dal tessuto intestinale a quello vaginale
- La colonizzazione dell'epitelio vaginale
- L'esercizio delle funzioni benefiche *in loco*, come:
 - Il mantenimento del pH vaginale (fisiologicamente acido) grazie alla produzione di acido lattico,
 - la competizione diretta con altre specie batteriche che possono causare infezioni e
 - la modulazione del sistema immunitario, rendendolo più vigile e pronto a rispondere alle invasioni esterne.

Due studi clinici supportano la scelta del prodotto basato sul complesso probiotico, in seguito ad assunzione orale (32,33).

*SynBalance® Femme, prodotto da Roelmi HPC e distribuito da Amitalia - www.roelmihpc.com e www.amitalia.it

Materiali e Metodi

Il complesso probiotico è costituito dai ceppi: *Lactobacillus plantarum* PBS067 (DSM 24937), *Lactobacillus rhamnosus* LRH020 (DSM 25568) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL050 (DSM 25566), ognuno presente alla concentrazione di 1×10^9 UFC/cps (un miliardo di cellule vitali per capsula), per un totale di 3×10^9 UFC/cps.

Screening delle proprietà probiotiche *in vitro*

L'attività antimicrobica contro i patogeni *Candida albicans* (ATCC 10231) ed *Escherichia coli* (ATCC 25922) è stata studiata attraverso due modelli sperimentali volti a valutare l'effetto antimicrobico dei metaboliti secreti nel mezzo di crescita e l'effetto inibitorio dovuto alla competizione diretta per lo stesso substrato. Il primo è stato verificato seguendo il protocollo del *broth microdilution method*, confrontando i risultati ottenuti dai test rispetto al controllo negativo costituito dal solo terreno di crescita (privo di metaboliti antimicrobici). Il secondo attraverso la tecnica del *modified agar overlay method* che prevede la co-incubazione nella stessa piastra dei probiotici e del patogeno, valutando l'effetto inibitorio attraverso la comparsa di un alone di inibizione.

La modulazione della risposta infiammatoria è stata provata attraverso saggi ELISA per la quantificazione di due citochine secrete nel mezzo di coltura della linea cellulare murina Balb 3T3. Le citochine monitorate sono state scelte per la loro attività specifica e contrapposta nella propagazione del processo infiammatorio: TNF- α è una citochina primaria a rilascio rapido con funzione pro-infiammatoria, mentre IL-4 è una citochina secondaria a rilascio tardivo con funzione anti-infiammatoria. Prima di eseguire il saggio viene indotta l'infiammazione della linea cellulare con l'agente irritante SDS (sodio dodecilsolfato). Successivamente si osserva l'effetto del trattamento probiotico sui livelli delle citochine, confrontandone l'espressione sia rispetto al livello basale (controllo negativo) che rispetto al livello dello stato stressato (controllo positivo). La modulazione della risposta in seguito al trattamento è valutata sulla stessa linea cellulare, sia dopo 24 ore dall'induzione dello stress che dopo 5 giorni, per osservare gli effetti sulla risposta acuta e sulla risposta sistemica.

Il potere antiossidante della formulazione probiotica è stato misurato quantificando le moli di ione ferroso Fe(II) presenti nel mezzo di coltura della linea

cellulare di fibroblasti murini Balb 3T3, attraverso saggio FRAP, confrontando il trattamento probiotico dopo 24 ore e dopo 5 giorni rispetto al livello basale (controllo negativo).

Studio *in vivo*

Lo studio preclinico randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, condotto presso i laboratori di CompLife Group, ha coinvolto 40 donne di età compresa tra i 18 e i 50 anni che non avessero in corso infezioni o stati patologici, né segnalato episodi di infezioni vaginali o delle vie urinarie durante l'ultimo anno. In base al piano di assegnazione casuale al gruppo di appartenenza, i soggetti hanno assunto quotidianamente o una dose di placebo, o una dose di SynBalance® Femme (contenente 3 miliardi di probiotici vivi), per tutta la durata del trattamento, pari a due settimane. Le pazienti di entrambi i gruppi sono state visitate da un ginecologo all'inizio (T0), a metà (T7), alla fine (T14) e una settimana dopo il termine del trattamento (T21). Durante le visite, oltre alle normali pratiche, sono stati monitorati i valori del pH vaginale e prelevati dei tamponi di secrezione vaginale. A fine studio le pazienti hanno risposto a un questionario di autovalutazione con domande sulla soddisfazione del trattamento e sul miglioramento dei principali sintomi dei disturbi intimi. Il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico e tutte le pazienti hanno fornito un consenso informato scritto prima di sottoporsi a qualsiasi esame.

