

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E SCIENZE DELLA SALUTE "V. TIBERIO"



Dottorato di Ricerca in Medicina Traslazionale e Clinica

XXXV Ciclo

Tesi in Microbiologia e Microbiologia Clinica (MED/07)

Screening delle potenzialità probiotico-terapeutiche di microrganismi isolati da latte umano

Tutor:

Chiar.mo Prof.

Roberto DI MARCO

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Giovanni

SCAPAGNINI

Dottoranda:

Noemi VENDITTI

matricola 167161

A mia figlia,
che ha ispirato questo progetto

INDICE

1	Introduzione	1
1.1	Il Microbiota umano	1
	<i>Disbiosi</i>	4
	<i>Disbiosi vaginale</i>	5
1.2	I Probiotici	7
	<i>Caratteristiche dei microrganismi probiotici</i>	8
	<i>Applicazioni cliniche dei probiotici</i>	11
1.3	Il latte materno come fonte di probiotici	14
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	19
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	20
2	Scopo dello studio	22
3	Materiali e metodi	23
3.1	Popolazione in studio.....	23
3.2	Tecniche di isolamento dei microrganismi	23
3.3	Profili di suscettibilità agli antibiotici.....	24
3.4	Antagonismo nei confronti dei microrganismi patogeni	25
3.5	Caratterizzazione preliminare delle sostanze antimicrobiche.....	26
3.6	Attività antibiofilm	27
3.7	Proprietà chimico-fisiche della superficie cellulare batterica.....	28
	<i>Idrofobicità</i>	28
	<i>Auto-aggregazione</i>	29
	<i>Formazione biofilm</i>	29
3.8	Sopravvivenza al transito nel tratto gastrointestinale (GIT).....	30
3.9	Identificazione fenotipica.....	31
3.10	Identificazione molecolare.....	33

3.11	Saggio di vitalità cellulare (MTT)	35
3.12	Adesione alla linea cellulare VK2/E6E7	36
3.13	Attività antimicrobica su VK2 E6/E7	37
3.14	Saggio di migrazione delle cellule VK2 E6/E7	39
4	Risultati	41
4.1	Popolazione in studio	42
4.2	Microrganismi isolati	42
4.3	Profili di suscettibilità agli antibiotici	44
4.4	Antagonismo nei confronti dei microrganismi patogeni	45
4.5	Caratterizzazione preliminare delle sostanze antimicrobiche	47
4.6	Attività antibiofilm	47
4.7	Proprietà chimico-fisiche della superficie cellulare batterica	49
4.8	Sopravvivenza al transito nel tratto gastrointestinale (GIT)	51
4.9	Identificazione fenotipica	53
4.10	Identificazione molecolare	56
4.11	Saggio di vitalità cellulare (MTT)	57
4.12	Adesione alla linea cellulare VK2/E6E7	59
4.13	Attività antimicrobica su VK2 E6/E7	60
4.14	Saggio di migrazione delle cellule VK2 E6/E7	64
	Discussione e conclusioni	66
5	Bibliografia	70

1 Introduzione

1.1 Il Microbiota umano

Il rapporto inscindibile tra l'uomo e i microrganismi è iniziato circa 2,5 milioni di anni fa ed è destinato a un continuo processo di co-evoluzione. Un esempio di questa unione primordiale è stato portato alla luce grazie alla “teoria dell'endosimbiosi” postulata dalla genetista Lynn Margulis. Secondo questa teoria i mitocondri sarebbero derivati da ancestrali batteri inglobati nelle cellule umane per acquisire un vantaggio evolutivo (Margulis L., 1996). Questo vantaggio era stato già teorizzato nel 1926 dal microbiologo Paul de Kruif che, per la prima volta, introduce il concetto di microrganismi “buoni” nel testo divulgativo «Microbe Hunters» (Castellani, A., *et al.*, 1927). Negli stessi anni, si è giunti alla scoperta che l'essere umano è composto da circa 10^{13} cellule eucariotiche e che contiene circa 10^{14} cellule procariotiche. Per tale elevato quantitativo, Henderson e Wilson hanno suggerito che Linneo avrebbe dovuto chiamare la specie umana *Homo bacteriens* (Henderson B. and Wilson M., 1996).

Infatti, l'essere umano può essere definito come un superorganismo (olobionte) derivato da una simbiosi stabile tra due sistemi autonomi: l'uomo e i microrganismi simbiotici. Questi ultimi si sono evolutivamente adattati a vivere insieme agli organismi superiori in un rapporto reciprocamente vantaggioso. L'insieme dei microrganismi che vive in pacifica coesistenza con il proprio ospite è definito “microbiota” (Kobyliak N. *et al.*, 2016).

Nello specifico, il microbiota umano è composto da una biomassa microbica così numerosa da essere di 2-3 ordini di grandezza superiore rispetto a lieviti, protozoi ed *archaea* (Yatsunenkov T. *et al.*, 2012; Qin J. *et al.*, 2010). Il numero di cellule batteriche riesce ad eguagliare il numero delle cellule che costituiscono l'organismo umano, raggiungendo un rapporto di 1:1 (Sender R. *et al.*, 2016).

Il microbiota colonizza virtualmente ogni superficie del corpo umano: cute, vie respiratorie, vie urogenitali e tratto gastrointestinale (GIT) (Figura 1). Anche i distretti che venivano un tempo considerati sterili, come il latte materno, se pur momentaneamente, possono avere una popolazione microbica residente (Ackerman J., 2012).

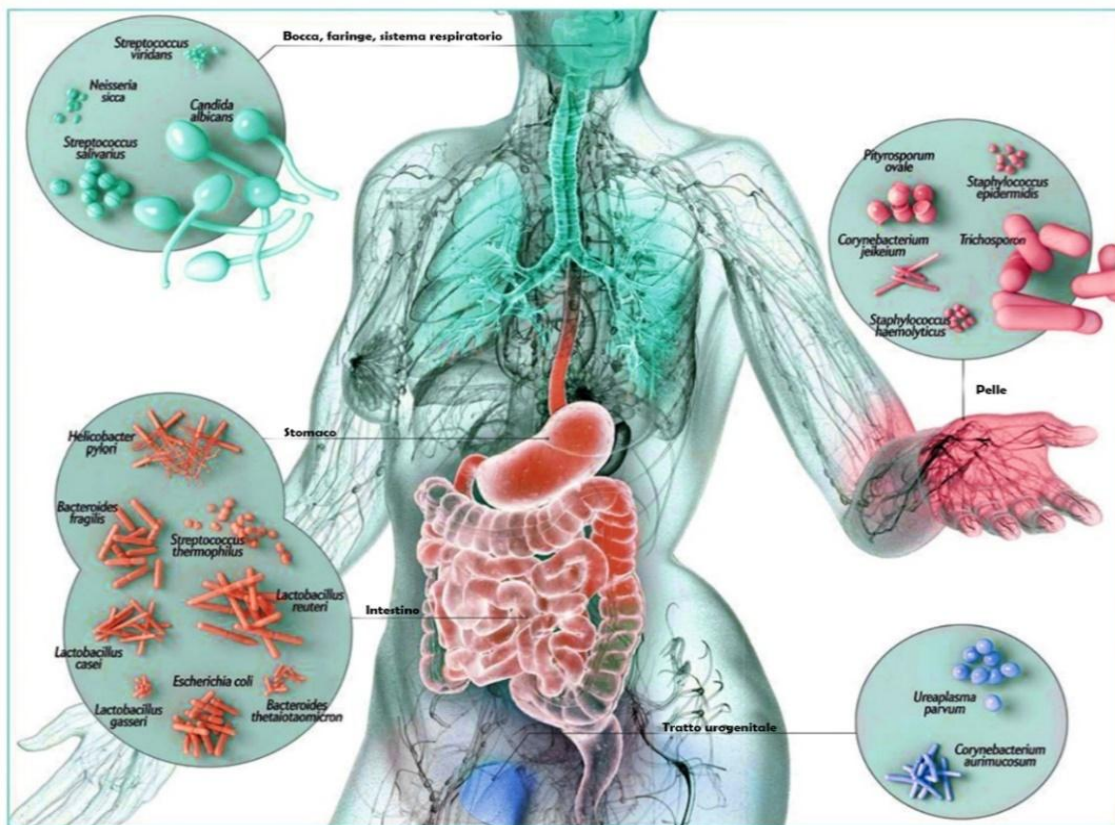


Figura 1 Distribuzione del microbiota umano (Ackerman J., 2012).

La popolazione microbica dell'essere umano è costituita sia da membri autoctoni (residenti) che alloctoni e ciò rende questo ecosistema estremamente dinamico. Ogni individuo possiede una composizione microbica unica, fortemente condizionata da vari fattori intrinseci ed estrinseci (Figura 2) (Lee Y.K. *et al.*, 2007; Ursell L.K. *et al.*, 2012). Ad esempio, il feto non risiede in un ambiente intrauterino sterile, ma è esposto a microrganismi commensali derivanti dall'intestino materno e dal flusso sanguigno che attraversa la placenta ed entra nel liquido amniotico. L'esposizione ai microbi colonizzanti continua al momento della nascita e durante il primo anno di vita e ha una profonda influenza sulla salute. Questo *crossstalk* influisce sull'adattamento del bambino alla vita extrauterina. In particolare, a seconda del tipo di parto, si possono notare alcune differenze. In caso di parto eutocico (naturale), nell'intestino del neonato sono presenti tracce di materiale microbico vaginale materno e si osserva una prevalenza di *Bacteroidi* e *Bifidobatteri* (Palmer C. *et al.*, 2007). Se la nascita avviene tramite parto cesareo o prematuramente, si ha l'interruzione del processo di colonizzazione, causando una maggiore suscettibilità alle malattie in futuro.

I bambini nati con parto cesareo, inoltre, hanno una maggiore incidenza di allergie, diabete di tipo 1 ed obesità. Mentre i neonati sottoposti a ripetuti regimi antibiotici durante il primo anno di vita hanno più probabilità di sviluppare l'asma rispetto agli adolescenti (Walker W.A., 2017).

Successivamente, con l'allattamento la composizione del microbiota (intestinale e non) si arricchisce e si riscontrano spesso sia *Bifidobacterium* (60-90% del microbiota fecale) che una quota inferiore all'1% di batteri lattici (Enck P. *et al.*, 2009). Inoltre, si ha un aumento della comunità fermentante con una simultanea diminuzione di quella putrefattiva e una diminuzione del pH. In queste condizioni si assiste ad un miglioramento delle funzioni digestive e di assorbimento, una relativa stimolazione del sistema immunitario e una riduzione del rischio di contrarre allergie, una produzione di vitamine (biotina, acido folico, vitamina K, vitamine del gruppo B), migliore assorbimento di ioni (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+}) e a una produzione di composti a funzione trofica per l'enterocita (SCFA, amminoacidi, poliamine, fattori di crescita) (Gibson G.R., 1999).

L'abuso di antibiotici, aumentato soprattutto negli ultimi anni, induce una riduzione dei microrganismi sensibili favorendo la proliferazione di batteri resistenti agli antimicrobici. Le manifestazioni cliniche più frequenti vanno da disturbi lievi, quali meteorismo e diarrea, a gravi infezioni come la colite pseudomembranosa. In soggetti trattati frequentemente con antibiotici in età pediatrica vi è, inoltre, un aumento dell'incidenza di obesità, diabete ed infezioni da *Clostridium difficile* (Langdon A. *et al.*, 2016).

Variazioni della composizione microbica indotta da uno stile di vita scorretto e dallo stress possono portare ad un'alterata regolazione della motilità e della permeabilità intestinale creando le basi per le patologie connesse (Moloney R.D. *et al.*, 2016; Yano J.M., 2015).

Un altro fattore è la provenienza geografica che risulta anch'essa determinante per l'evoluzione del microbiota intestinale. Analisi sul 16S rRNA hanno evidenziato che nelle feci di bambini dell'Europa meridionale risiede una quota maggiore di *Bacteroidetes* e *Lactobacillus* rispetto a quelli dell'Europa settentrionale in cui vi è un maggior numero di *Bifidobacterium* (Fallani M. *et al.*, 2011). Recenti studi hanno dimostrato che il microbiota della popolazione delle zone asiatiche in via di sviluppo mostra un trend che va verso quello occidentale a causa dell'aumentata resistenza agli antibiotici (Winglee K. *et al.*, 2017; Schnorr S. *et al.*, 2014).

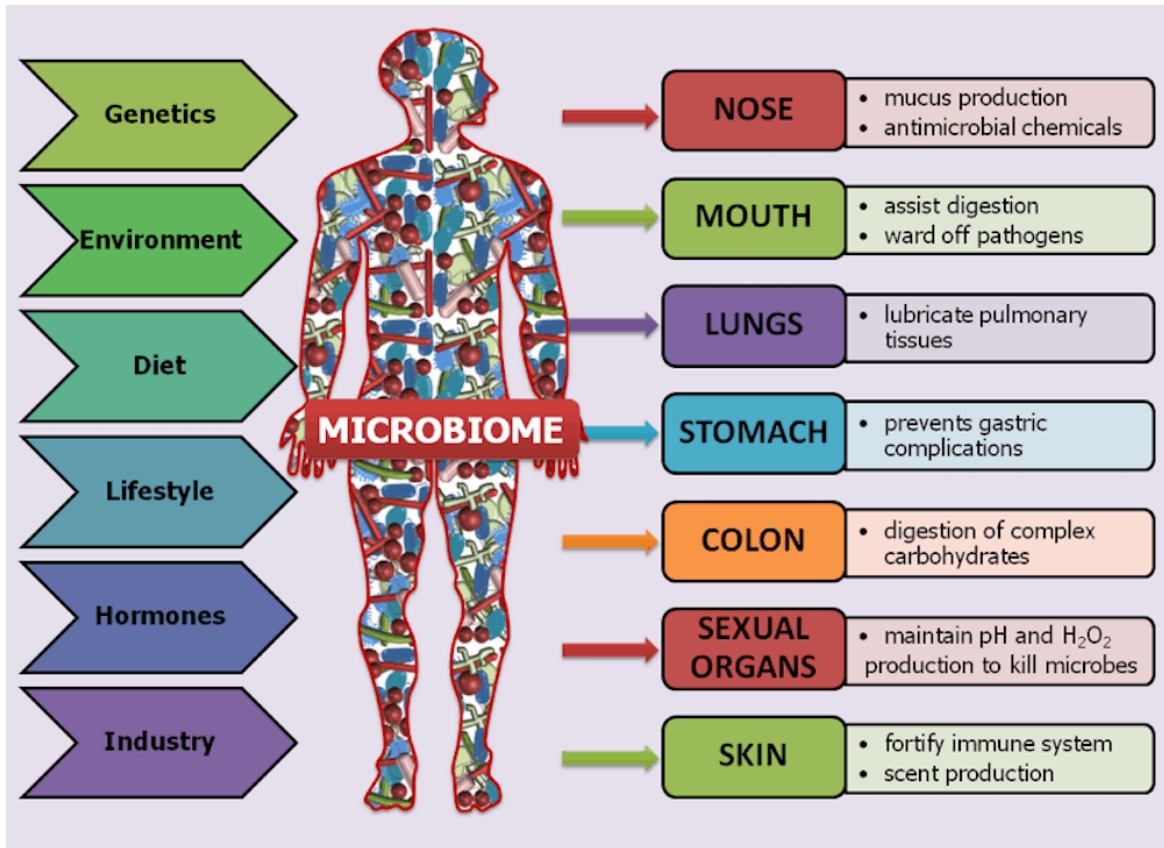


Figura 2 Fattori che influenzano il microbiota (Appanna, V. D. 2018).

Disbiosi

Nell'ultimo secolo si è assistito alla comparsa di un gran numero di malattie multifattoriali, tra cui quelle infiammatorie, autoimmuni, metaboliche, neoplastiche e neurodegenerative, molte delle quali sono state recentemente associate a un'alterazione del microbiota. Quando la corretta colonizzazione di un distretto corporeo viene alterata, si instaura una condizione di disbiosi e in base alla regione interessata si può identificare una disbiosi intestinale, cutanea, orale o vaginale (Levy, M. *et al.*, 2017).

La manipolazione del microbiota può dunque rappresentare una strategia utile nel trattamento di queste patologie considerando che le terapie farmacologiche attualmente in uso sono spesso insufficienti e con molteplici effetti collaterali. A tal proposito, l'attenzione verso la conoscenza della composizione del microbiota a scopo sia preventivo che terapeutico è in continua crescita.

La complessità delle interazioni che si vengono a creare e la molteplicità delle specie microbiche presenti in natura, rendono unico il microbiota di ogni singolo individuo al punto da poterlo paragonare ad un'impronta digitale. Questa specificità, ci permette di valutare l'immenso potenziale del microbiota come *target* per una medicina personalizzata (Jia W. *et al.*, 2008; Bellaguarda E. and Chang E.B., 2015). Potenziali strategie terapeutiche per modulare la disbiosi costituiscono un obiettivo clinico fondamentale nel trattamento di numerose patologie. Per ristabilire un microbiota bilanciato, in base alla gravità della disbiosi, si possono valutare differenti approcci terapeutici e utilizzare strategie nutrizionali differenziate mediante l'uso di probiotici, prebiotici e nutrienti specifici (McCarville J. *et al.*, 2016). I probiotici, sono organismi viventi che, se ingeriti in certe quantità, sono in grado di modificare la composizione del microbiota aumentando la concentrazione di "batteri buoni" e riducendo incidenza e severità di una serie di disordini, al di là del loro effetto nutritivo intrinseco. I prebiotici sono fibre che si trovano soprattutto in verdura o legumi e non sono assimilabili, ma permettono ai probiotici di proliferare. I simbiotici sono alimenti, farmaci o integratori, contenenti una miscela di prebiotici e di probiotici (Markowiak P. and Śliżewska K., 2017). Sono invece meno noti i postbiotici, metaboliti prodotti dal metabolismo dei microrganismi probiotici, che agiscono in maniera indiretta sui tessuti dell'organismo ospite e/o su altri microrganismi contribuendo in questo modo a veicolare gli effetti positivi dei probiotici stessi.

Disbiosi vaginale

Il microbiota vaginale è un sistema complesso e dinamico influenzato da vari fattori quali genetica, alimentazione, fattori ambientali e comportamentali. È composto da oltre 200 specie microbiche, normalmente lattobacilli. Gli squilibri nel microbiota vaginale possono essere associati ad infezioni vaginali ricorrenti con conseguenze ginecologiche e ostetriche. La disbiosi vaginale è causata da una riduzione del numero di lattobacilli e da un aumento di microrganismi quali *Candida albicans* e *Gardnerella vaginalis*. (Marrazzo J.M. *et al* 2013).

Candida albicans è un lievito dimorfo normalmente presente nel microbiota intestinale ma può colonizzare anche quello vaginale.

Quando l'equilibrio dei microrganismi nella vagina viene alterato, può proliferare e causare infezione istaurando una condizione comune caratterizzata da prurito, bruciore e secrezioni vaginali bianche (Bradshaw C.S., *et al* 2016).

Gardnerella vaginalis è un batterio che può causare vaginosi batterica (BV), una condizione caratterizzata da secrezioni vaginali grigie o bianche ed un forte odore di pesce. La vaginosi batterica è causata dall'aumento dei microrganismi anaerobi nella vagina e dalla diminuzione del numero di lattobacilli (Donders G.G.G. *et al* 2021).

La vagina costituisce il tratto riproduttivo inferiore esposto all'ambiente esterno, pertanto, le cellule epiteliali che rivestono il tratto vaginale sono costantemente esposte ai microrganismi commensali e patogeni, rappresentando un sito primario di interazione ospite-microbo. Le donne con infezioni acute e ricorrenti mostrano una ridotta integrità della barriera epiteliale e una minore capacità di guarigione delle ferite (Mohammedsaeed W, *et al* 2015; Rohani MG, *et al* 2015). La *Candida albicans* può invadere la vagina e aderire alle cellule vaginali, causando danni alla parete vaginale e provocando una risposta infiammatoria. Inoltre, la *Candida albicans* produce enzimi che distruggono la barriera protettiva della vagina, consentendo ad altri patogeni di penetrare e causare ulteriori danni. *Gardnerella vaginalis*, d'altra parte, produce biofilm, una matrice extracellulare che protegge il batterio dal sistema immunitario e dagli antibiotici. Il biofilm può causare un'infiammazione cronica e ridurre la produzione di acido lattico, che è necessario per mantenere l'ambiente vaginale acido e prevenire la proliferazione di patogeni (Sobel J.D. *et al* 2016).

La gestione della disbiosi vaginale causata da *C. albicans* e *G. vaginalis* dipende dalla gravità dei sintomi e dalla causa sottostante. Le infezioni lievi possono essere trattate con antifungini o antibiotici, mentre le infezioni più gravi possono richiedere un trattamento più aggressivo che spesso induce al fenomeno dell'antibiotico resistenza, l'aumento del rischio degli effetti collaterali associati ai farmaci e la conseguente diminuzione del fisiologico microbiota lattobacillare.

Tale patologia spesso cronicizza o recidiva rappresentando un serio problema sanitario che impatta notevolmente sulla salute e la qualità di vita delle donne che ne sono affette. Ispirandosi alle similitudini della complessità del microbiota intestinale e vaginale e al successo del trapianto di microbiota fecale (FMT), anche per il trattamento della disbiosi batterica vaginale è stato proposto il trapianto di microbiota vaginale (VMT).

Questa procedura prevede il trapianto dell'intero microbiota vaginale di una donatrice sana nella vagina della paziente affetta da disbiosi al fine di ripristinare la biodiversità, la stabilità e la normale composizione del microbiota (DeLong, K. *et al.*, 2019).

In questo scenario, data la complessità della VMT, anche l'uso di probiotici vaginali se opportunamente selezionati e mirati può aiutare a ripristinare/mantenere l'equilibrio dei microrganismi nella vagina e prevenire la proliferazione di patogeni (Diop K. *et al* 2021).

1.2 I Probiotici

Fin dall'antichità i prodotti fermentati contenenti microrganismi viventi sono stati utilizzati dall'uomo per i riconosciuti effetti benefici sulla salute.

In una versione dell'Antico Testamento la longevità di Abramo veniva attribuita al consumo di latte acido (Sánchez B. *et al.*, 2017). In India bevande a base di latte fermentato erano note già dall' VII sec A.C. (Markowiak P. and Ślizewska K., 2017).

Ippocrate (400 a.C.), intuendo l'importanza dell'omeostasi gastrointestinale e dei fenomeni di disbiosi, affermava che “la morte risiede e origina nell'intestino”. Le ricerche condotte negli ultimi decenni hanno fornito le prove dell'importanza del microbiota. (Sanchez B. *et al.*, 2017). Pertanto, non sorprende il crescente interesse rivolto ai probiotici, specie batteriche favorevoli alla salute dell'organismo; infatti, l'etimologia rimanda al significato greco-latino “a favore della vita”.

La prima significativa introduzione del concetto di probiotico risale agli inizi del 1900, quando lo scienziato russo Elie Metchnikoff, premio Nobel per la medicina, ipotizzò che la longevità dei contadini bulgari fosse attribuibile a una complessa popolazione microbica intestinale dovuta a un elevato consumo di lattici fermentati (Metchnikoff E., 1907). Lo scienziato ha scritto nel suo libro “Studi sull'ottimismo”: “*con vari alimenti sottoposti a fermentazione di acido lattico e consumati crudi (latte acido e kefir) gli esseri umani introducono grandi quantità di batteri lattici nei loro tratti gastrointestinale.*” (Markowiak P. and Ślizewska K., 2017). Probabilmente è stato Ferdinand Vergin a coniare per la prima volta il termine probiotico nel 1954, nel suo articolo “Anti-und Pobietika”.

Vergin confrontava gli effetti nocivi di antibiotici ed altre sostanze sul microbiota intestinale con gli effetti benefici di alcuni batteri utili (i probiotici) (Vergin F., 1954).

Infine, la definizione di probiotico si è evoluta fino ad approdare a quella del 2002 della *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che definisce i probiotici come “*Microrganismi vivi che, somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio sulla salute dell'ospite*” (Hill C. *et al.*, 2014).

Caratteristiche dei microrganismi probiotici

Affinché un microrganismo possa definirsi probiotico deve essere isolato dal tratto intestinale di individui sani, resistere all'acidità dello stomaco e all'azione della bile, sopravvivere nel tratto gastrointestinale e aderire alla mucosa (riproducendosi), essere perfettamente tollerabile e avere effetti benefici per la salute antagonizzando i microrganismi patogeni e producendo sostanze antimicrobiche.

“Sulla base delle evidenze scientifiche disponibili, la quantità minima sufficiente per ottenere una temporanea colonizzazione dell'intestino da parte di un ceppo di fermento lattico è di almeno 10^9 cellule vive per ceppo e per giorno. La porzione di prodotto raccomandata per il consumo giornaliero deve, quindi, contenere una quantità pari a 10^9 di cellule vive per almeno uno dei ceppi presenti nel prodotto. L'uso di quantità diverse può essere consentito solo se il rationale per tale scelta è supportato da adeguati studi scientifici. La quantità di cellule vive presenti nel prodotto deve essere riportata in etichetta per ogni ceppo e deve essere garantita, alle modalità di conservazione suggerite, fino al termine della shelf-life, con una incertezza di 0,5 log.”

(Ministero della Salute, 2013).

Secondo i suggerimenti dell'OMS, della FAO e dell'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), per poter essere adoperati, i ceppi di probiotici devono soddisfare criteri di sicurezza e funzionalità, alcuni dei quali riportati in Tabella 1 (Markowiak P. and Śliżewska K., 2017).

Tabella 1 Criteri per la scelta dei ceppi probiotici suggeriti da OMS, FAO, e EFSA.

Criterio	Proprietà richieste
Sicurezza	Origine umana
	Documentato uso sicuro
	Identificazione diagnostica precisa (fenotipo e tratti genotipici)
	Assenza di dati relativi a un'associazione con malattie infettive
	Assenza della capacità di separare i sali degli acidi biliari
	Nessun effetto collaterale
	Assenza dei geni responsabili della resistenza agli antibiotici localizzati in elementi non stabili
Funzionalità	Competitività rispetto al microbiota intestinale
	Capacità di sopravvivere, mantenere l'attività metabolica e di crescere nel sito di destinazione
	Resistenze ai Sali biliari e agli enzimi
	Resistenza al basso pH dello stomaco
	Attività antagonista nei confronti di agenti patogeni
	Resistenza alle batteriotossine e agli acidi prodotti dal microbiota intestinale endogeno
	Aderenza e capacità di colonizzare alcuni siti particolari all'interno dell'organismo ospite e un adeguato tasso di sopravvivenza nel sistema gastrointestinale

I microrganismi potenzialmente probiotici appartengono principalmente ai seguenti generi: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e ad alcuni ceppi di lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* (Markowiak P. and Śliżewska K., 2017).

I ceppi destinati ad uso umano possono essere suddivisi in probiotici alimentari e farmaceutici. I primi contribuiscono alle proprietà organolettiche e nutrizionali dei cibi, i secondi trovano applicazione nel trattamento delle patologie legate a disbiosi (Tabella 2).

Tabella 2 Ceppi potenzialmente probiotici usati come: (a) prodotti farmaceutici; (b) additivi alimentari.

Ceppi potenzialmente probiotici

<i>Lactobacillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> -<i>L. acidophilus</i> (a) -<i>L. amylovorus</i> (b) -<i>L. casei</i> (a) (b) -<i>L. gasseri</i> (a) -<i>L. helveticus</i> (a) -<i>L. johnsonii</i> (b) -<i>L. pentosus</i> (b) -<i>L. plantarum</i> (b) -<i>L. reuteri</i> (a) -<i>L. rhamnosus</i> (a) (b)
<i>Bifidobacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> -<i>B. adolescentis</i> (a) -<i>B. animalis</i> (a) -<i>B. bifidum</i> (a) -<i>B. breve</i> (b) -<i>B. infantis</i> (a) -<i>B. longum</i> (a)
Altri batteri lattici	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Enterococcus faecium</i> (a) -<i>Lactococcus lactis</i> (b) -<i>Streptococcus thermophilus</i> (a)
Altri microorganismi	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Bacillus clausii</i> (a) -<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (a) -<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardi) (a)

I batteri acidi lattici (LAB), che per milioni di anni sono stati utilizzati nella conservazione

degli alimenti, possono avere un duplice ruolo: di agenti per la fermentazione alimentare e di agenti benefici per la salute. Le fonti più comuni di probiotici alimentari sono i prodotti casearie attualmente proliferano in commercio gli alimenti fortificati (Guarner F. *et al.*, 2011).

Sono prodotti di rapida degradabilità, contenenti microrganismi vivi, vanno quindi consumati il più possibile freschi di produzione e conservati a basse temperature. Per ovviare a questi inconvenienti i batteri vengono essiccati o preferibilmente liofilizzati perché con l'essiccamento si raggiungono temperature relativamente alte che alcuni lattobacilli non tollerano.

Applicazioni cliniche dei probiotici

Studi molecolari e genetici hanno permesso di determinare che le basi degli effetti benefici dei probiotici, coinvolgono principalmente quattro meccanismi:

1. competizione con agenti patogeni per l'adesione all'epitelio e per le sostanze nutritive;
2. miglioramento della funzione di barriera del rivestimento epiteliale;
3. immunomodulazione;
4. influenza sugli altri organi del corpo mediante il sistema immunitario e la produzione di neurotrasmettitori (come il GABA o la serotonina).

Infatti, in seguito all'interazione e all'adesione alle cellule dell'epitelio intestinale dell'ospite, i probiotici riescono a contrastare gli enteropatogeni, limitando l'accesso alle molecole bersaglio presenti sulla superficie degli enterociti, utilizzate per avviare il processo di invasione. Sono, inoltre, in grado di produrre sostanze antimicrobiche (batteriocine) che vanno ad agire sui batteri patogeni migliorando lo stato di salute dell'ospite. Hanno anche la capacità di influenzare la risposta di tipo umorale. Infatti, numerosi studi scientifici, evidenziano che un trattamento con probiotici del tipo *L. casei* e *L. acidophilus* determina un innalzamento della produzione di IgA nel tessuto linfoide associato all'intestino (GALT) che, formando immunocomplessi con gli antigeni, impediscono il loro passaggio attraverso la mucosa intestinale (Mantis N.J. *et al.*, 2011).

I probiotici modulano la risposta mediata dalle cellule T nell'epitelio intestinale attraverso la produzione di citochine. Inoltre, è stato rilevato che i lattobacilli sono in grado di stimolare l'attività dei macrofagi verso differenti specie di batteri (Markowiak P. and Śliżewska K., 2017). Negli ultimi decenni sono stati pubblicati numerosi lavori sulle applicazioni terapeutiche dei ceppi potenzialmente probiotici usando approcci *in vitro* ed *in vivo*. In numerosi studi è emerso il loro effetto benefico nel trattamento e nella prevenzione delle malattie gastrointestinali, ma le applicazioni dei probiotici sono molto più ampie in tutte le fasi della vita (Gibson G. R. *et al.*, 2017) (Figura 3).

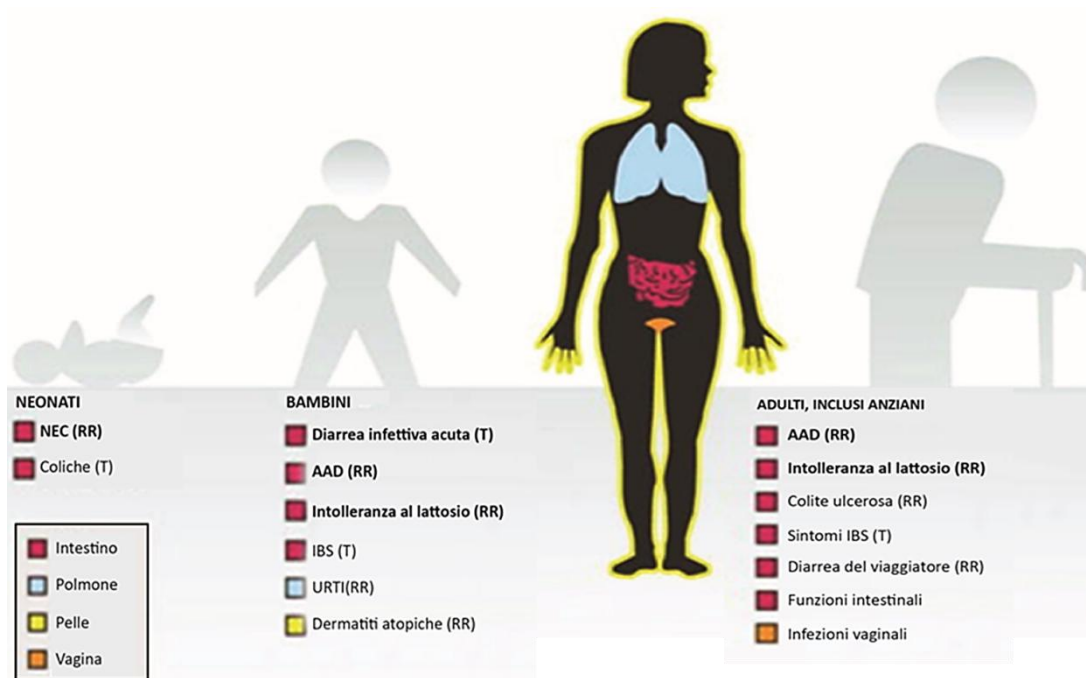


Figura 3 Patologie sulle quali i probiotici hanno dimostrato effetti benefici raggruppate per età. L'efficacia maggiore si riscontra nelle condizioni mostrate in grassetto. AAD, diarrea associata agli antibiotici; CID, malattie infettive comuni; IBS, sindrome dell'intestino irritabile; NEC, enterocolite necrotizzante; RR, rischio ridotto; T, trattamento; URTI, infezioni del tratto respiratorio superiore (Sanders M.E. *et al.*, 2013).

Nello specifico, i probiotici sono particolarmente efficaci nel trattamento di molte patologie nei modi seguenti:

- agiscono contro i patogeni enterici e influenzano il microbiota e il sistema immunitario favorendo uno stato antiinfiammatorio in pazienti affetti da diarrea infettiva e malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. In combinazione con la terapia standard migliorano notevolmente il tasso di eradicazione dell'*Helicobacter pylori* (Sánchez B. *et al.*, 2017);

- prevencono l'invasione di cellule tumorali del colon, suggerendo che i probiotici come *L. casei* e *L. rhamnosus* GG abbiano sostanze bioattive anti-metastatiche (Motevaseli E. *et al.*, 2017);
- presentano una elevata attività β -galattosidasi responsabile della scissione del lattosio a glucosio e galattosio. A tal proposito, diverse prove scientifiche confermerebbero la mitigazione della sintomatologia provocata dall'intolleranza al lattosio in seguito al consumo di yogurt e latte fermentato contenenti probiotici (Staudacher H., 2015);
- hanno un'azione ipocolesterolemizzante e contribuiscono alla prevenzione di obesità e aterosclerosi (Gilliland S., 1985; Ooi L.G. and Liong M.T., 2010; Duranti S. *et al.*, 2017);
- riducono considerevolmente il rischio di manifestare il diabete di tipo I nei bambini predisposti allo sviluppo della patologia sebbene non sia ancora chiaro il meccanismo che vi è alla base (Heeney D.D. *et al.*, 2017; Uusitalo U. *et al.*, 2016);
- riducono la formazione di placche cariogene grazie al potere probiotico di *Streptococcus salivarius* K12, microrganismo commensale che inibisce la crescita di importanti streptococchi cariogeni (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) competendo per i siti dentali durante la colonizzazione orale iniziale (Babina, K., et al., 2022);
- ristabiliscono l'equilibrio del microbiota, soprattutto in caso di infezioni del tratto genito-urinario, vaginosi batteriche e infezioni da lieviti. Sono tuttavia necessari studi ulteriori per valutare la sicurezza e l'efficacia di questi trattamenti (Chanda W. *et al.*, 2017);
- alleviano la sintomatologia di alcune patologie della pelle come acne, dermatite atopica e psoriasi, sembrerebbero rispondere positivamente all'utilizzo di ceppi potenzialmente probiotici come il *L. plantarum* (Abrahamsson T.R. *et al.*, 2011);
- modulano il sistema immunitario dei pazienti allergici desensibilizzandolo in caso di atopie, allergie alimentari e infezioni respiratorie (Ouweland A.C., 2007);

- hanno un effetto antinfiammatorio come riportato da alcuni studi che correlano l'artrite reumatoide alle infezioni intestinali o all'azione di allergeni alimentari. In queste circostanze la mucosa intestinale risulta danneggiata, ne consegue un'aumentata permeabilità con il passaggio di anticorpi che aggrediscono le strutture dell'organismo stesso ed innescano un processo infiammatorio (Sandhya P. *et al.*, 2015). È stato osservato che in pazienti trattati con *L. casei*, la severità della malattia risulta ridotta, con maggiori quantità di IL-10 nel siero e una riduzione dei livelli di TNF α , IL-6 e IL-12 (Heeney D.D. *et al.*, 2017);
- possono influenzare la sintomatologia della sclerosi multipla attraverso la connessione dell'asse intestino-cervello. Tuttavia sono necessari studi più estesi per determinare il ruolo reale del microbiota in questa malattia (De Oliveira G.L.V. *et al.*, 2017);
- incrementano i livelli intestinali di serotonina che, tramite l'asse intestino-cervello, riequilibra i livelli ormonali coinvolti in depressione e ansia (Vlainić J.V. *et al.*, 2016). Il trattamento con probiotici corregge la permeabilità intestinale, altera la composizione microbica e migliora i difetti comportamentali ansia-like e cognitivo-motori tipici del disturbo dello spettro autistico (ASD) (Shaaban S.Y. *et al.*, 2017);
- agiscono positivamente anche sulle malattie neurodegenerative; in particolare, per ciò che concerne l'Alzheimer, grazie ad enzimi proteolitici che degradano gli accumuli di proteina beta-amiloide e all'aumento della concentrazione di alcuni ormoni (greлина, leptina, GLP-1 e GIP), i probiotici influenzano positivamente i processi di apprendimento e di memoria giocando un ruolo importante nella prevenzione e nel trattamento della malattia (Akbari E. *et al.*, 2016);
- favoriscono un rilevante aumento della motilità intestinale in pazienti affetti da costipazione dovuta al morbo di Parkinson (Barichella M. *et al.*, 2016).