La colonizzazione dell'epitelio vaginale da parte dei ceppi probiotici è stata dimostrata grazie ad analisi di biologia molecolare svolte a partire dal DNA totale estratto dai tamponi vaginali. Il DNA totale è stato recuperato grazie al kit *InstaGene Matrix*, seguendo il protocollo fornito dal produttore (Bio-rad). La quantificazione delle tre specie in esame è avvenuta mediante tecnica di PCR in tempo reale (qPCR), effettuata sul campione di DNA totale, utilizzando sonde molecolari specifiche (*primers*) per l'individuazione dei tre ceppi di SynBalance® Femme. I *primers* sono stati disegnati dai ricercatori del dipartimento BTBS di Milano-Bicocca.

Risultati

I ceppi del complesso probiotico sono stati selezionati basandosi sui dati di caratterizzazione ottenuti da uno studio condotto precedentemente dall'Uni-

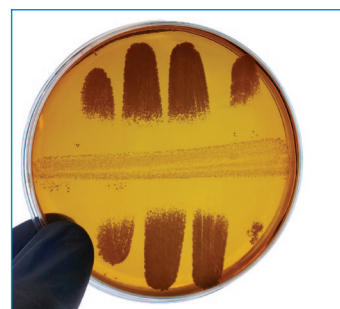
versità di Milano-Bicocca (34). Le proprietà dimostrate dai singoli ceppi sono state riconfermate dopo formulazione sinergica, validandone la compatibilità.

Lo studio dell'attività antimicrobica contro i patogeni è stato osservato in un duplice modello. In (Fig. 1) si può vedere un esempio dell'attività antimicrobica contro *E. coli* dovuta alla produzione di speciali metaboliti di fermentazione (per esempio dovuta alla presenza di acido lattico e o batteriocine). Nella Figura 2 si può apprezzare l'alone di inibizione del fungo *C. albicans* inseguito a crescita in cocoltura con i ceppi del complesso probiotico. Questo secondo modello permette di simulare una competizione diretta per gli stessi nutrienti con un meccanismo più simile a quanto può verificarsi *in vivo*.

L'immunomodulazione è stata esaminata con saggi sulla linea cellulare di fibroblasti murini (Balb 3T3), valutando l'azione pro-infiammatoria, anti-infiammatoria e antiossidante della formulazione probiotica rispetto ai singoli ceppi e ai controlli. La linea sistemica Balb 3T3 viene spesso utilizzata negli studi di sicurezza e di biocompatibilità sui dispositivi medici e permette una valida alternativa ai test sugli animali. I tre ceppi e la loro associazione in un unico complesso hanno mostrato una discreta efficacia nel modulare e contrastare l'infiammazione della linea cellulare. Già dopo 24 ore di trattamento si può osservare la diminuzione del rilascio della citochina TNF- α , responsabile della fase acuta del processo infiammatorio, in favore della stimolazione dell'interleuchina IL-4, coinvolta nell'evoluzione verso la risposta specifica (Figg.3,4). In particolare il complesso probiotico mostra degli ottimi livelli di riduzione della citochina pro-infiammatoria e di stimolazione di quella anti-infiammatoria an-

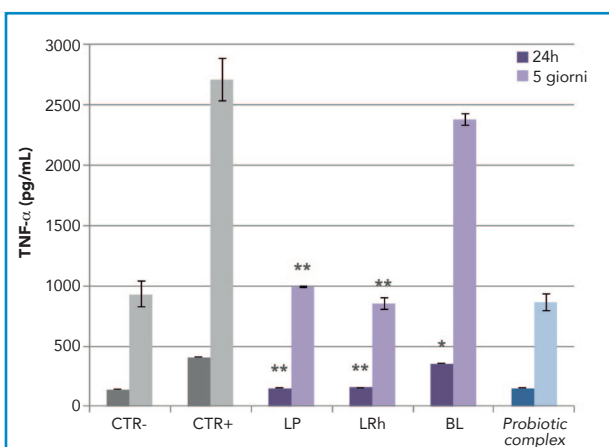
che dopo 5 giorni di trattamento.

Confrontando l'effetto sul lungo termine del complesso rispetto ai livelli basali si può ipotizzare una funzione protettiva e schermanate dei probiotici contro i danni causati dall'agente irritante.



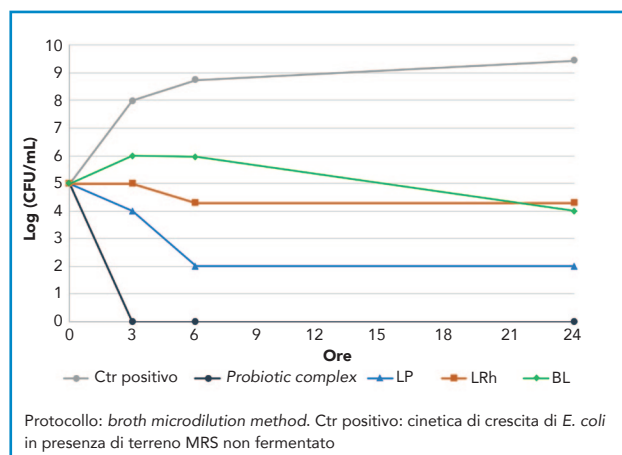
Protocollo: modified agar overlay method
Nella foto si vede chiaramente l'alone di inibizione della crescita del patogeno intorno all'area orizzontale di semina dei probiotici

Figura 2 – Fotografia dell'inibizione di *Candida albicans* in presenza del complesso probiotico



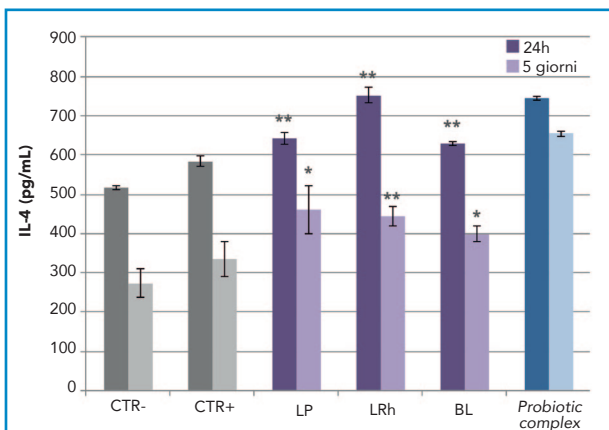
Protocollo: quantificazione della citochina TNF- α tramite ELISA.
CTR-: nessun trattamento, livello basale di espressione della citochina.
CTR+: nessun trattamento, livello di espressione della citochina dopo induzione dell'infiammazione con SDS. Barre di errore: \pm deviazione standard.
Confronto dei test rispetto al CTR+: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Figura 3 – Modulazione della risposta pro-infiammatoria a 24 ore e a 5 giorni in seguito al trattamento della linea cellulare con i ceppi probiotici, considerati singolarmente (LP, LRh e BL) o in sinergia (Probiotic complex)



Protocollo: broth microdilution method. Ctrl positivo: cinetica di crescita di *E. coli* in presenza di terreno MRS non fermentato

Figura 1 - Attività antimicrobica esercitata dai ceppi singolarmente (LP, LRh e BL) o in sinergia (Probiotic complex) contro *Escherichia coli*



Protocollo: quantificazione della interleuchina IL-4 tramite ELISA.
CTR-: nessun trattamento, livello basale di espressione della citochina.
CTR+: nessun trattamento, livello di espressione della citochina dopo induzione dell'infiammazione con SDS. Barre di errore: \pm deviazione standard.
Confronto dei test rispetto al CTR-: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Figura 4 – Modulazione della risposta anti-infiammatoria a 24 ore e a 5 giorni in seguito al trattamento della linea cellulare con i ceppi probiotici, considerati singolarmente (LP, LRh e BL) o in sinergia (Probiotic complex)

Il potere antiossidante dei probiotici sul mezzo di coltura è stato valutato in termini di prevenzione dell'ossidazione della specie ridotta dello ione ferro. Il ferro rappresenta in questo sistema sperimentale un agente ossidante per via della sua natura di metallo di transizione e quindi un agente in grado di indurre stress ossidativo.