1.3 Il latte materno come fonte di probiotici

Ai probiotici sono riconosciute proprietà antitumorali, antinfiammatorie, antiallergiche, antimicrobiche, antiossidanti, antiobesità e ipocolesterolemiche (Bhat e Bajaj 2020). Queste proprietà sono strettamente correlate alla fonte di isolamento, alla specie microbica e al ceppo specifico (Pino *et al.* 2019) e incrementano l'interesse per il mantenimento e il potenziamento della biodiversità di probiotici specifici nella gestione di problemi mirati legati alla salute. (Javed S *et al* 2023)

Il latte materno umano è stato ampiamente studiato per esplorare la sua composizione unica alla base della quale ci sono composti bioattivi come glioligosaccaridi del latte umano (HMO), che hanno un effetto bifidogenico; la lattoferrina, che svolge un ruolo nello sviluppo gastrointestinale e cerebrale; e la colina, anch'essa importante per lo sviluppo cerebrale del bambino (Ahern, G.J *et al.*, 2019). Oltre ai macro e micronutrienti e ai composti bioattivi, il latte materno umano contiene una pletera di specie batteriche. In passato, i batteri isolati dal latte materno erano considerati un contaminante proveniente dalla pelle della madre e dalla cavità orale del bambino o da metodi di manipolazione o conservazione non corretti (Heikkilä, M.P. *et al.*,2003). Ad oggi è ampiamente accettato che il latte materno abbia un proprio microbiota, costituito principalmente dai generi *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Figura 4) (Anjum *et al.* 2020, Javed *et al.* 2022).

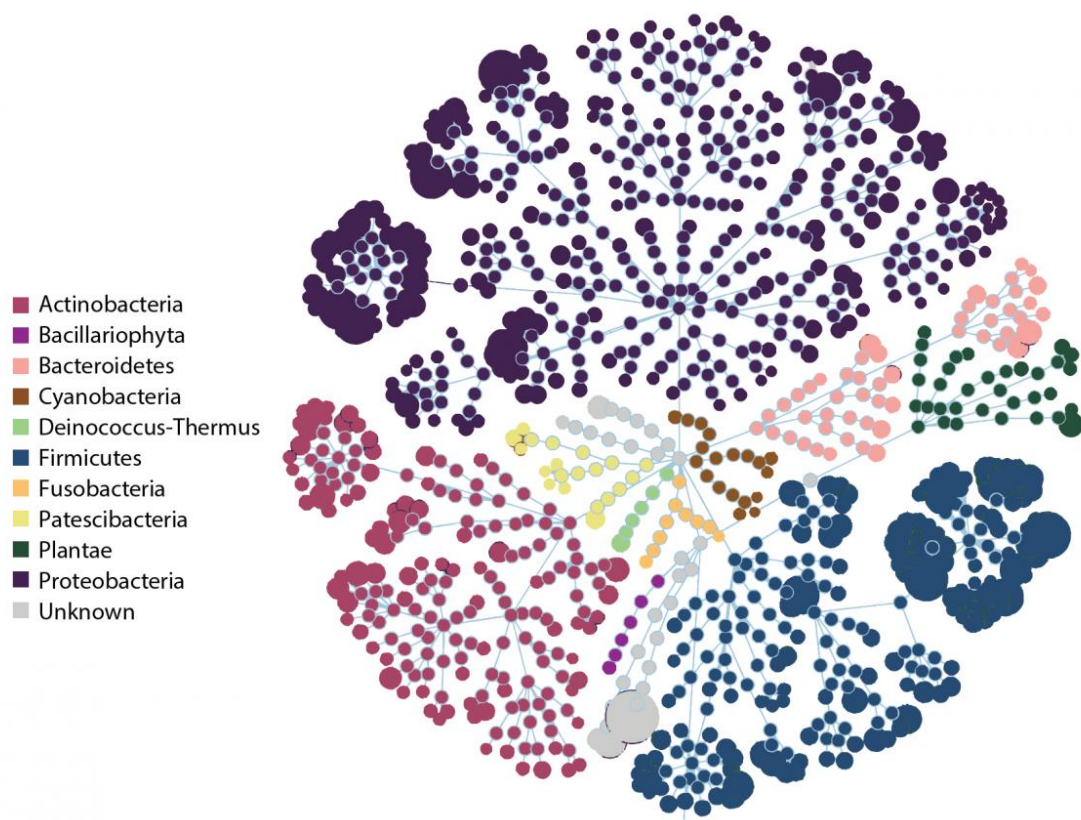


Figura 4 Diagramma a fiore che rappresenta i maggiori phyla batterici presenti nel microbiota del latte materno umano (Gonzalez *et al.*, 2021).

L'origine delle popolazioni microbiche nel latte non è pienamente compresa ed è molto dibattuta. Tradizionalmente, si riteneva che il microbioma del latte fosse il risultato della contaminazione della pelle della madre durante la suzione del bambino e molti studi notano le somiglianze tra il microbioma della pelle dell'adulto e il microbioma del latte, in particolare tra i generi *Staphylococcus* e *Corynebacterium* (Pannaraj, P. *et al.*,2017 Dimitriu, P.A. *et al.*,2019). Tuttavia, la scoperta di specie anaerobiche associate ad ambienti intestinali come gli *archaea*, che non sono in grado di esistere in ambienti aerobici, ha suscitato interesse per la complessità delle origini dei batteri nel latte materno (Togo, A. H. *et al.*,2019). Queste scoperte suggeriscono che i microrganismi vivi provenienti dall'intestino materno si spostano attraverso un percorso endogeno verso la ghiandola mammaria, grazie alla presenza di una via entero-mammaria (Figura 5). Questa traslocazione comporta complesse interazioni tra cellule epiteliali, cellule immunitarie e batteri (Rodríguez, J.M. *et al.*, 2014). Le prove a sostegno della via entero-mammaria includono la presenza di comunità microbiche nel colostro raccolto prima della prima poppata (Damaceno, Q.S.; *et al.*, 2017).

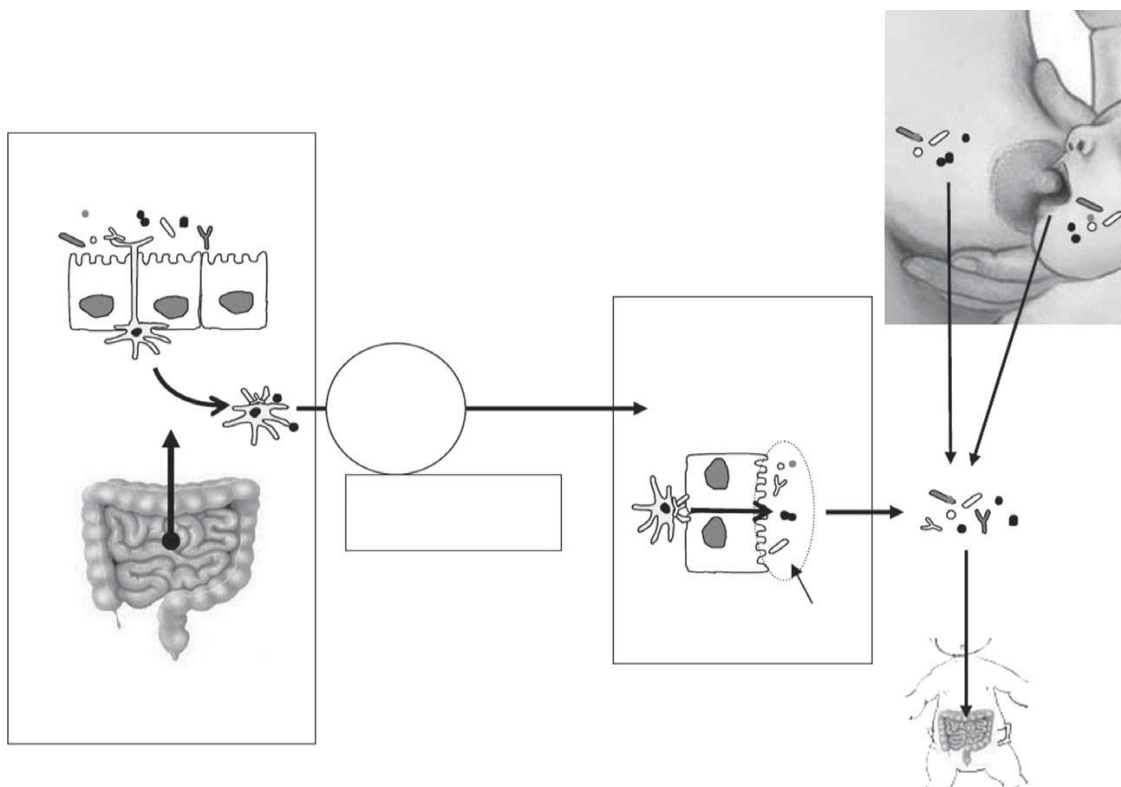


Figura 5 La via enteromammaria: le cellule dendritiche (DC) intrappolano i batteri intestinali e li trasportano nella lamina propria e da lì ai linfonodi mesenterici dove possono rimanere diversi giorni. Una volta all'interno delle DC e/o dei macrofagi, i batteri intestinali possono diffondersi in altre sedi, come la ghiandola mammaria, poiché esiste una circolazione linfocitaria all'interno del sistema linfoide associato alla mucosa. (Bergmann *et al* 2014).

Le variazioni del microbiota del latte possono essere attribuite a molti fattori come la dieta materna, la genetica, la salute, la modalità del parto, le differenze demografiche o ambientali (Li, S. et al., 2017). Sono state avviate diverse ricerche per valutare l'impatto di questi fattori sul microbioma del latte. In particolare, molti studi hanno evidenziato che il parto cesareo è associato a concentrazioni microbiche totali più elevate all'inizio della lattazione (giorni 1-16), con livelli significativamente più alti di *Streptococcus* spp. e significativamente più bassi di *Bifidobacterium* spp. rispetto al parto vaginale (Khodayar-Pardo, P. et al., 2014). La composizione microbica del latte è stata associata a cambiamenti significativi in seguito alla modalità del parto e all'esposizione agli antibiotici *intrapartum* (Hermansson et al. 2019). Gli effetti dell'antibiototerapia sulla composizione del microbiota del latte hanno condotto al rilevamento di una quantità significativamente inferiore di *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* spp. nei campioni di donne che avevano ricevuto antibiototerapia durante la gravidanza e l'allattamento (Soto A. et al., 2014). In relazione alle pratiche di allattamento al seno, quello esclusivo è stato associato a comunità microbiche più sane nell'intestino del bambino (Ho et al., 2018), ma si ritiene che l'allattamento al seno predominante non differisca in maniera significativa all'allattamento al seno esclusivo (Bokulich et al., 2016, Carvalho-Ramos et al., 2018). Tuttavia, la sospensione del latte materno e l'introduzione di alimenti solidi, come azioni separate, hanno dimostrato di modificare la composizione microbica dell'intestino del lattante (Figura 6) (Bäckhed et al., 2015, Koenig et al., 2011).

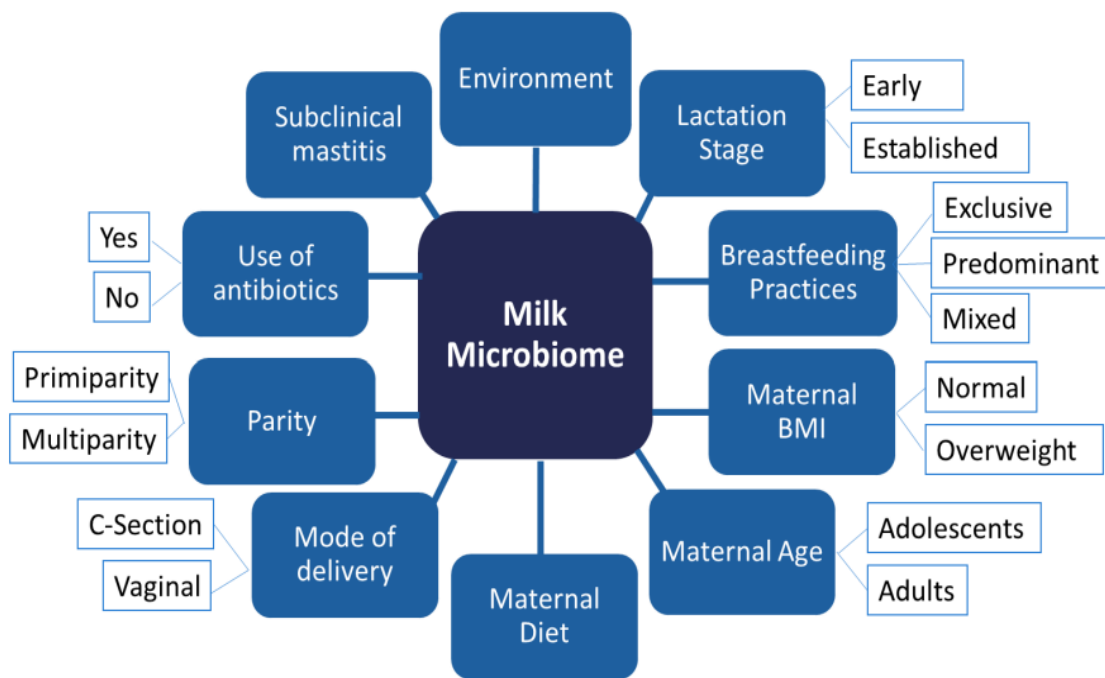


Figura 6 Fattori che influenzano il microbiota del latte materno.

Il latte materno è la seconda fonte di microrganismi per il bambino, dopo il canale vaginale per quelli nati con parto naturale ed è stato stimato che i bambini allattati al seno assumano fino a 8×10^5 batteri ogni giorno (Pannaraj P.S. *et al.*, 2017). Esso svolge un ruolo fondamentale nell'inoculazione dei microrganismi nell'intestino del bambino dopo la nascita. Il riconoscimento del microbioma del latte umano come risorsa per la salute del neonato ha portato a numerose ricerche volte a chiarirne i meccanismi d'azione, che comprendono la produzione di composti antimicrobici, la prevenzione dell'adesione di batteri patogeni all'epitelio intestinale e il potenziamento della produzione di mucina intestinale (Olivares M. *et al.*, 2006). Poiché sono stati accertati i benefici per la salute dei batteri presenti nel latte materno, l'isolamento di potenziali ceppi probiotici dal latte è stato al centro di varie ricerche (Jara S. *et al.*, 2011)

I probiotici provenienti da questa fonte dovrebbero soddisfare quasi tutti i requisiti chiave per lo status di Generally Regarded As Safe (GRAS) e potrebbero avere ampia diffusione di utilizzo (Rajoka *et al.* 2019).

Il microbiota del latte umano è composto da molte specie appartenenti ai generi di *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, come *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus salivarius* [Rajoka, M.S.R *et al.*, 2017, Olivares M. *et al.*, 2006, Belhadj, F.Z.B. *et al.*, 2020).

Limosilactobacillus fermentum

Il *Limosilactobacillus fermentum*, precedentemente noto come *Lactobacillus fermentum*, è un batterio lattico che appartiene alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, Gram-positivo, non sporigeno e anaerobio facoltativo. La sua forma è quella di un bastoncino corto, generalmente curvo o a forma di virgola, con una lunghezza di circa 1-3 μm e un diametro di 0,5-1,0 μm ; può disporsi singolarmente o formare catenelle (Felis G. and Dellaglio F., 2007).

L. fermentum è stato inizialmente classificato nel genere *Lactobacillus*, ma nel 2020 è stato ridefinito come membro del nuovo genere *Lactiplantibacillus*, insieme ad altri batteri lattici della famiglia *Lactobacillaceae*. La revisione della tassonomia è stata basata su dati filogenetici, fenotipici e genomici (Zheng, J., *et al.*, 2020). È un batterio eterofermentativo, il suo metabolismo può essere influenzato dalla presenza di ossigeno, pH e temperatura. Può utilizzare vari substrati, tra cui glucosio, fruttosio, saccarosio, lattosio e maltosio e produrre diversi metaboliti come acido lattico, acido acetico, etanolo e CO_2 . La produzione di acido lattico è importante poiché contribuisce alla conservazione degli alimenti e alla regolazione dell'equilibrio microbico dell'intestino e della vagina. *L. fermentum* è in grado di produrre diversi enzimi come proteasi, amilasi, lipasi e β -galattosidasi, che sono importanti per la sua capacità di utilizzare diverse fonti di nutrienti (Liu, G. X. *et al.*, 2011).

L. fermentum ha diverse proprietà probiotiche, come la capacità di resistere al pH acido dello stomaco e di aderire alla mucosa intestinale migliorandone la salute e stimolando la crescita di batteri benefici nel microbiota residente che, di conseguenza, ne riduce l'infiammazione. Inoltre, può migliorare la regolarità intestinale e ridurre i sintomi della sindrome dell'intestino irritabile (IBS) (Cai H. *et al* 2019).

Può aiutare a prevenire e trattare le infezioni batteriche e fungine, ad esempio può inibire la crescita di *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Candida glabrata* (Ortiz L., 2014; Zangl I. 2023). Infine, può modulare il sistema immunitario, aumentando la produzione di anticorpi e migliorando la risposta immunitaria, ma anche la tolleranza agli allergeni (Mu, Q. et al., 2018; Isolauri, E. et al., 2021). *L. fermentum* è uno dei batteri lattici presenti anche nel microbiota vaginale, è in grado di produrre acido lattico, acidi organici e sostanze antibatteriche che possono impedire la crescita di microrganismi patogeni. Inoltre, modulando il microbiota vaginale influenza il sistema immunitario e favorisce, quindi, la prevenzione delle infezioni vaginali (Ravel, J., et al., 2011; Marcone, V. et al., 2016; Vitali, B. et al., 2016; Petrova, M. I. et al., 2015). Il *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716 è un ceppo isolato dal latte umano che ha mostrato un effetto benefico sull'evoluzione della mastite, sulla riduzione delle infezioni gastrointestinali nei bambini e sulla modulazione della disbiosi intestinale (Rodríguez-Sojo, M. J., et al., 2021).

Lactiplantibacillus plantarum

Il *Lactiplantibacillus plantarum* è un batterio lattico appartenente al genere *Lactobacillus*, bacillo gram-positivo, non mobile, non sporigeno, microaerofilo e mesofilo, può crescere a 10-15°C, ma non sopravvive a 45°C. Le cellule sono di forma bastoncellare diritta con estremità arrotondate, 0,9-1,2 3,0-8,0 µm, presenti singolarmente, in coppia o in brevi catene (Felis G. and Dellaglio F., 2007).