Il trattamento con i probiotici ha esercitato un'azione antiossidante importante nelle prime 24 ore rispetto al livello basale, ma tale effetto è risultato meno marcato dopo 5 giorni. Invece la sinergia probiotica ha mostrato un incremento del livello di protezione dagli stress ossidativi rispetto al controllo anche dopo 5 giorni (**Fig.5**).

Tali prove *in vitro* non solo hanno confermato tutte le proprietà esercitate dai singoli ceppi, ma in diver-

si test (a parità di concentrazione totale di probiotico) si è assistito ad un miglioramento delle *performance* a indicare un effetto sinergico della combinazione di questi tre ceppi.

In seguito a questa verifica *in vitro* è stato condotto uno studio preclinico randomizzato, con lo scopo di determinare la presenza dei ceppi selezionati nel tessuto vaginale delle 20 donne assegnate al gruppo attivo (**33**).

Il microbioma, inteso come patrimonio genetico della comunità microbica, recuperato dai tamponi vaginali, è stato studiato nei laboratori di biologia molecolare dell'università di Milano-Bicocca per determinare o meno la presenza dei ceppi assunti durante il trattamento attraverso analisi di PCR in tempo reale (qPCR).

Questo risultato è stato possibile grazie alla progettazione di sonde molecolari specifiche per il riconoscimento genetico dei tre ceppi del complesso probiotico. In questo modo è stato possibile dimostrare che l'assunzione per via orale del prodotto determina, a livello dell'epitelio vaginale, un aumento significativo delle tre specie (*L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*) solo nelle pazienti del gruppo attivo, mentre questa variazione non si verifica per il gruppo placebo. Inoltre l'effetto rimane visibile anche una settimana dopo il termine dell'assunzione dei ceppi, a indicazione di una effettiva colonizzazione e reintegro di queste tre specie sul tessuto vaginale (**Fig.6**).

Infine sul profilo di acidificazione del pH vaginale si può dire che l'assunzione della sinergia probiotica ha aiutato a mantenere la condizione fisiologicamente acida del pH vaginale (inferiore a 4,3) durante tutta la durata dello studio (**Fig.7**).

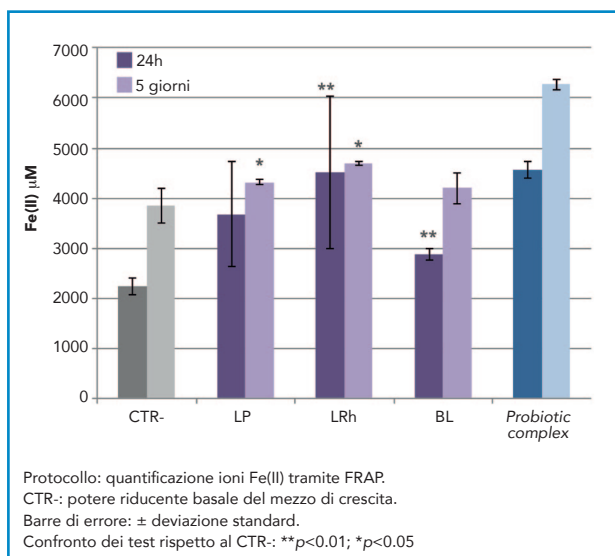


Figura 5 – Potenziale antiossidante dei ceppi probiotici, considerati singolarmente (LP, LRh e BL) o in sinergia (Probiotic complex)