Inizialmente, è stato classificato nel genere *Lactobacillus*, ma nel 2020 è stato ridefinito come membro del nuovo genere *Lactiplantibacillus*, insieme ad altri batteri lattici della famiglia *Lactobacillaceae* (Zheng, J., et al., 2020).

L. plantarum rientra nel gruppo dei lattobacilli eterofermentanti facoltativi; gli esosi sono convertiti quasi interamente in acido lattico attraverso la via di Embden-Meyerhof-Parnas, mentre i pentosi sono convertiti in acido lattico e acetico attraverso la via della fosfogluconato/fosfochetolasi per induzione della fosfochetolasi (Corsetti, A., et al., 2008). Ha un complesso sistema proteolitico per la degradazione dei peptidi ed ha la capacità di sintetizzare aminoacidi *de novo*. Questo lattobacillo si trova in molti *habitat* ricchi di nutrienti, quali i prodotti caseari, i vegetali e le piante, ma è stato rinvenuto anche nella cavità orale umana e nel tratto gastrointestinale (Molin G. et al., 1993).

La capacità di adattarsi a diverse condizioni ambientali deriva dall'ampiezza del suo genoma e dall'abbondante e ridondante patrimonio genico. Numerosi geni codificano per le proteine superficiali suggerendo che abbia capacità di legarsi a diverse superfici promuovendo aggregazione e adesione intercellulare (Kleerebezem M. *et al.*, 2003). A tal proposito, infatti, per molti ceppi di *L. plantarum* è stata riscontrata la capacità di sopravvivere a pH acido ed ai sali biliari (De Vries M.C. *et al.*, 2006). *L. plantarum* mostra un'adattabilità ecologica e metabolica ed è in grado di abitare una serie di nicchie ecologiche, tra cui il tratto gastrointestinale e vaginale dei mammiferi (Filannino *et al.*, 2018).

I batteri lattici, come *L. plantarum*, presentano una elevata attività β -galattosidasica responsabile della scissione del lattosio a glucosio e galattosio. Infatti, diverse prove scientifiche confermerebbero la mitigazione della sintomatologia provocata dall'intolleranza al lattosio in seguito al consumo di yogurt e latte fermentato contenenti probiotici (Cebeci A. and Gürakan C., 2003; Staudacher H., 2015). Alcune patologie della pelle quali l'acne, la dermatite atopica e la psoriasi, rispondono positivamente all'utilizzo di ceppi potenzialmente probiotici come il *L. plantarum* (Abrahamsson T.R. *et al.*, 2011). Inoltre, un recente studio ha dimostrato la sua potenzialità nell'attenuazione della pancreatite indotta da *Coxsackievirus* (Yu, X., *et al.*, 2023).

L'attività probiotica può essere esplicitata anche tramite la produzione delle batteriocine, proteine o peptidi sintetizzati a livello ribosomiale, spesso cationici, anfifilici e permeabilizzanti di membrana, che inibiscono la crescita di altri batteri. Le batteriocine prodotte da *L. plantarum* sono comunemente indicate come plantaricine (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2022).

2 Scopo dello studio

L'utilizzo dei probiotici è stato proposto, spesso con risultati incoraggianti, nel trattamento di numerose condizioni, patologiche e non. La funzione dei probiotici è quella di promuovere la proliferazione e l'equilibrio della composizione microbica che costituisce il fisiologico microbiota residente. Nonostante molti aspetti dell'azione dei probiotici siano ancora da chiarire, è ormai noto il loro effetto positivo sulla salute umana. Questo dipende, in prima istanza, dalla modulazione inibitoria della proliferazione di patogeni a livello del sito di azione. Questa attività viene espletata a vari livelli, tra cui la competizione per i siti di adesione alle cellule umane. La selezione di ceppi batterici con potenzialità probiotiche richiede la valutazione di importanti caratteristiche per determinarne l'efficacia. Poiché i *target* terapeutici possono essere molteplici, ad esempio le mucose gastriche, intestinali e vaginali, è necessario condurre una caratterizzazione iniziale di base dell'identità del ceppo e della tassonomia, seguita da una valutazione con saggi convalidati (Sanders M. E. *et al* 2008). I benefici dei probiotici sono strettamente connessi all'abilità di permanere nei siti *target* dove esplicano i loro effetti positivi. Per tale ragione, la capacità di adesione e colonizzazione da parte dei microrganismi è un requisito fondamentale per valutarne le potenzialità probiotico-terapeutiche (Santarmaki V. *et al* 2017).

Partendo da questi presupposti, l'obiettivo di questo progetto di dottorato è stato quello di isolare dal latte materno ceppi batterici che esplichino le loro potenzialità probiotiche sulla salute umana. Più in dettaglio, il programma sperimentale ha cercato di delineare le caratteristiche di sicurezza e funzionalità dei ceppi isolati dal latte materno, andando a valutarne le potenzialità probiotico-terapeutiche soprattutto a livello vaginale. Dopo avere validato la sensibilità agli antibiotici in accordo con i criteri dell'EFSA, i ceppi isolati dal latte materno sono stati identificati fenotipicamente e geneticamente. Successivamente, sono stati analizzati i criteri di funzionalità quali le proprietà chimico fisiche della superficie cellulare e la capacità di sopravvivere attraverso il tratto gastro intestinale per valutare l'opportunità della somministrazione per via orale. In conclusione, è stata saggiata l'attività probiotica considerando sia l'antagonismo nei confronti dei patogeni *in vitro* su linee cellulari vaginali VK2 E6/E7, che la capacità di prevenire e disgregare il biofilm e di favorire il *wound healing* dell'epitelio vaginale.

3 Materiali e metodi

3.1 Popolazione in studio

I campioni di latte umano sono stati raccolti da puerpere volontarie che hanno aderito spontaneamente donando il proprio latte collezionati in due tempi distinti.

Il primo campionamento è stato effettuato entro 10 giorni dal parto (T0) il secondo dopo l'inizio dell'alimentazione complementare (T1).

Lo studio è stato effettuato su campioni di latte materno (2 mL circa) donato da 51 volontarie in apparente buona salute (ABS) che non avevano assunto antibiotici nel recente passato ed anamnesticamente negative per patologie infettive, infiammatorie, autoimmuni o metaboliche. Sono state valutate le seguenti variabili: tipo di parto vaginale o cesareo, indice di massa corporea, alterazioni cutanee del seno, come allergie o dermatiti, uso di antibiotici, età e numero di gravidanze pregresse.

3.2 Tecniche di isolamento dei microrganismi

I campioni raccolti in provette sterili, tramite estrattore di latte automatico previamente sterilizzato o manualmente previa detersione delle mani e del seno con acqua e sapone neutro, sono stati trasportati in laboratorio in borsa isoterma a 4°C e sottoposti ad analisi microbiologica entro 8 ore dal prelievo. Una porzione del campione è stata conservata a -80°C per eventuali analisi molecolari. Per valutarne la composizione microbica, diluizioni seriali dei campioni freschi sono state seminate direttamente sui seguenti terreni colturali agarizzati secondo differenti condizioni di crescita:

- Man Rogosa and Sharpe (MRS). Semina in inclusione per creare microaerofilia/anaerobiosi. Incubazione a 37°C per 24-48 ore per la ricerca di *Lactobacillus spp*;
- Bifidobacteria Selective Medium (BSM) Semina in inclusione per creare microaerofilia/anaerobiosi. Incubazione a 37°C per 24-48 ore per la ricerca di *Bifidobacterium spp*;
- M17 Semina in inclusione per creare microaerofilia. Incubazione a 37°C per 24-48 ore per la ricerca di *Lactococcus spp*.

Identificazione microscopica

In seguito all'isolamento su terreni differenziali, le colonie microbiche sono state sottoposte alla colorazione di Gram e quindi differenziati in batteri Gram positivi e negativi.

Saggio della Catalasi

Le colonie batteriche sono state sottoposte al saggio della catalasi per verificare la presenza di questo enzima che catalizza la seguente reazione: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$; quindi, suddivisi in Catalasi positivi e negativi

Produzione di metaboliti acidi

Le colonie selezionate sono state isolate su terreni selettivi e differenziali con aggiunta dell'indicatore verde di Bromocresolo per valutare la produzione di metaboliti acidi tramite viraggio del colorante (range da pH 6 blu a pH 3.5 giallo) (Jackson, M. S. *et al.*, 2002).

3.3 Profili di suscettibilità agli antibiotici

I microrganismi isolati dal latte sono stati sottoposti a uno screening per valutarne i profili di suscettibilità agli antibiotici selezionati sulla base del documento dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA, 2012).

La sensibilità agli antibiotici *in vitro* è stata saggiata mediante antibiogramma eseguito con il metodo Kirby Bauer. I microrganismi da testare vengono portati a una concentrazione pari allo 0.5 McFarland (*Biomerieux, France*), che corrisponde a una concentrazione batterica di circa 1.5×10^8 UFC/mL).

Con un tampone sterile si procede a inoculare il batterio omogeneamente su tutta la superficie della piastra contenente Terreno agarizzato Isosensitest+MRS al 10%. Sulle piastre sono posti, in maniera equidistante, i dischetti di 6 mm contenenti gli antibiotici da testare (Tabella 3) (Biemer, J. J. (1973).

Tabella 3 Pannello di antibiotici usati per verificare la suscettibilità dei microrganismi potenzialmente probiotici.

Antibiotico	Concentrazione
Vancomicina	(30 µg)
Gentamicina	(10 µg)
Eritromicina	(15 µg)
Cloramfenicolo	(30 µg)
Amoxicillina	(30 µg)
Tetraciclina	(30 µg)
Streptomicina	(10 µg)
Clindamicina	(10 µg)
Kanamicina	(30 µg)

Dopo incubazione a 37°C in microaerofilia, viene valutato l'alone di inibizione dovuto alle sostanze antimicrobiche che diffondono nell'agar inibendo la crescita del microrganismo. L'esperimento è stato replicato tre volte e il diametro di inibizione è stato valutato come la media delle tre misurazioni.

3.4 Antagonismo nei confronti dei microrganismi patogeni

Per ognuno dei ceppi microbici isolati è stata valutata l'attività antimicrobica *in vitro* nei confronti di patogeni di vario interesse clinico e collegati alle disbiosi non solo enteriche, ma anche cutanee e vaginali (*Staphylococcus aureus* ATCC BAA1680, *Gardnerella vaginalis* DSM4944, *Enterococcus faecalis* ATCC2912, *Salmonella enterica* ATCC14028, *Escherichia coli* ATCC1576, *Candida albicans* DSM1386 e *Candida albicans* C3 (isolato clinico vaginale della ceppoteca del Laboratorio di Microbiologia Clinica dell'Università del Molise).

L'attività antimicrobica è stata saggiata mediante il metodo dell'agar *spot* in accordo con Hockett, K. L., *et al.*, (2017) con alcune modifiche. Piastre di MRS agar (10 mL) sono state inoculate con 2µL di coltura *overnight* di ciascun ceppo isolato dal latte materno alla concentrazione finale di 1.5x10⁶ UFC/mL. A seguito dell'assorbimento della brodocoltura batterica nell'agar, si è proceduto all'incubazione in anaerobiosi a 37°C in giare contenenti *gaspack* (AnaeroGen, Oxoid, UK).

In seguito allo sviluppo delle colonie, le piastre sono state ricoperte con 10 mL di agar molle (0,8% (w/v) agar) contenente l'1% (v/v) di una coltura attiva *overnight* dei ceppi patogeni alla concentrazione finale di 1.5×10^6 UFC/mL e incubate a 37°C. Dopo 24 ore di incubazione è stata effettuata la misurazione dell'alone di inibizione della crescita dei patogeni intorno alle colonie dei ceppi con potenziale attività antimicrobica. Le zone di inibizione superiori a 20 mm, da 10 a 20 mm e inferiori a 10 mm sono state considerate rispettivamente come inibizioni forti, intermedie e basse. Il test è stato eseguito tre volte e ciascuna condizione in triplicato.

3.5 Caratterizzazione preliminare delle sostanze antimicrobiche

I ceppi potenzialmente probiotici sono stati sottoposti a una valutazione preliminare per la caratterizzazione di eventuali sostanze antimicrobiche prodotte in accordo con il protocollo di Shokryazdan P. *et al.*, 2014 con alcune modifiche. In particolare, è stata valutata la produzione di metaboliti secondari (proteine, perossido di idrogeno e acidi organici) con attività antimicrobica rilasciate nel brodo di coltura.

I ceppi sono stati cresciuti in 25 mL di MRS a 37°C *overnight*, un'aliquota di terreno non inoculato (MRS) è stata utilizzata come controllo negativo (TQ).

Le brodoculture sono state centrifugate a 8000g per 20 minuti a 4°C ed i surnatanti privi di cellule batteriche (CFS) sono stati filtrati con filtro 22 µm e aliquotati in 6 provette, ciascuna sottoposta a diversi trattamenti: Trypsina (TRY) (1mg/mL) e incubate per 2 ore a 37°C per valutare se la sostanza antimicrobica possa essere una proteina; Lisozima (LYS) (1mg/mL) e incubate per 2 ore a 37°C per valutare se la sostanza antimicrobica possa essere una proteina; Heat treated (HT) trattati a 100°C per 5 minuti per valutare se la sostanza antimicrobica possa essere una proteina termosensibile; Catalasi (CAT) (0.5mg/mL) e incubate per 2 ore a 37°C per valutare se l'attività antimicrobica possa essere ascritta alla produzione di perossido di idrogeno; neutralizzazione con NaOH 1N per valutare se la sostanza antimicrobica possa essere un acido organico. Il pellet restante è stato diluito allo 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL).

Per ogni ceppo potenzialmente probiotico è stata allestita una piastra di agar germe contenente 1.5×10^5 UFC/mL di *C.albicans* C3 e *G.vaginalis* DSM 4944 alla quale sono stati asetticamente praticati fori (6 mm Ø). In ogni pozzetto dell'agar germe sono stati dispensati rispettivamente 100 µL di ogni CFS trattato, di CFS non trattato e di pellet alla concentrazione finale di 1.5×10^5 UFC/mL, e di MRS broth come controllo negativo.

3.6 Attività antibiofilm

Sono stati indagati gli effetti del CFS derivato dalle colture dei ceppi isolati dal latte materno sulla inibizione della formazione e sulla disgregazione del biofilm di *G. vaginalis* DSM4944 e *C.albicans* C3 isolato clinico secondo il metodo di Qian, Z *et al.*, 2021 con lievi modifiche.

Un'aliquota di 100 µL di CFS di ciascun ceppo potenzialmente probiotico è stata aggiunta a 100 µL di brodo BHI contenente 1.5×10^6 UFC/mL di ciascun patogeni. Un volume di 200 µL di ciascun campione è stato quindi trasferito in una piastra per microtitolazione a 96 pozzetti e l'incubazione a 37°C per 48 ore microaerofilia. Il terreno di coltura è stato poi scartato e la piastra è stata lavata due volte con 200 µL di PBS per rimuovere le cellule planctoniche. Le cellule sessili sono state colorate con 200 µL di cristalvioletto al 0,2% (w/v) per 15 minuti e risciacquate due volte con PBS per rimuovere il colorante in eccesso. Il colorante è stato solubilizzato con 200 µL di alcol etilico e la quantità di biofilm è stata quantificata misurando l'assorbanza OD570 (BioTek, Winooski, VT, USA).

La valutazione degli effetti del CFS sul biofilm maturo dei due patogeni vaginali è stata eseguita aliquotando 200 µL di brodo BHI contenente 1.5×10^6 UFC/mL di ognuno dei due patogeni ed è stata incubata a 37 °C per 48 ore. Il surnatante è stato rimosso e sono stati effettuati due lavaggi con 200 µL PBS. Il CFS dei ceppi potenzialmente probiotici (200 µL) è stato quindi aggiunto a ciascun pozzetto prima dell'incubazione a 37 °C per 24 ore.

Per entrambi gli esperimenti sono stati allestiti il controllo di crescita privo di CFS e un controllo negativo (solo BHI). La riduzione della formazione del biofilm è stata determinata per via spettrofotometrica (OD570). Per ogni campione sono state preparate cinque repliche e l'esperimento è stato eseguito in triplicato.

3.7 Proprietà chimico-fisiche della superficie cellulare batterica

Lo screening preliminare di ceppi potenzialmente probiotici ha richiesto la valutazione *in vitro* delle caratteristiche fisiche e chimiche della superficie delle cellule microbiche come l'idrofobicità (MATH) e l'auto-aggregazione (Botes *et al.*, 2008) (Duary *et al.*, 2011).

L'adesione microbica agli idrocarburi (MATH), come l'esadecano, l'ottano, lo xilene o il toluene, e altri ligandi idrofobici è indice dell'idrofobicità della superficie cellulare microbica (Marin *et al.*, 1997).

Idrofobicità

La determinazione dell'idrofobicità della superficie cellulare è stata valutata mediante il saggio di adesione microbica agli idrocarburi (MATH) secondo la procedura descritta da Collado *et al.*, 2008 con le opportune modifiche. Sono stati adoperati xilene e toluene per stimare simultaneamente l'idrofobicità e le proprietà elettrone-accettore e donatore delle membrane batteriche. I ceppi isolati dal latte materno sono stati coltivati per una notte a 37 °C in brodo MRS. Le colture sono state centrifugate (8000 rpm per 10 min. a 4°C), sono state lavate due volte e risospese in una soluzione fisiologica fino a una densità ottica di circa 0,5 (OD₅₈₀). Gli idrocarburi di prova (xilene e toluene) sono stati aggiunti alle provette contenenti le cellule microbiche. Le provette sono state agitate per 5 minuti e lasciate a riposo per 60 minuti per la separazione delle due fasi ed è stata misurata l'OD₅₈₀ della fase acquosa (Bio-spectrometer basic, Eppendorf, Italia). L'idrofobicità è stata espressa come la riduzione percentuale della densità ottica della sospensione batterica dovuta alla ripartizione delle cellule nello strato idrocarburico nel tempo (30 e 90 minuti). L'affinità agli idrocarburi (idrofobicità) è stata calcolata con l'Equazione 1:

$$\text{Idrofobicità}\% = \frac{(OD_{580} T_0 - OD_{580} T_{(30,90)})}{OD_{580} T_0} \times 100$$

Equazione 1 Idrofobicità percentuale. $OD_{580} T_0$: assorbanza iniziale. $OD_{580} T_{(30,90)}$ assorbanza dopo 30 e 90 minuti.

Auto-aggregazione

Il saggio di auto-aggregazione è stato eseguito come descritto da Collado *et al.* 2008 preparando le sospensioni batteriche come descritto sopra e incubandole a 37 °C. Le sospensioni batteriche sono state titolate allo 0.5 McFarland e incubate a 37°C. La capacità di auto-aggregazione è stata rilevata dopo 2, 5 e 24 ore tramite l'OD580 della fase acquosa (Bio-spectrometer basic, Eppendorf, Italia). La percentuale di auto-aggregazione è stata calcolata con l'Equazione 2:

$$\text{Auto - aggregazione}\% = 1 - \left(\frac{OD_{580} T_{(2,5,24)}}{OD_{580} T_0} \right) \times 100$$

Equazione 2 Auto-aggregazione percentuale. $OD_{580} T_0$: assorbanza iniziale e $OD_{580} T_{(2,5,24)}$ assorbanza dopo 2, 5 e 24 ore.