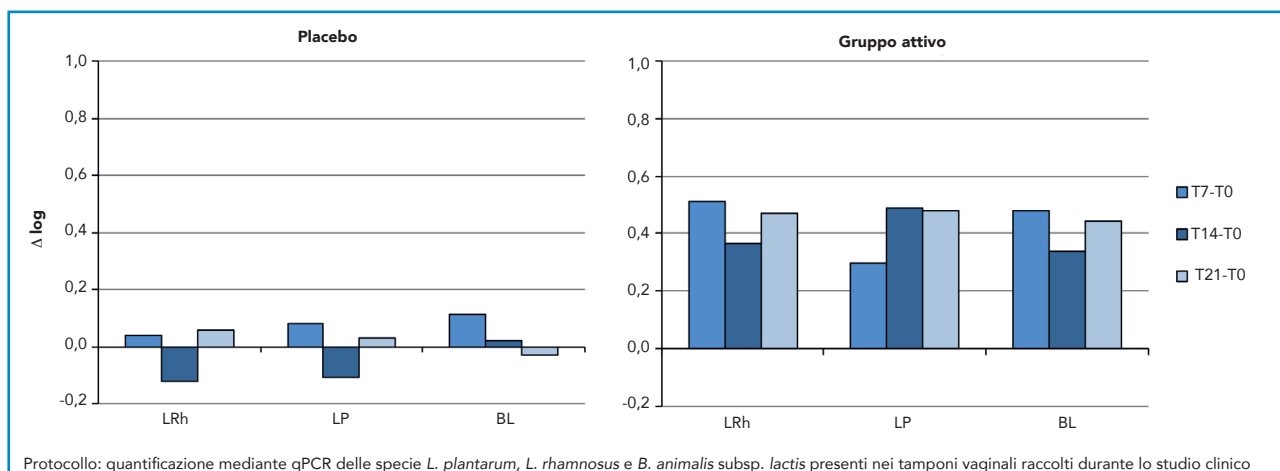
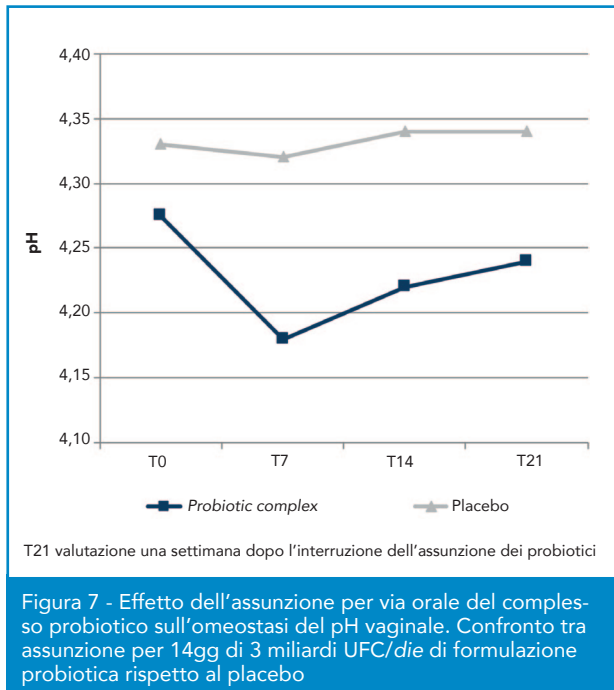


Figura 6 – Colonizzazione dell'epitelio vaginale da parte dei ceppi probiotici contenuti nel prodotto (gruppo attivo), rispetto al placebo. Espressione della differenza logaritmica dei rilevamenti al T7, T14 e T21 rispetto al T0



Discussione e conclusioni

Le infezioni batteriche del tratto urogenitale femminile sono disturbi infiammatori piuttosto diffusi che possono portare a severe complicazioni (6-9). Queste possono variare da semplici infiammazioni transitorie a patologie gravi, associate con infertilità e complicazioni in gravidanza (10-12,35-36). Spesso non vengono diagnosticate perché l'infiammazione e l'infezione rimangono asintomatiche o lievi. Le citochine hanno un ruolo cruciale sia nello scatenare la risposta immunitaria sia, sul lungo periodo, nel controllare l'infiammazione (19,37-39).

Il primo meccanismo di protezione dagli agenti esterni si ritiene che sia dovuto all'immunità innata (aspecifica), che può generare la sintomatologia tipica della malattia. Le cellule del tessuto genito-urinario rispondono a particolari molecole esposte sulla membrana esterna dei patogeni attraverso i recettori di tipo Toll (TLR2, TLR4 e TLR6) che scatenano la trascrizione di citochine pro infiammatorie, come le interleuchine IL-1a, IL-1b, IL-6 e il TNF- α (15,40).