Formazione biofilm

La valutazione della produzione di biofilm è stata effettuata come descritto da Stepanovic *et al.* 2020 con alcune modifiche necessarie per la crescita dei microrganismi *in vitro*. In ogni pozzetto sono stati aliquotati 200 µL di brodo MRS contenente 1.5×10^5 UFC/mL di ogni ceppo isolato dal latte materno e dopo 4 giorni di incubazione a 37°C le piastre sono state lavate con PBS, fissate con 200 µL di metanolo al 99 % per 15 minuti e poi colorate con 200 µL di cristalvioletto al 2% per 5 minuti. La piastra è stata sciacquata sotto acqua corrente e il colorante solubilizzato con 160 µL di acido acetico glaciale 33% (v/v) e misurata l'OD570 (Bio-spectrometer basic, Eppendorf, Italia). Sono stati definiti dei *cut-off* necessari per la classificazione dei microrganismi (Tabella 4).

Tabella 4 Produzione di biofilm dove OD è l'assorbanza del campione e ODc del controllo (terreno non inoculato).

Produzione di biofilm OD570

Assente	$OD \leq ODc$
Debole	$ODc < OD \leq (2 \times ODc)$
Moderato	$(2 \times ODc) < OD \leq (4 \times ODc)$
Forte	$4 \times ODc < OD$

3.8 Sopravvivenza al transito nel tratto gastrointestinale (GIT)

Una delle caratteristiche peculiari per la selezione di ceppi potenzialmente probiotici è la capacità di sopravvivere alle condizioni di stress nel tratto gastro-intestinale (GIT). Questa peculiarità è indispensabile non solo per i probiotici che hanno come *target* l'intestino, ma per tutti quei microrganismi che verranno assunti per via orale. Per tale ragione è stato messo a punto un modello multicompartimentale *in vitro* che simula le condizioni fisico-chimiche del GIT umano.

Sono state analizzate tre colture indipendenti di ciascun batterio, seguendo il protocollo descritto da Vergalito *et al.*, 2020 con alcune modifiche.

I microrganismi isolati dal latte materno sono stati coltivati overnight a 37 °C in brodo MRS. Le brodocolture (150 mL) sono state centrifugate a 8000 rpm per 10 minuti a 4°C (Centrifuga 5415 R; Eppendorf, Amburgo, Germania) e il pellet è stato risospeso nello stesso volume di soluzione salina.

Un millilitro di ciascun ceppo è stato prelevato per eseguire la conta microbica su MRS agar (Oxoid, Ltd. Hampshire, UK) a 37°C per 72 ore in condizioni anaerobiche (AnaeroGen, Oxoid Ltd., Hampshire, UK).

Per simulare lo stress da masticazione nel tratto orale la diluizione *in vivo* della saliva, sono stati aggiunti 33 mL di una soluzione elettrolitica sterile (NaCl 6,2 g/L, KCl 2,2 g/L, CaCl₂ 0,22 g/L e NaHCO₃ 1,2 g/L) con lisozima (Sigma-Aldrich) a una concentrazione finale dello 0,01%. Dopo una incubazione di 2 minuti a 37 °C è stata eseguita nuovamente la conta microbica.

Per simulare l'ambiente gastrico, alla sospensione cellulare sono stati aggiunti 20 mL di soluzione elettrolitica contenente lo 0,3% di pepsina (concentrazione finale) (Sigma-Aldrich) a pH 2,5 e incubata a 37 °C. Aliquote della sospensione sono state raccolte dopo 30 minuti (per mimare un transito a stomaco vuoto) e dopo 90 minuti di incubazione (per mimare il transito in uno stomaco pieno) e utilizzate per la conta microbica eseguita come descritto sopra.

Per simulare il transito intestinale, l'ossigeno è stato sostituito dall'azoto per ottenere un'atmosfera anaerobica e il pH è stato regolato a 5,0 con una soluzione satura di bicarbonato di sodio (8 g di bicarbonato di sodio in 100 mL di acqua distillata, sterilizzata a 121 °C per 15 minuti). Sono stati aggiunti 8.25 mL di una soluzione elettrolitica sterile contenente lo 0,45% di estratto di bile suina e lo 0,1% di pancreatina (concentrazione finale, entrambi da Sigma-Aldrich). Il pH è stato quindi regolato a 6,3 e aumentato lentamente a 7,5 fino alla fine del test. Dopo 4 ore, sono state raccolte aliquote di ciascun ceppo per la conta microbica, effettuata come descritto in precedenza.

3.9 Identificazione fenotipica

Lo studio del metabolismo dei carboidrati è stato condotto con l'ausilio del test API 50 CHL (Biomérieux, France), un sistema standardizzato basato su 50 test biochimici (Tabella 5) che ha consentito lo studio del metabolismo di diversi carboidrati da parte dei microrganismi.

Tabella 5 Lista dei test della galleria API50CHL.

Provetta	Test	Principi attivi	Quantità (mg/cup)
0		Controllo	-
1	GLY	Glicerolo	1,640
2	ERY	Eritrolo	1,440
3	DARA	D-Arabinosio	1,400
4	LARA	L- Arabinosio	1,400
5	RIB	D-Ribosio	1,400
6	DXYL	D-Xilosio	1,400
7	LXYL	L-Xilosio	1,400
8	ADO	D-Adonitolo	1,360
9	MDX	Metil-βD-Xilopiranoside	1,280
10	GAL	D-Galattosio	1,400
11	GLU	D-Glucosio	1,560
12	FRU	D-Fruuttosio	1,400
13	MNE	D- Mannosio	1,400
14	SBE	L-Sorbosio	1,400
15	RHA	L-Ramnosio	1,360
16	DUL	Dulcitolo	1,360
17	INO	Inositolo	1,400
18	MAN	D- Mannitolo	1,360
19	SOR	D-Sorbitolo	1,360
20	MDM	Metil-αD-Mannopiranoside	1,280
21	MDG	Metil-αD-Glucopiranoside	1,280
22	NAG	N-Acetil Glucosammina	1,280
23	AMY	Amigdalina	1,080
24	ARB	Arbutina	1,080
25	ESC	Esculina	1,160
		Citrato ferrico	0.152
26	SAL	Salicina	1,040
27	CEL	D-Celiobiosio	1,320
28	MAL	D- Maltosio	1,400
29	LAC	d-Lattosio (origine bovina)	1,400
30	MEL	D- Melbiosio	1,320
31	SAC	D-Saccarosio	1,320
32	IRE	N-Trealosio	1,320
33	INU	Inulina	1,280
34	MLZ	D-Melezitosio	1,320
35	RAF	D-Raffinosio	1,560
36	AMD	Amido	1,280
37	GLYG	Glicogeno	1,280
38	XLT	Xilitolo	1,400
39	GEN	Gentiobiosio	0,500
40	TUR	D-Turanosio	1,320
41	LYX	D-Lixosio	1,400
42	TAO	N-Tagatosio	1,400
43	DFUC	D-Fucosio	1,280
44	LFUC	L-Fucosio	1,280
45	DARI	D-Arabitolo	1,400
46	LARI	L-Arabitolo	1,400
47	GGNT	Guconato di potassio	1,840
48	2KG	2-chetoGluconato di potassio	2,120
49	SKG	5-chetoGluconato di potassio	1,800

I microrganismi isolati, incubati precedentemente in MRS Broth a 37°C *overnight*, sono stati centrifugati a 8000 rpm per 10 min e poi risospesi in API 50 CHL Medium e API Suspension Medium. La sospensione è stata inoculata nelle microprovette numerate delle “gallerie”. In ogni microprovetta è contenuta una diversa sostanza (Tab. 7) e un indicatore di pH che vira quando, durante l'incubazione, il catabolismo dei glucidi produce acidi organici (API 50 CH). Le gallerie sono state incubate a 37 °C per 48 ore.

I risultati di tutti i test sono stati registrati sulla scheda apposita come positivi (+) se c'è stato viraggio, negativi (-) se non c'è stato viraggio, dubbi (?) se la situazione non è chiara.

Il profilo biochimico così ottenuto può essere identificato, a partire da un *database*, tramite il *software* di identificazione *apiweb*TM.

3.10 Identificazione molecolare

Estrazione del DNA

Dalle colture batteriche, isolate dal latte materno, è stato estratto il DNA tramite il Genomic DNA Extraction Kit (Blood/Bacteria/Cultured Cells) (RBCBioscience, Taiwan). La coltura batterica (<10⁹ UFC/mL), precedentemente coltivata in MRS Broth a 37°C *overnight*, è stata centrifugata per 1 minuto a 13.000 rpm eliminando il surnatante. Il *pellet* è stato risospeso in 200 µL di *Lysozyme Buffer* e incubato a temperatura ambiente per 10 minuti invertendo il tubo ogni 2-3 minuti. Sono stati aggiunti 200 µL di *GB Buffer* e si è *vortexato* per 5 minuti. Dopo 10 minuti di incubazione a 70°C sono stati aggiunti 200 µL di etanolo al 96% e *vortexato* per 10 secondi. Il campione è stato aliquotato in una colonnina di estrazione posizionata su un tubo di raccolta da 2 mL e centrifugato a 13.000 rpm per 2 minuti. Sono stati aggiunti 400 µL di *WI Buffer* nella colonnina e si è centrifugato a 13.000 rpm per 30 secondi. Dopo rimozione dell'eluato, sono stati aggiunti 600 µL di *Wash Buffer* centrifugando a 13.000 rpm per 30 secondi. Infine, sono stati aggiunti 50 µL di *Elution Buffer* precedentemente riscaldato a 70°C, incubato a temperatura ambiente per due minuti e centrifugato a 13.000 rpm per 30 secondi per eluire il DNA purificato.

Per accertare il grado di purezza e la concentrazione dei campioni di DNA precedentemente estratto, è stato utilizzato uno spettrofotometro NanoDrop 2000 Thermo ScientificTM (Massachusetts, USA) ad ampio spettro (UV-Visibile).

Amplificazione del DNA

Per discriminare i microrganismi microscopicamente ascrivibili al genere *Lactobacillus*, è stato adoperato un protocollo di identificazione molecolare per la tipizzazione di undici specie di *Lactobacillus spp.* (Song, Y. L et al., 2000).

La metodica ha previsto una successione di multiplex PCR consecutive con primer specifici per gruppo e specie derivati dalla regione intergenica 16S-23S rRNA e dal 23S rRNA. La prima (denominata multiplex PCR-G) raggruppa le 11 specie in 4 gruppi. In seguito, per ogni gruppo, sono state effettuate ulteriori PCR necessarie alla corretta identificazione della specie mediante quattro saggi di PCR multiplex (denominati multiplex PCR II-1, multiplex PCR II-2, multiplex PCR III e multiplex PCR IV) (Figura 7). Come controlli positivi per l'identificazione dei ceppi isolati dal latte materno sono stati utilizzati *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917.

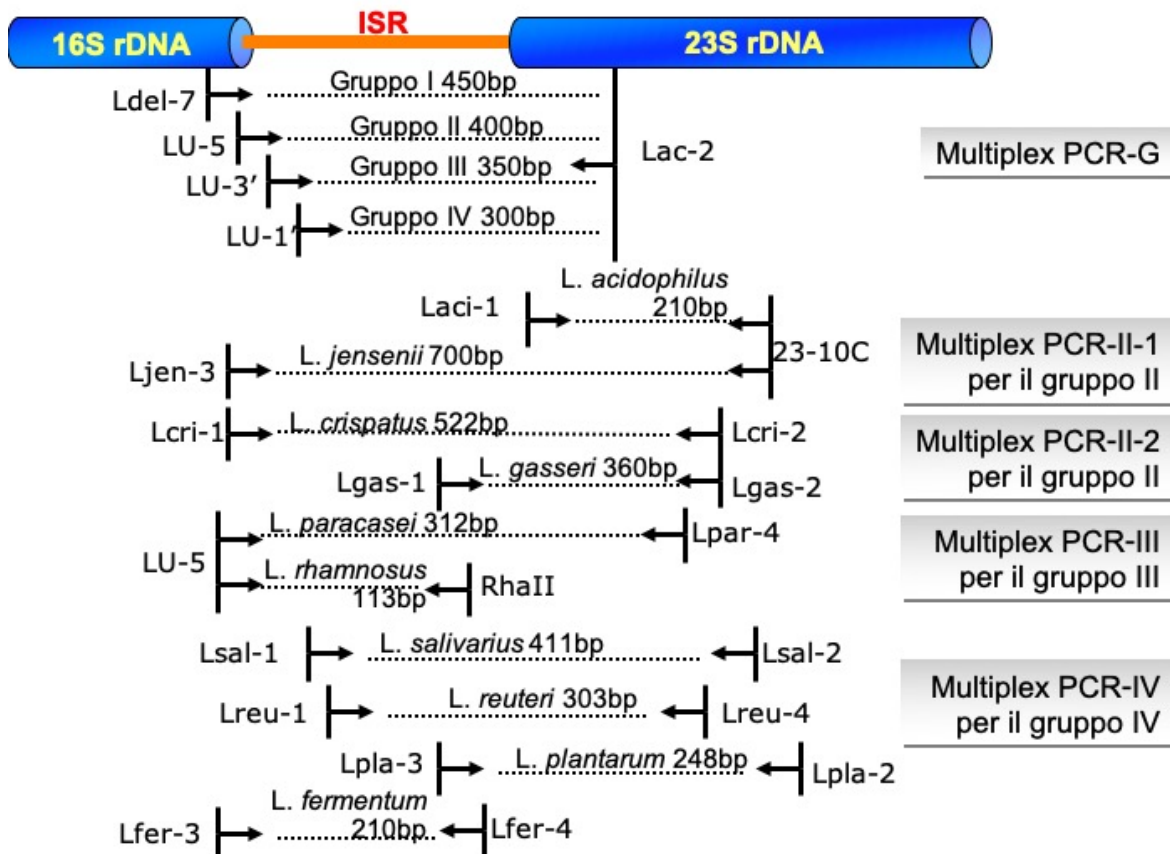


Figura 7 Rappresentazione schematica protocollo di identificazione molecolare (Song et al. 2002).

Elettroforesi degli acidi nucleici

Gli amplificati sono stati visualizzati su gel al 1.5% (p/v) di agarosio in tampone TAE 1X (Tris Acetato EDTA) addizionato con GELRED (*Sigma Aldrich*) alla concentrazione di 0.8µg/ml.

Per ogni campione e per il controllo positivo e negativo sono stati caricati, in ogni pozzetto, 10 µL di prodotto di amplificazione.

È stato adoperato un marcatore di peso molecolare 50 bp DNA *Ladder* (Dye Plus) (Takara BIO INC., Japan).

La migrazione elettroforetica è stata effettuata con un'intensità di corrente costante di 120V e 70mA per un tempo di 30 minuti circa in presenza di un tampone di corsa TAE 1X. Trascorso il tempo della migrazione elettroforetica, il gel è stato osservato e fotografato tramite un transilluminatore integrato MoonLight (Diatech Lab Line, Italia), uno strumento che espone il gel alla luce U.V. e permette l'acquisizione digitale dell'immagine.

3.11 Saggio di vitalità cellulare (MTT)

Per valutare la potenzialità probiotico-terapeutica dei ceppi isolati, è stata selezionata la linea cellulare VK2/E6E7 cellule epiteliali isolate da mucosa vaginale donate dalla Prof.ssa Katia Mangano (Università di Catania).

Prima di valutare l'adesione alle linee cellulari, è stato verificato se i ceppi influenzassero la vitalità della linea cellulare tramite un saggio che si basa sulla riduzione enzimatica del 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) a MTT-formazano che è catalizzata dalla succinato deidrogenasi mitocondriale. Pertanto, il saggio MTT dipende dalla respirazione mitocondriale e serve indirettamente a valutare la capacità energetica e quindi la vitalità di una cellula (Chacon, E. *et al.*, 1997).

La linea cellulare è stata seminata nelle piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 6×10^3 cellule per pozzetto ed è stata incubata per 24 ore a 37°C in presenza del 5% CO₂ in terreno Keratinocyte Growth Medium (KGM) (Thermo Fisher).

Successivamente, le cellule sono state trattate con i ceppi potenzialmente probiotici sia vitali a una concentrazione di 1×10^5 UFC/mL sia tinalizzati a una concentrazione di 1×10^5 UFC/mL trattati per 60 minuti a 80 °C sia con i rispettivi CFS. *L.rhamnosus GG* è stato utilizzato come controllo positivo.

È stato utilizzato come controllo negativo il brodo MRS, terreno di coltura utilizzato per produrre i CFS.

Dopo una prima incubazione *overnight* a 37°C, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 10µL di MTT (5 mg/ml). Le piastre sono state nuovamente incubate per due ore fino al viraggio osservabile ad occhio nudo da giallo a viola, dovuto alla riduzione, da parte degli enzimi mitocondriali, del MTT a formazano. Una volta aspirato il surnatante, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100µl di DiMetilSolfOssido (DMSO) per solubilizzare i cristalli di formazano e le piastre sono state incubate al buio e in agitazione per 10 minuti.

Infine, l'assorbanza di ogni pozzetto è stata letta mediante l'utilizzo dello spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 580 nm.

Per ogni condizione sono stati allestiti tre replicati e la vitalità relativa delle cellule è stata espressa in percentuale rispetto alle cellule di controllo non trattate (. López-García, J., *et al.*,2014).

3.12 Adesione alla linea cellulare VK2/E6E7

Il saggio di adesione dei ceppi potenzialmente probiotici alla linea cellulare epiteliale vaginale (VK2/E6E7) è stato condotto con un metodo precedentemente messo a punto e pubblicato dal nostro laboratorio (Venditti *et al.*, 2021).

In sintesi, i ceppi cresciuti *overnight* a 37°C in brodo MRS sono stati centrifugati a 8000 rpm per 10 minuti e risospesi in soluzione fisiologica fino ad ottenere una torbidità pari allo 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Sono state effettuate opportune diluizioni decimali per ottenere le concentrazioni da inoculare per il saggio di adesione: $1,5 \times 10^5$ UFC/mL, $1,5 \times 10^6$ UFC/mL e $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. *L.rhamnosus GG* è stato utilizzato come controllo positivo ed è stata valutata anche la capacità di adesione dei due patogeni *G.vaginalis DSM4944* e *C.albicans C3* isolato vaginale. Le colture cellulari di VK2 E6/E7 sono state aliquotate in piastre a 6 pozzetti e incubate a 37°C per 24 ore al 5% di CO₂ in KGM, rispettivamente, supplementato con antibiotico fino al raggiungimento della giusta confluenza con una concentrazione di 2×10^5 cellule/mL. La percentuale di confluenza delle cellule è stata valutata tramite microscopio ottico a contrasto di fase (*ZEISS Axiophot*) ad ingrandimento 40x. Raggiunto l'85% di confluenza, il mezzo colturale è stato rimosso e i singoli pozzetti sono stati lavati con PBS a pH 7,4 allo scopo di allontanare residui di antibiotico.