Sullo stesso piano, la risposta immunitaria adattativa è legata all'attivazione dei linfociti che a loro volta sono indotti e regolati dalle citochine. In questo modo i linfociti B e T possono proliferare e differenziarsi in linfociti specializzati. L'interleuchina IL-4 induce attraverso un *feedback* positivo, il differen-

ziamento delle cellule *T-helper naive* (Th0) a specializzate Th2; inoltre stimola i linfociti B a produrre anticorpi (41,42).

In questo lavoro abbiamo scelto il TNF- α e IL-4 come *biomarker* rappresentativi rispettivamente di citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie, per dimostrare l'efficacia dei batteri probiotici nel modulare positivamente lo stato infiammatorio.

L'infiammazione viene normalmente considerata una risposta del nostro organismo ad un agente esterno, quindi una conseguenza alle infezioni; per questo motivo l'inibizione dei patogeni andrà a ridurre le cause dell'infiammazione. D'altra parte, l'infiammazione può anche essere causa delle infezioni: squilibri nell'omeostasi tra stato infiammatorio e immunità specifica sono un segnale di una risposta immunitaria meno efficace, che lascia la porta aperta alle aggressioni da parte di agenti patogeni. In quest'ottica si può dire che la stimolazione dell'immunità specifica giochi un ruolo anche nella prevenzione delle infezioni e di conseguenza che i probiotici capaci di modulare l'infiammazione siano d'aiuto nel prevenire le infezioni.

I ceppi selezionati in base alle loro proprietà funzionali sono risultati ottimali per essere impiegati nel miglioramento della salute intima femminile in una formulazione ad assunzione orale. Tali proprietà riguardano l'azione antagonista contro i patogeni, la capacità di modulare la risposta infiammatoria, nonché di colonizzare l'epitelio vaginale, mantenendone un basso profilo di acidificazione.

È molto importante sottolineare la specificità e selettività del risultato ottenuto, poiché grazie alle sonde molecolari disegnate sul genoma dei nostri ceppi è stato possibile correlare l'aumento delle tre specie (*L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*) all'assunzione del prodotto. Data l'evidenza delle proprietà intrinseche dei ceppi e la dimostrazione della colonizzazione, anche in soggetti che non presentano squilibri nella composizione del microbiota vaginale, è prevedibile che tali ceppi esercitino le loro proprietà benefiche anche *in loco*. Infatti è più difficile influenzare la normale omeostasi e valutare l'efficacia del prodotto in uno stato non perturbato, piuttosto che monitorarne un ritorno all'equilibrio in uno stato già alterato.

Le indagini svolte offrono un valido supporto per approfondire la ricerca sulle potenzialità del complesso a base dei tre ceppi probiotici, nell'ambito

della prevenzione dei disturbi intimi femminili. Il trattamento delle disbiosi vaginali attraverso il reintegro di batteri probiotici è già una pratica consolidata e consigliata da molti esperti che sta ottenendo ottimi risultati, soprattutto nel contrastare i casi recidivanti (14,22).

La sinergia probiotica qui descritta permette una soluzione complementare, innovativa ed efficace al trattamento farmacologico dei principali disturbi intimi ed è oggetto di protezione brevettuale per l'applicazione nella prevenzione e nel trattamento delle infezioni urogenitali femminili. Ulteriori studi clinici promossi da Roelmi interesseranno soggetti con diversi gradi di disbiosi vaginale o particolare grado di sensibilità, quali donne in gravidanza. Il panorama scientifico internazionale, grazie all'avanzamento delle ricerche sul microbioma umano, sta acquisendo sempre maggiore consapevolezza sul ruolo dei probiotici nella salute umana: il loro impiego infatti sta spaziando a distretti diversi dall'intestino, mirando a patologie associate a stati di squilibrio del microbiota umano.