In ogni pozzetto sono stati distribuiti 2 mL di sospensione batterica precedentemente allestita in KGM senza antibiotico e ogni piastra è stata incubata a 37°C per 2 ore al 5% di CO₂ per poter valutare l'adesione dei batteri saggiati. Al termine dell'incubazione il surnatante è stato rimosso e ciascun pozzetto è stato lavato due volte con PBS a pH 7,4 allo scopo di eliminare le cellule batteriche non aderenti. Per favorire il distacco delle cellule dal fondo della piastra sono stati aggiunti 200 µL di Tripsina EDTA allo 0.05% per 5 minuti a temperatura ambiente, la reazione è stata bloccata aggiungendo 800 µL di DMEM ghiacciato. Per evidenziare l'avvenuta adesione è stato prelevato 1 mL da ciascun pozzetto e seminato su MRS Agar per la conta batterica, utilizzata come parametro per determinare la percentuale di adesione. Ogni condizione del saggio di adesione è stata effettuata in triplo. La percentuale di adesione, come da letteratura (Schillinger U. *et al.*, 2005) è stata espressa con l'Equazione 3:

Equazione 3 Adesione percentuale dove UFC/mL (120) rappresenta il numero di Unità Formanti Colonie dopo due ore di contatto con le cellule e UFC/mL (0) rappresenta il numero di Unità Formanti Colonie a tempo zero (inoculo).

$$\% \text{ di Adesione} = \frac{\text{UFC/mL}_{(120)}}{\text{UFC/mL}_{(0)}} \times 100$$

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un *software* commerciale (GraphPad Prism versione 5.00 per Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). È stato impiegato il test ANOVA a una via per comparare, nella stessa linea cellulare, la varianza dell'adesione dei diversi inoculi. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$.

3.13 Attività antimicrobica su VK2 E6/E7

Per valutare l'antagonismo nei confronti di microrganismi patogeni è stato messo a punto un modello *in vitro* in presenza di due patogeni ricorrenti in caso di disbiosi vaginale quali *G. vaginalis* e *C. albicans* sulla linea cellulare VK2 E6/E7. In accordo con il protocollo proposto da He, Y., *et al.*, 2020, con qualche modifica, ha previsto la valutazione dell'effetto inibitorio dei ceppi potenzialmente probiotici sull'adesione dei patogeni alla linea cellulare, sia mimando lo spiazzamento di un patogeno già adeso che valutando la competizione per i siti di adesione tramite co-incubazione.

La coltura cellulare VK2 E6/E7 è stata aliquotata in piastre a 6 pozzetti e incubata a 37°C per 24 ore al 5% di CO₂ in KGM con antibiotico fino al raggiungimento di una confluenza pari all'85%. Il mezzo colturale è stato rimosso e i singoli pozzetti sono stati lavati con PBS a pH 7,4 allo scopo di allontanare residui di antibiotico.

1. Esperimento di pre-infezione con i patogeni (spiazzamento): le cellule sono state inoculate con 1 mL delle sospensioni patogene a una concentrazione di 2×10^5 UFC/mL (la carica batterica iniziale è stata determinata mediante conta su piastre di Rose Bengala Agar con cloramfenicolo per la conta di *C.albicans C3* e su *Gardnerella Vaginalis* Agar per la conta di *G.vaginalis DSM4944*). Le cellule sono state quindi incubate a 37°C 5% di CO₂ per 1 ora. I patogeni non aderenti sono stati rimossi mediante tre lavaggi con PBS sterile. Ogni ceppo potenzialmente probiotico (1 mL) è stato aggiunto al pozzetto del gruppo sperimentale. Le cellule sono state quindi coltivate a 37°C 5% CO₂ per un'altra ora.
2. Nell'esperimento di co-infezione (competizione) le cellule sono state inoculate con una sospensione mix contenente 1 mL di patogeni (2×10^5 UFC/mL) e 1 mL dei ceppi potenzialmente probiotici (2×10^5 UFC/mL). Le cellule sono state quindi coltivate a 37°C 5% CO₂ al per un'altra ora. La carica batterica iniziale è stata determinata mediante conta su piastre di Rose Bengala Agar con cloramfenicolo per la conta di *C.albicans C3* e su *Gardnerella Vaginalis* Agar per la conta di *G.vaginalis DSM4944*.
3. Esperimento di pretrattamento con i lattobacilli (esclusione): le cellule sono state inoculate con 1 mL delle sospensioni dei ceppi potenzialmente probiotici a una concentrazione di (2×10^5 UFC/mL) e quindi incubate a 37°C 5% CO₂ per 1 ora. I microrganismi non adesi sono stati rimossi mediante tre lavaggi con PBS sterile. I ceppi patogeni 1mL (2×10^5 UFC/mL) sono stati aggiunti ai pozzetti. Le cellule sono state quindi coltivate a 37°C 5% CO₂ per un'altra ora. La carica batterica iniziale è stata determinata mediante conta su piastre di Rose Bengala Agar con cloramfenicolo per la conta di *C.albicans C3* e su *Gardnerella Vaginalis* Agar per la conta di *G.vaginalis DSM4944*.

Per tutti gli esperimenti *L. rhamnosus GG* è stato utilizzato come controllo positivo. Al termine dell'incubazione il surnatante è stato rimosso e ciascun pozzetto è stato lavato due volte con PBS a pH 7,4 allo scopo di eliminare i microrganismi non aderenti. Per favorire il distacco delle cellule dal fondo della piastra sono stati aggiunti 200 µL di Tripsina EDTA allo 0.05% per 5 minuti a temperatura ambiente, la reazione è stata bloccata aggiungendo 800 µL di KGM ghiacciato.

Per evidenziare l'avvenuta adesione è stato prelevato 1 mL da ciascun pozzetto e seminato su Rose Bengala Agar con cloramfenicolo (terreno selettivo per l'isolamento e l'enumerazione di lieviti) per la conta di *C.albicans C3* e su Gardnerella Vaginalis Agar per la conta di *G.vaginalis DSM4944*. Ogni condizione del saggio di adesione è stata effettuata in triplicato. La percentuale di adesione, come da letteratura, (Schillinger U. *et al.*, 2005) è stata calcolata secondo l'equazione 3 riportata in precedenza.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando un *software* commerciale (GraphPad Prism versione 5.00 per Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

È stato impiegato il test ANOVA ad una via per comparare, la variazione dell'adesione dei patogeni rispetto ai gruppi trattati con i diversi lattobacilli. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$.

3.14 Saggio di migrazione delle cellule VK2 E6/E7

La disbiosi può indurre un danno nella struttura della mucosa vaginale, per tale ragione è fondamentale intervenire ripristinando o prevenendo la corretta integrità epiteliale (Zevin, A. S. *et al.*, 2016). La migrazione è una proprietà delle cellule della mucosa che contribuisce alla crescita e al ripristino dopo un danno. Per verificare se la migrazione delle cellule VK2/E6E7 potesse essere promossa dai ceppi isolati dal latte materno, è stato eseguito un test di *wound-healing* (Takada, K et L., 2018).

Seguendo il protocollo di Magnifico I. *et al.*, 2023, con qualche modifica, è stata allestita la coltura cellulare di VK2 E6/E7, in modo da ottenere una concentrazione pari a $3,7 \times 10^5$ cellule/mL. Le cellule (70 µL/pozzetto) sono state piastrate in µ-Dish (IBIDI®) (diametro 35 mm) contenenti l'inserito di coltura (Figura 8). Raggiunto l'85% di confluenza, l'inserito è stato rimosso mediante pinzette sterili creando uno spazio libero da cellule (setto) di circa 500µm.



Figura 8 Piastre piastre μ -Dish (IBIDI®) adoperate per il saggio della migrazione.

Dopo la formazione del setto, il μ -Dish è stato riempito con 2 mL di terreno KGM senza antibiotici.

Le cellule sono state trattate aggiungendo i rispettivi CFS al 10% ottenuti dai ceppi isolati dal latte materno e incubate per 24 ore a 37°C 5% CO₂. Cellule non inoculate sono state utilizzate come controllo.

L'estensione della migrazione delle cellule è stata fotografata a diversi *timepoint* 0 (T0), 8 (T8), 18 (T18) e 40 (T40) ore con la fotocamera (MODEL ISH 300 OPTECH) e misurata utilizzando il *software* di analisi delle immagini, Image J (V 1.45s, fornito dal National Institute of Health, USA) (Triantaphillidou, S., *et al.*, 2004, Boreman, G.D *et al.*, 2001).

Tutti i saggi sono stati effettuati in triplicato e sono stati ripetuti in maniera indipendente per tre volte. I dati espressi come media \pm deviazione standard (SD) sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 8.0. È stato impiegato il test ANOVA a una via per comparare e il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$.

4 Risultati

Il Diagramma 1 illustra il workflow adoperato per la selezione dei ceppi potenzialmente probiotici isolati dalla popolazione in studio.

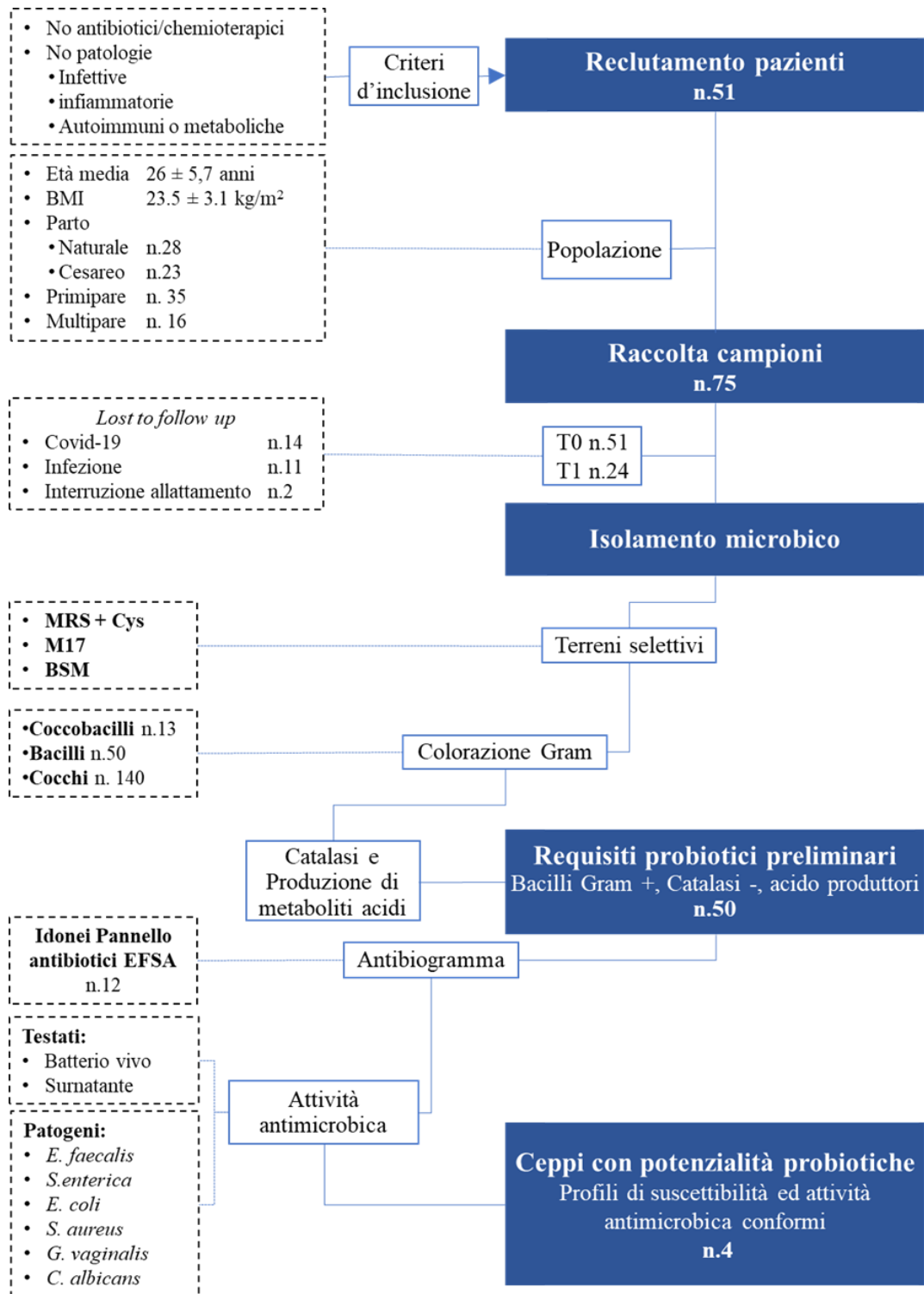


Diagramma 1 Workflow della selezione di ceppi potenzialmente probiotici dal latte materno.

4.1 Popolazione in studio

Il latte materno è stato raccolto da un totale di 51 donne in apparente buona salute (ABS) con un'età media di $26 \pm 5,7$ anni e un BMI medio di 23.5 ± 3.1 kg/m². 28 donne hanno espletato il parto eutocico e 23 parto cesareo; 35 erano primipare e 16 multipare.

Per alcune pazienti non è stato possibile raccogliere il campione al T1; cinque volontarie hanno avuto una mastite da lattazione, nove hanno utilizzato antibiotici per trattare un'infezione, due hanno interrotto l'allattamento prima dei 6 mesi, undici impossibilitate a fare pervenire i campioni per motivazioni legate alla pandemia causata dal virus SARS-CoV-2. Per tale ragione sono stati analizzati campioni di latte a T0 e T1 di 24 donne, mentre per le restanti 27 è stato possibile analizzare solo il campione del T0. Tutti i campioni sono stati conservati a -80°C per le eventuali analisi molecolari.

4.2 Microrganismi isolati

L'isolamento di ceppi microbici ha permesso l'allestimento di una ceppoteca costituita da 203 microrganismi dal latte materno custodita presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica dell'Università degli Studi del Molise (Figura 9).



Figura 9 Terreni agarizzati per l'isolamento di microrganismi dal latte materno.

Identificazione microscopica

Colorazione di Gram

Dall'osservazione al microscopio ottico a contrasto di fase ingrandimento 100x sono stati selezionati i microrganismi Gram positivi (colorati in viola/lilla) (Figura 10). Sono stati identificati 140 ceppi di forma coccica, 50 di forma bastoncellare e 13 coccobacilli.

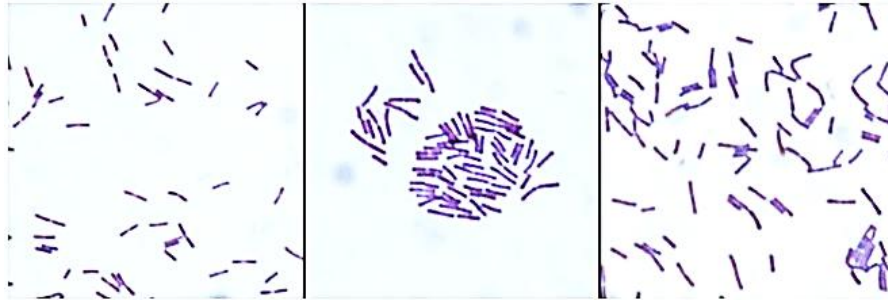


Figura 10 Osservazione al microscopio ottico a contrasto di fase ingrandimento 100x. Bacilli Gram + isolati dal latte materno.

Saggio della catalasi

Il saggio della catalasi ha consentito di effettuare una ulteriore scrematura dei ceppi potenzialmente probiotici. Sono stati conservati per le successive analisi i ceppi catalasi negativi.

Produzione di metaboliti acidi

L'uso di terreni differenziali addizionati di Bromocresolo ha consentito la selezione di batteri acidi lattici. Dei 203 ceppi di partenza, solo il 25.63% è stata in grado di indurre il viraggio del terreno dal blu verso il giallo e di formare colonie verdi (Figura 11).

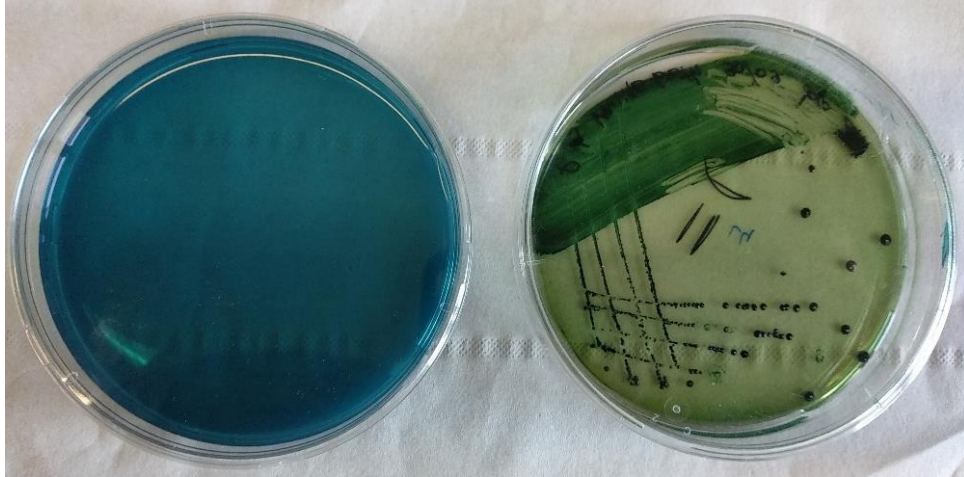


Figura 11 Terreno agarizzato in piastre Petri addizionato con il colorante verde di Bromocresolo. Terreno prima dell'inoculo microbico (sinistra), terreno dopo l'inoculo di un microorganismo produttore di metaboliti acidi con il viraggio dal blu verso il giallo e la formazione di colonie verdi (destra).

Lo screening dei requisiti probiotici preliminari ha permesso di identificare 50 bacilli Gram positivi, catalasi negativi e acido produttori.

4.3 Profili di suscettibilità agli antibiotici

Come evince dalla Figura 12, i microrganismi selezionati hanno mostrato avere percentuali diverse di sensibilità agli antibiotici presi in esame. Il 93% dei ceppi è risultato sensibile all'ampicillina, mentre solo il 45% alla vancomicina.

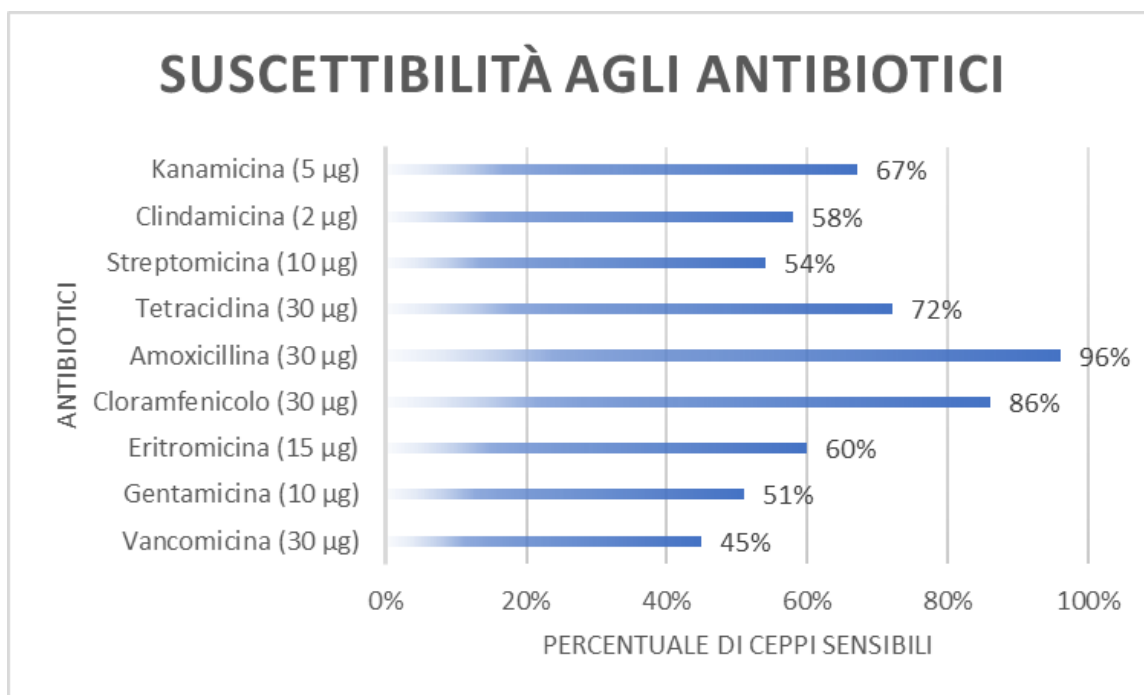


Figura 12 Percentuale di sensibilità agli antibiotici dei ceppi selezionati, tramite il metodo Kirby-Bauer

4.4 Antagonismo nei confronti dei microrganismi patogeni

I ceppi che hanno mostrato ottima sensibilità al pannello di antibiotici testati sono stati saggiati per valutare la loro attività antagonista nei confronti dei seguenti microrganismi patogeni: *Enterococcus faecalis* ATCC 2912, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 1576, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1680, *Gardnerella vaginalis* DSM 4944, *Candida albicans* DMS 1386 e *Candida albicans* C3 (isolato clinico vaginale UNIMOL).

I ceppi testati, seppur in maniera differente, hanno mostrato una qualche attività antagonista nei confronti dei microrganismi patogeni tramite la formazione di aloni di inibizione della crescita con il metodo dell'agar spot (Figura 13).

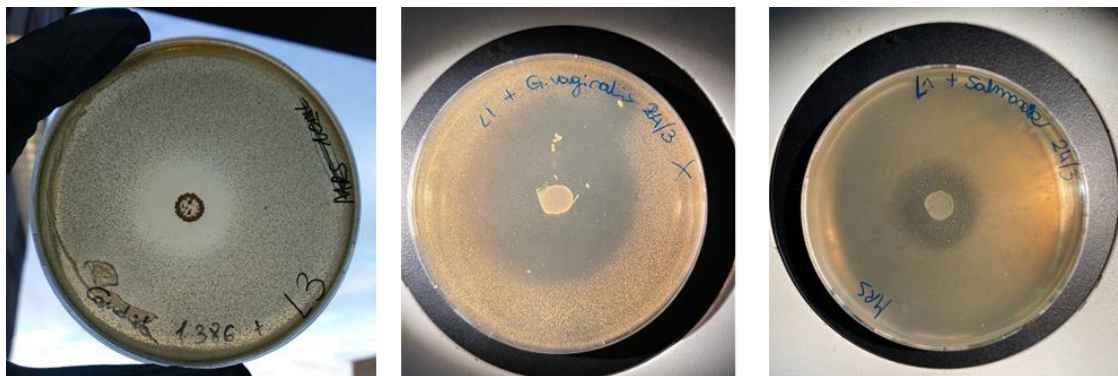


Figura 13 Valutazione dell'attività antimicrobica in vitro. Metodo dell'agar spot.

Sono stati selezionati e denominati L1, L2, L3 e F2 i quattro ceppi dotati di un buon profilo di sensibilità agli antibiotici e che parallelamente hanno mostrato buona attività antagonista nei confronti di tutti i patogeni test (Tabella 6).

Tabella 6 Zone di inibizione della crescita dei microrganismi patogeni (mm \pm SD) dovute ai ceppi isolati dal latte materno con il metodo dell'agar spot.

	L1	L2	L3	F2	L.rhamnosus GG
<i>E. faecalis</i> ATCC2912	26.0 \pm 0.4	22.5 \pm 0.7	21.0 \pm 0.1	20.0 \pm 0.4	25.0 \pm 0.7
<i>S. enterica</i> ATCC14028	31.0 \pm 0.5	37.0 \pm 0.2	33.5 \pm 0.4	28.0 \pm 0.4	21.5 \pm 0.1
<i>E. coli</i> ATCC1576	22.5 \pm 0.1	26.0 \pm 0.3	30.0 \pm 0.8	39.0 \pm 0.2	20.1 \pm 0.4
<i>S. aureus</i> ATCC BAA1680	29.0 \pm 0.2	26.0 \pm 0.4	21.5 \pm 0.4	31.0 \pm 0.0	20.0 \pm 0.3
<i>G.vaginalis</i> DSM4944	48.0 \pm 0.2	45.5 \pm 0.6	50.5 \pm 0.1	60.5 \pm 0.3	52.0 \pm 0.4
<i>C. albicans</i> DSM1386	20.0 \pm 0.3	24.0 \pm 0.5	21.0 \pm 0.7	23.0 \pm 0.6	13.0 \pm 0.8
<i>C. albicans</i> C3	19.5 \pm 0.1	33.5 \pm 0.5	50.0 \pm 0.1	45.0 \pm 0.2	32.5 \pm 0.3

4.5 Caratterizzazione preliminare delle sostanze antimicrobiche

Le sostanze antimicrobiche prodotte dai ceppi potenzialmente probiotici isolati dal latte materno sono state caratterizzate mediante il saggio di diffusione su agar contro i ceppi patogeni vaginali *G.vaginalis* DMS 4944 e *C.albicans* C3. I risultati hanno mostrato che tutti i ceppi hanno prodotto acidi organici attivi contro entrambi i patogeni testati. L'attività antimicrobica di L1 ed L3 potrebbe essere ascritta a proteine di natura differente: termostabile per L1 e termosensibile per L3. I CFS dei ceppi L1, L3 e L2 trattati con catalasi, hanno subito inibizione dell'attività antimicrobica facendo ipotizzare che l'attività antagonista sia dovuta anche alla produzione di perossido di idrogeno (Tabella 7).

Tabella 7 Attività inibitoria degli CFS trattati e non trattati dei ceppi isolati dal latte materno (L1, L2, L3 e F2) nei confronti di ^a: *G.vaginalis* DSM4944 (*G.v*) e *C.albicans* C3 (*C3^b*). Surnatante non trattato (NT), Surnatante neutralizzato con NaOH, Surnatante trattato con lisozima, trattato con tripsina e trattato con catalasi. Surnatante trattato a 100°C per 5' (Heat Treated). I valori sono espressi come media \pm deviazione standard. (-) non c'è inibizione.

Surnatante	Diametro alone di inibizione (mm)							
	L1		L2		L3		F2	
	G.v ^a	C3 ^b	G.v ^a	C3 ^b	G.v ^a	C3 ^b	G.v ^a	C3 ^b
Non trattato	21.2 \pm 0.5	11.1 \pm 0.5	20.2 \pm 0.7	10.5 \pm 0.4	18 \pm 0.7	9.4 \pm 0.3	20 \pm 0.9	11.1 \pm 0.5
NaOH	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisozima	-	-	18.3 \pm 0.7	9.4 \pm 0.5	-	-	25.4 \pm 0.6	12.3 \pm 0.2
Trypsina	-	-	19.2 \pm 0.4	8.1 \pm 0.2	-	-	18.4 \pm 0.3	10.2 \pm 0.5
Catalasi	-	-	-	-	-	-	16.1 \pm 0.7	8.7 \pm 0.3
Heat treated	20.6 \pm 0.8	10.6 \pm 0.8	20.6 \pm 0.8	8.6 \pm 0.8	-	-	27.4 \pm 0.3	14.2 \pm 0.5

4.6 Attività antibiofilm

Alla luce della spiccata attività antimicrobica nei confronti di *G.vaginalis* DSM4944 e *C.albicans* C3 isolato clinico vaginale, l'impatto del surnatante privo di cellule (CFS) prodotto dai ceppi isolati dal latte materno è stato testato nei confronti del biofilm prodotto dai patogeni vaginali. Il contatto con i CFS ha mostrato una tendenza a inibire il biofilm preformato e quello in formazione di entrambi i patogeni vaginali.

I surnatanti di L1 e L3 hanno ridotto in maniera statisticamente significativa ($p < 0.05$) il biofilm preformato di *C.albicans* C3, i CFS di L1, L3 e *L.rhamnosus* GG (controllo positivo) ha inibito significativamente il biofilm in formazione (Figura 14).

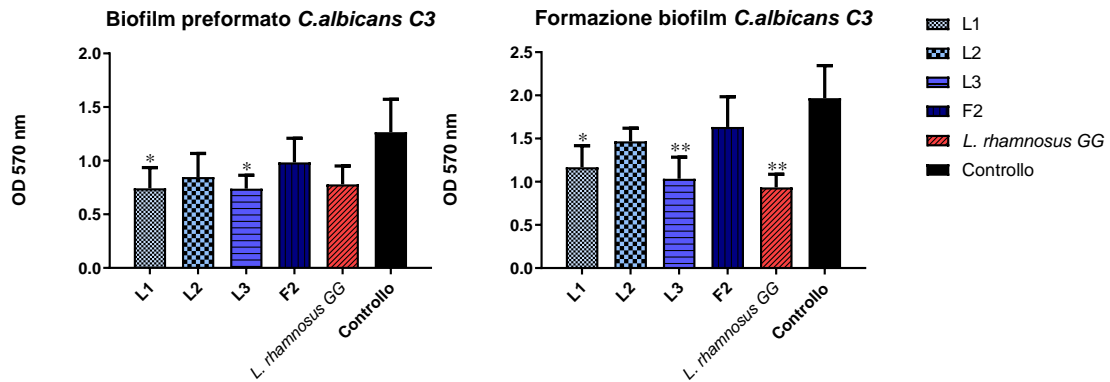


Figura 14 Impatto del CFS dei ceppi isolati dal latte materno sul biofilm di *C.albicans* C3 isolato clinico vaginale. A sinistra l'impatto dei CFS sul biofilm preformato (OD570). A destra l'impatto dei CFS sulla formazione del biofilm (OD570). Controllo: Crescita di *C.albicans* C3 in brodo BHI broth. I valori sono indicati come media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ rispetto al controllo.

Il CFS di tutti i ceppi testati ha determinato una riduzione significativa ($p < 0.05$) del biofilm preformato di *G. vaginalis* DSM4944, soprattutto i ceppi L1, L3 e *L.rhamnosus* GG ($p < 0.01$). Un trend di inibizione è rilevabile anche nella formazione del biofilm e nello specifico L3, F2 e *L.rhamnosus* GG hanno mostrato un'attività significativa (Figura 15).

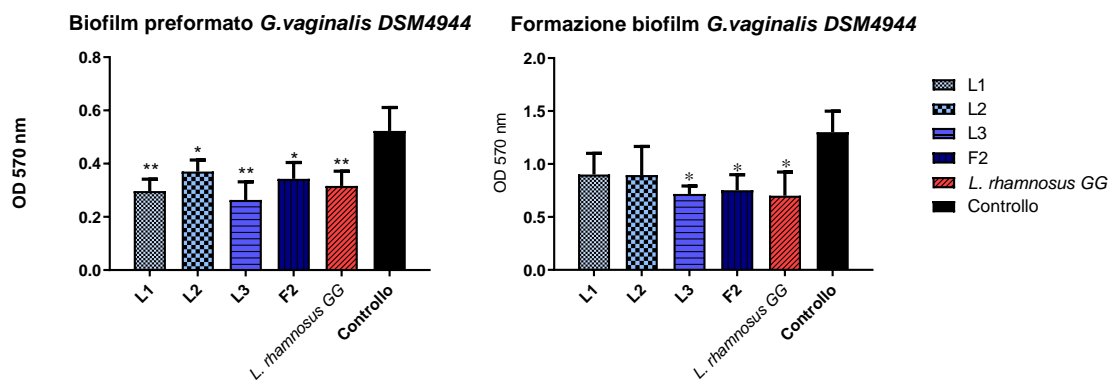


Figura 15 Impatto del CFS dei ceppi isolati dal latte materno sul biofilm di *G. vaginalis* DSM4944. A sinistra impatto dei CFS sul biofilm preformato (OD570). A destra l'impatto dei CFS sulla formazione del biofilm. Controllo: Crescita di *G. vaginalis* in brodo BHI broth. I valori sono indicati come media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ rispetto al controllo.

4.7 Proprietà chimico-fisiche della superficie cellulare batterica

Idrofobicità

La capacità di adesione dei batteri svolge un ruolo importante nella colonizzazione del sito dove andranno ad esplicare le loro azioni benefiche. Pertanto, questa proprietà è stata considerata un potenziale marker per la selezione di nuovi ceppi probiotici.

L'idrofobicità della superficie è stata determinata, utilizzando il test MATH. I ceppi hanno mostrato una differente tendenza di idrofobicità (Tabella 8).

Tabella 8 Adesione dei ceppi isolati dal latte materno e di *L. rhamnosus GG* agli idrocarburi (espressa come idrofobicità %) misurata con il test MATH dopo 30 e 90 minuti (tempo di contatto).

Idrofobicità %			
Ceppi	Tempo di contatto (minuti)	Xylene	Toluene
L1	30'	0.0	0.0
	90'	0.0	0.0
L2	30'	44.6	46.5
	90'	62.4	47.2
L3	30'	13.9	31.9
	90'	46.7	35.6
F2	30'	58.1	61.6
	90'	60.3	66.5
<i>L. rhamnosus GG</i>	30'	65.1	47.9
	90'	67.2	48.2

I Lattobacilli possono essere classificati in tre gruppi in base alla percentuale di idrofobicità: bassa (da 0% a 35%), moderata (da 36% a 70%) e alta (da 71% a 100%) (Ekmekci, H. *et al.*, 2009). Per tale ragione L3 si può considerare un ceppo a bassa idrofobicità, al contrario di L1, L2, F2 e il ceppo di controllo *L.rhamnosus GG* che, viste le percentuali ottenute, possono essere considerati ceppi a moderata idrofobicità.

Auto-aggregazione

Per esercitare effetti benefici, i probiotici devono raggiungere una massa adeguata attraverso l'aggregazione. Infatti, tale capacità sembra avere un'influenza sulla loro adesione alle cellule epiteliali intestinali (Satyanarayana, T. *et al.*, 2016).

La capacità di auto-aggregazione dei ceppi testati è stata determinata a tempi diversi (2, 5 e 24 ore). In generale, la capacità di auto-aggregazione è aumentata con il passare del tempo. In dettaglio, rispetto al controllo positivo, hanno mostrato una miglior capacità di auto-aggregazione, in ordine crescente L2, L3 e F2. Viceversa, L1 ha esibito una propensione minore all'auto-aggregazione (Tabella 9).

Tabella 9 Capacità di auto-aggregazione dei ceppi isolati dal latte materno e L. rhamnosus GG valutata dopo 2, 5 e 24 ore di incubazione.

Auto-aggregazione %			
Ceppi	2h	5h	24h
L1	10,35	21,68	52,3 %
L2	14,52	29,58	75,8 %
L3	8,03	24,09	69,9 %
F2	14,39	30,07	69,3 %
<i>L. rhamnosus GG</i>	15,35	31,68	77,3 %

Formazione di biofilm

Gli esperimenti condotti in questo studio hanno permesso di misurare il tasso di adesione e la conseguente formazione di biofilm dei batteri testati.

I ceppi sono stati classificati come: non produttori di biofilm ($OD \leq OD_c$), debolmente produttori di biofilm ($OD_c < OD \leq OD_c$), moderatamente produttori di biofilm ($2OD_c < OD \leq 4OD_c$), fortemente produttori di biofilm ($OD < 4OD_c$) (Tabella 4). Sono stati classificati come deboli produttori (L1 e L3) e moderati produttori (L2 e F2) di biofilm rispetto al controllo positivo *L. rhamnosus GG* che ha dimostrato avere una forte capacità di formare biofilm (Tabella 10).

Tabella 10 Capacità di formazione di biofilm dei ceppi isolati dal latte materno e *L. rhamnosus GG*.

Biofilm		
Ceppi	Assorbanza media	Risultato
L1	0.080	Debole
L2	0.161	Moderato
L3	0.075	Debole
F2	0.136	Moderato
<i>L. rhamnosus GG</i>	0.290	Forte

4.8 Sopravvivenza al transito nel tratto gastrointestinale (GIT)

In seguito alla simulazione del transito attraverso il tratto gastrointestinale *in vitro*, è stata valutata la sopravvivenza dei ceppi isolati dal latte materno con lo scopo di verificare se assunti *per os*, a stomaco pieno o vuoto, potessero arrivare nel tratto intestinale vitali per espletare la loro azione probiotica.

Dall'analisi dei dati ottenuti è stato riscontrato che questi ceppi esibiscono una differente sensibilità alle condizioni di stress simulato nel passaggio gastrointestinale.

Nello specifico, il ceppo L1 è riuscito a sopravvivere fino al transito nella cavità orale. I ceppi L2, L3 e F2 hanno mostrato una capacità di sopravvivenza, sia attraverso la cavità orale che attraverso lo stomaco.

La vitalità, in seguito al transito in uno stomaco vuoto, è risultata differente per i vari ceppi. Nello specifico, dopo 30 minuti nello stomaco, il ceppo L1 ha mostrato assenza di vitalità, al contrario i ceppi L2, L3 e F2 hanno esibito una discreta capacità di sopravvivenza. Il ceppo L2 ha mostrato una vitalità di due logaritmi inferiore rispetto all'inoculo di partenza, F2 una vitalità di cinque logaritmi inferiore rispetto al tempo 0 e L3 una vitalità molto simile all'inoculo di partenza; infatti, è l'unico dei quattro ceppi che è sopravvissuto anche al transito intestinale (Tabella 11).

Tabella 11 Transito attraverso il GIT a stomaco vuoto.

Sopravvivenza nel GIT a stomaco vuoto (UFC/mL)				
Ceppi	Inoculo iniziale	T Saliva	T Gastrico 30'	T Intestino 30'
L1	7.9×10^8	5.2×10^8	0	0
L2	5.8×10^8	5.4×10^8	7.4×10^8	0
L3	4.2×10^9	5.6×10^8	4.4×10^8	6.8×10^2
F2	9.4×10^8	9.0×10^8	6.8×10^8	0
<i>L. rhamnosus GG</i>	9.7×10^8	9.2×10^8	7.9×10^8	3.6×10^6

Nello stomaco pieno, in cui si prevede una permanenza di 90', L1 non ha mantenuto la vitalità, L2 è rimasto vitale, ma diminuendo la sua carica di due logaritmi, L3 di è ridotto di un logaritmo e L3 di cinque. Nessuno dei ceppi, però, ha mostrato vitalità dopo il transito intestinale a stomaco pieno (Tabella 12).