Bibliografia

- Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-214
- Ravel J (2011) Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci* 108(Suppl. 1):4680-4687
- Ling Z (2013) Associations between vaginal pathogenic community and bacterial vaginosis in Chinese reproductive-age women. *PLoS One* 8(10):e76589
- Van de Wijkert J (2014) The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One* 9(8):e105998
- Mitra A (2016) The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome* 4(1):58
- Gyneco AOGOI (2005) Studio osservazionale sull'igiene intima femminile in Italia 718:18-20
- Kenyon C (2013) The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 209(6):505-523
- Van de Wijkert J, Jaspers V (2017) The global health impact of vaginal dysbiosis. *Res Microbiol* S0923-2508(17): 300384
- Koumans E (2007) The prevalence of bacterial vaginosis in the US, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis* 34(11):864-869
- Hillier SL (1995) Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med* 333(26):1737-1742
- Redelinghuys MJ (2016) Normal flora and bacterial vaginosis in pregnancy: an overview. *Crit Rev Microbiol* 42(3):352-363
- De Andrade Ramos B (2015) Microorganisms in the female genital tract during pregnancy: tolerance versus pathogenesis. *Am J Reprod Immunol* 73:383-389
- Stokholm J (2014) Antibiotic use during pregnancy alters the commensal vaginal microbiota. *Clin Microbiol Infect* 20(7):629-635
- Parma M (2014) Probiotics in the prevention of recurrences of bacterial vaginosis. *Altern Ther Health Med* 20(Suppl 1):52-57
- Doerflinger SY (2014) Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *J Infect Dis* 209(12):1989-1999
- Martin DH (2012) The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci* 343(1):2-9
- Bermudez-Brito M (2012) Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 61(2):160-174
- Coman MM (2015) *In vitro* evaluation on HeLa cells of protective mechanisms of probiotic lactobacilli against *Candida* clinical isolates. *J Appl Microbiol* 119:1383-1390
- Nasu K, Narahara H (2010) Pattern recognition via the Toll-like receptor system in the human female genital tract. *Mediators Inflamm* 2010:976024
- Cross ML (2004) Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(2):173-180
- Kremleva EA, Sgibnev AV (2016) Proinflammatory Cytokines as Regulators of Vaginal Microbiota. *Bull Exp Biol Med* 162(1):75-78
- Stapleton AE (2011) Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 52(10):1212-1217
- Falagas M (2007) Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 13(7):657-664
- Palmeira-de-Oliveira R (2015) New strategies for local treatment of vaginal infections. *Adv Drug Deliv Rev* 92:105-122
- Mastromarino P (2013) Bacterial vaginosis: A review on clinical trials with probiotics. *New Microbiologica* 36(3):229-238
- Bengmark S (2013) Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacol Res* 69(1):87-113
- Bron PA, Kleerebezem M (2012) Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat Rev Micro* 10:66-78
- Brenchley JM, Douek DC (2012) Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol* 30:149-173
- Sarkar A, Mandal S (2016) Bifidobacteria-Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiol Res* 192:159-171
- Trebichavsky I (2009) Cross-talk of human gut with bifidobacteria. *Nutr Rev* 67(2):77-82
- Ménard O (2008) Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobacterium* sp. strains isolated from infants. *Appl Environ Microbiol* 74(3):660-666
- Mezzasalma V (2016) A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial: The Efficacy of Multispecies Probiotic Supplementation in Alleviating Symptoms of Irritable Bowel Syndrome Associated with Constipation. *Biomed Res Int* 2016:4740907

33. Mezzasalma V (2017) Orally administered multispecies probiotic formulations to prevent uro-genital infections: a randomized placebo-controlled pilot study.
Arch Gynecol Obstet 295(1):163-172
34. Presti I (2015) Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their *in vitro* effect.
Appl Microbiol Biotechnol 99(13):5613-5626
35. Petrova MI (2013) Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection.
FEMS Microbiol Rev 37(5):762-792
36. Yudin MH (2005) Bacterial vaginosis in pregnancy: diagnosis, screening, and management.
Clin Perinatol 32(3):617-627
37. Corthésy B (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system.
J Nutr (3 Suppl 2):781S-790S
38. Ashraf R, Shah NP (2014) Immune system stimulation by probiotic microorganisms.
Crit Rev Food Sci Nutr 54(7):938-956
39. Kremleva EA, Sgibnev AV (2016) Proinflammatory Cytokines as Regulators of Vaginal Microbiota.
Bull Exp Biol Med 162(1):75-78
40. Dogi CA (2010) Immune response of non-pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa. Study of the pathway of signaling involved.
Immunobiology 215(1):60-69
41. Opal SM (2000) Anti-inflammatory cytokines.
Chest 117(4):1162-1172
42. LeBlanc JG (2008) Anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: Current knowledge, applications and prospects.
Antiinfect Agents Med Chem 7(3):148-154