Il controllo positivo *L.rhamnosus GG*, invece, ha mantenuto una buona vitalità sia dopo il transito a stomaco pieno che vuoto.

Tabella 12 Transito attraverso il GIT a stomaco pieno.

Sopravvivenza nel GIT a stomaco vuoto (UFC/mL)				
Ceppi	Inoculo iniziale	T Saliva	T Gastrico 90'	T Intestino 90'
L1	7.9×10^8	5.2×10^8	0	0
L2	5.8×10^8	5.1×10^8	1.2×10^6	0
L3	4.2×10^9	5.6×10^8	1.6×10^8	0
F2	9.4×10^8	9.0×10^8	6.4×10^5	0
<i>L. rhamnosus GG</i>	9.7×10^8	9.2×10^8	6.7×10^8	5.7×10^5

4.9 Identificazione fenotipica

Lo studio del metabolismo enzimatico e dei carboidrati dei ceppi isolati dal latte materno, donato da volontarie sane, è stato condotto con l'ausilio dei kit API 50 CHL e i risultati sono stati confermati con l'ausilio del *software* di identificazione *ApiwebTM*.

I risultati ottenuti, hanno evidenziato una “eccellente identificazione”, per L2, L3 e F2 con una percentuale di similarità pari al 99,9% con *L. fermentum* (Figura 16). Per L1, invece, l'*output* del *software* ha restituito una percentuale di similarità molto vicina (99,9%) al *L. plantarum* (Figura 17). A titolo esemplificativo, in Tabella 13 e Tabella 14 sono riportati gli *output* rispettivamente di L1 e F2.

4.10 Identificazione molecolare

Per confermare l'identificazione fenotipica ottenuta mediante API 50CHL si è deciso di procedere con l'identificazione molecolare tramite multiplex PCR per la discriminazione di undici specie di *Lactobacillus spp* (Song *et al.*,2002).

Come mostrato in Figura 18, i ceppi L2, L3 e F2, così come il controllo positivo (C+Lf) (*L. fermentum* ATCC23271) hanno generato una banda 210bp corrispondente al *L.fermentum*

Il ceppo L1 e il controllo positivo (C+Lp) (*L. plantarum* ATCC 14917) hanno generato una banda di 205 bp corrispondente a *L.plantarum*. (Figura 18).

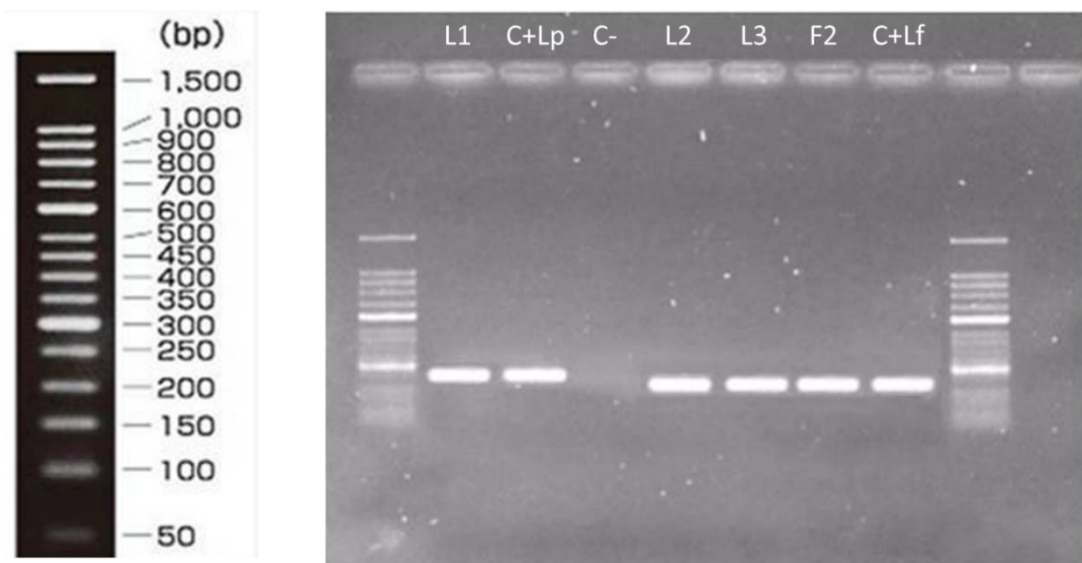


Figura 18 Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1.5% dei quattro ceppi con potenzialità probiotiche isolati dal latte materno. Marcatore di peso molecolare (M), controlli positivi (C+Lp e C+Lf), controllo negativo (C-). A sinistra marcatore di peso molecolare 50 bp DNA Ladder (Dye Plus) (Takara BIO INC., Japan).

4.11 Saggio di vitalità cellulare (MTT)

Al fine di valutare gli effetti dei microrganismi isolati dal latte materno sulla linea cellulare VK2 E6/E7 è stata preliminarmente valutata la loro influenza sulla vitalità cellulare tramite un saggio MTT. A seguito del trattamento con le sospensioni batteriche (vivi, tindalizzati e CFS), la vitalità cellulare è stata espressa in percentuale rispetto alle cellule non trattate. Non ci sono differenze significative tra i gruppi trattati con le sospensioni test e il controllo (*L.rhamnosus GG*) dimostrando che le sospensioni non influenzano la vitalità cellulare (Figura 19).

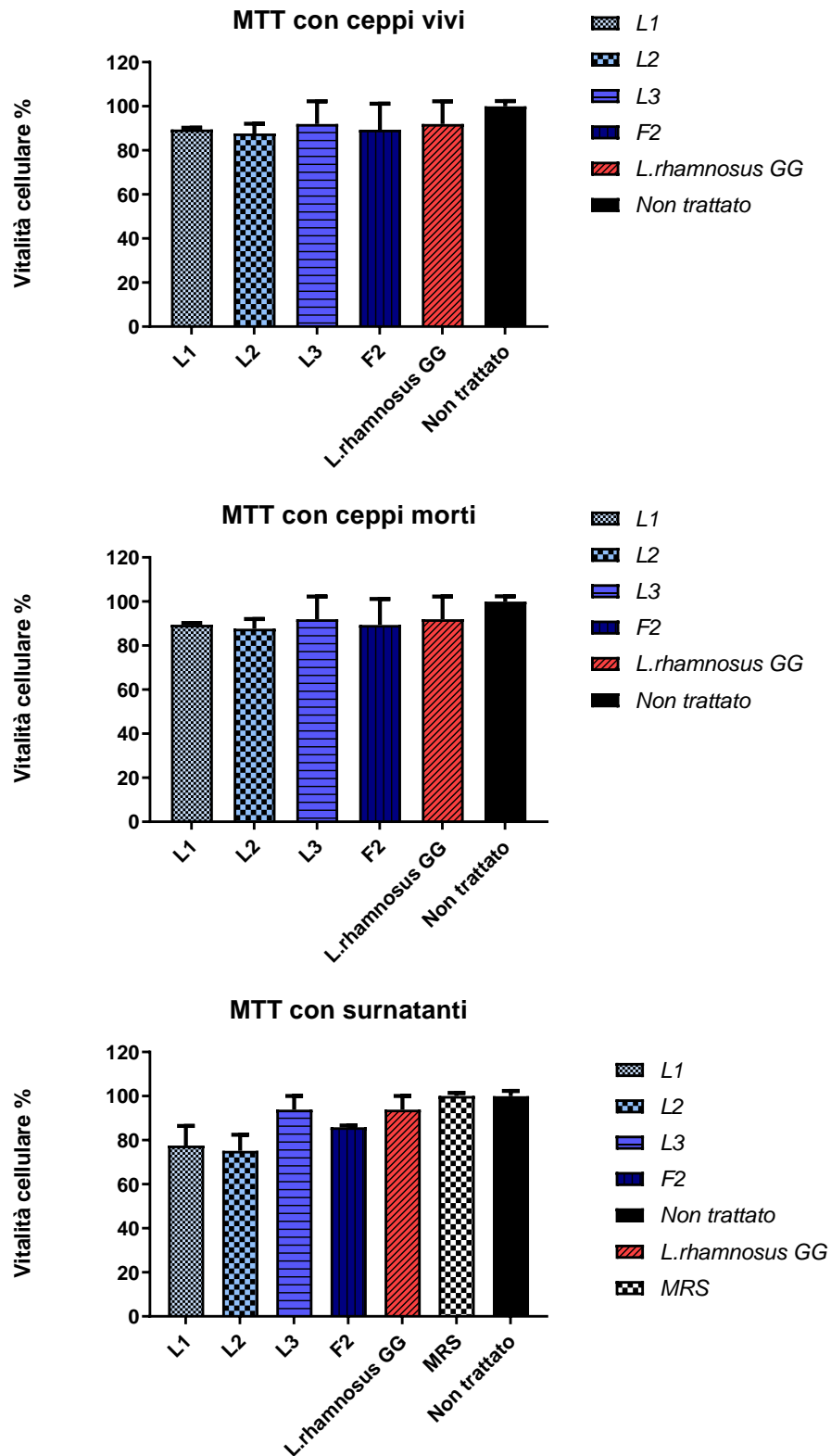


Figura 19 Saggio MTT per la valutazione della citotossicità le sospensioni test (batteri vivi, uccisi e surnatanti) sulla linea cellulare VK2 E6/E7. I risultati sono espressi come media \pm DS.

4.12 Adesione alla linea cellulare VK2/E6E7

L'adesione dei ceppi L1, L2, L3, F2 e *L.rhamnosus GG* (controllo positivo) alla linea cellulare VK2 E6E7 è stata valutata tramite l'inoculo di tre diverse concentrazioni $1,5 \times 10^7$, $1,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. I risultati del saggio di adesione, dopo due ore di contatto dei ceppi con le cellule, sono stati valutati mediante conteggio della crescita microbica su MRS agar (Figura 20).

I ceppi testati hanno mostrato un buon tropismo verso la linea cellulare VK2/E6E7 evidenziando un comportamento ceppo-specifico in merito alla capacità di adesione.

Nel dettaglio, alla concentrazione di inoculo di partenza pari a $1,5 \times 10^5$ UFC/mL è stato possibile riscontrare un aumento di oltre un logaritmo della crescita batterica. Al contrario, si è assistito a un decremento di poco meno un logaritmo per le concentrazioni di partenza di $1,5 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^7$ UFC/mL (Figura 20). Alla luce di questi risultati, è stata scelta la concentrazione di $1,5 \times 10^5$ UFC/mL per gli esperimenti successivi.

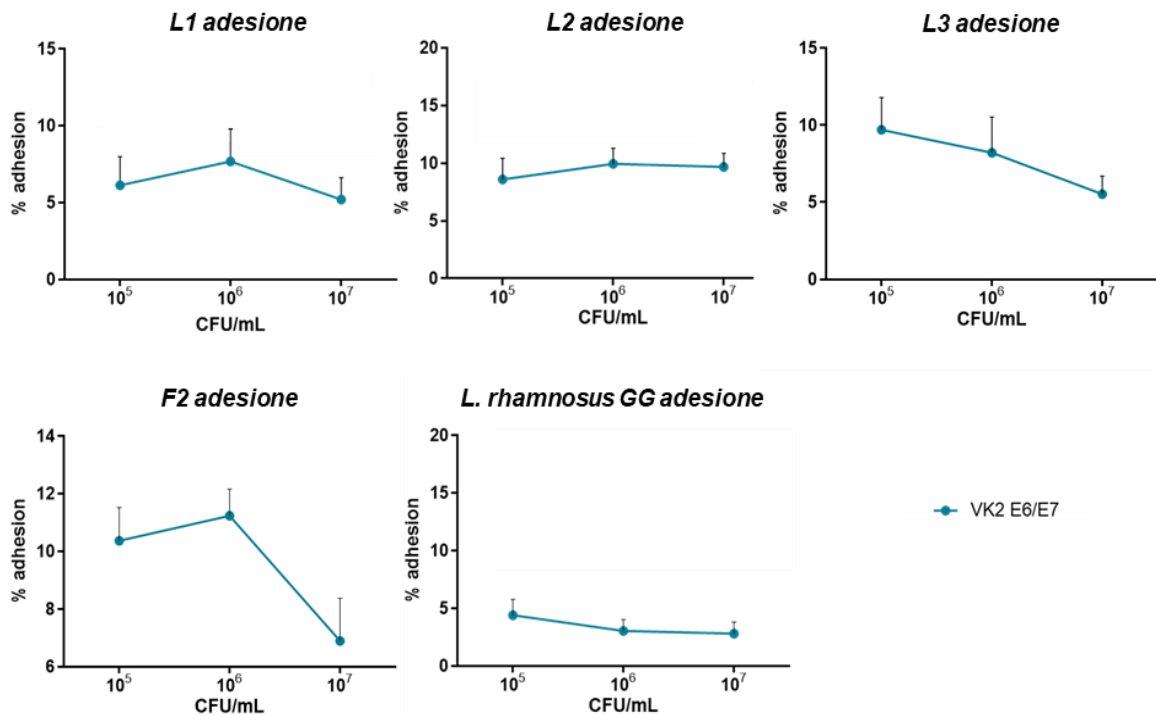


Figura 20 Percentuale di adesione dei ceppi isolati dal latte materno alla linea cellulare VK2 E6/E7 in base ai diversi inoculi di partenza.

È stata valutata, quindi, la differenza di adesione dei vari ceppi isolati dal latte materno alla linea cellulare VK2 E6/E7 rispetto al controllo positivo *L. rhamnosus GG* con lo stesso inoculo di partenza ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL). Contestualmente, è stata valutata l'adesione dei due patogeni vaginali *C.albicans C3* e *G.vaginalis DSM4944*. Emerge che la capacità di adesione è chiaramente ceppo-specifica e che i microrganismi isolati dal latte hanno uno spiccato *trend* di adesione. Nel dettaglio, mostrano percentuali di adesione statisticamente significative L2 (* $p < 0.05$) e F2 (** $p < 0.01$) se confrontate a quelle del *L. rhamnosus GG* (Figura 21).

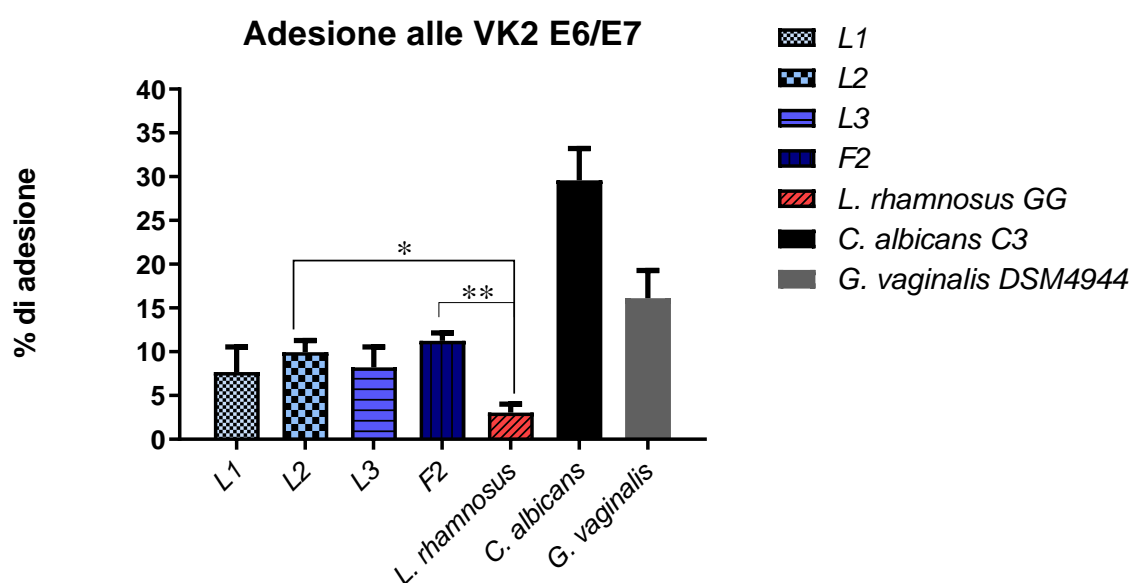


Figura 21 Percentuale di adesione dei ceppi isolati dal latte materno (L1, L2, L3 e F2), del *L. rhamnosus GG* e dei patogeni vaginali *C. albicans C3* e *G.vaginalis DSM4944* alla linea cellulare VK2 E6/E7.

4.13 Attività antimicrobica su VK2 E6/E7

L'effetto inibitorio dei ceppi potenzialmente probiotici sull'adesione di *C. albicans C3* e *G.vaginalis DSM4944* alla linea cellulare VK2 E6/E7 è stato valutato mimando *in vitro* diversi scenari: lo spiazzamento del patogeno già adeso; la competizione per i siti di adesione (competizione); il pretrattamento con i probiotici (esclusione).

Nel dettaglio, per quanto concerne l'esperimento di spiazzamento *C.albicans C3* isolato clinico vaginale, si è notato un trend di riduzione dell'adesione del patogeno alle VK2 E6/E7 in presenza di L1, L2 e *L. rhamnosus GG*.

D'altro canto, non sono state rilevate differenze statisticamente significative nella percentuale di adesione del patogeno non trattato rispetto ai trattati. Nessuna differenza statisticamente significativa nemmeno per il controllo *L. rhamnosus* GG (Figura 22).

Nell'esperimento di competizione si è avuta una riduzione statisticamente significativa della capacità di adesione di *C. albicans* C3 da parte di L1, L2 e F2 (* $p < 0.05$) rispetto al controllo non trattato (Figura 22). Nel gruppo trattato preventivamente con i lattobacilli (esclusione), si è evidenziata una riduzione statisticamente significativa della capacità di adesione di *C. albicans* C3 da parte di L1, L2 e *L. rhamnosus* GG (* $p < 0.05$) e F2 (** $p < 0.01$) rispetto al controllo non trattato (Figura 22).

Per quanto riguarda *G.vaginalis* DMS4944, nell'esperimento di spiazzamento si è rilevato un trend di riduzione dell'adesione del patogeno alle VK2 E6/E7 da parte di L1, L2 e *L.rhamnosus* GG, non sono state rilevate differenze statisticamente significative della percentuale di adesione rispetto al controllo non trattato (Figura 23).

Nell'esperimento di co-incubazione (competizione) si è registrata una riduzione statisticamente significativa da parte di F2 (* $p < 0.05$) rispetto al controllo non trattato.

Nella prova di profilassi con i lattobacilli (esclusione), si è rilevata una riduzione statisticamente significativa della capacità di adesione di *G.vaginalis* DSM4944 da parte di L1, F2 e *L. rhamnosus* GG (*** $p < 0.001$), L2 e L3 (** $p < 0.01$) rispetto al controllo non trattato (Figura 23).

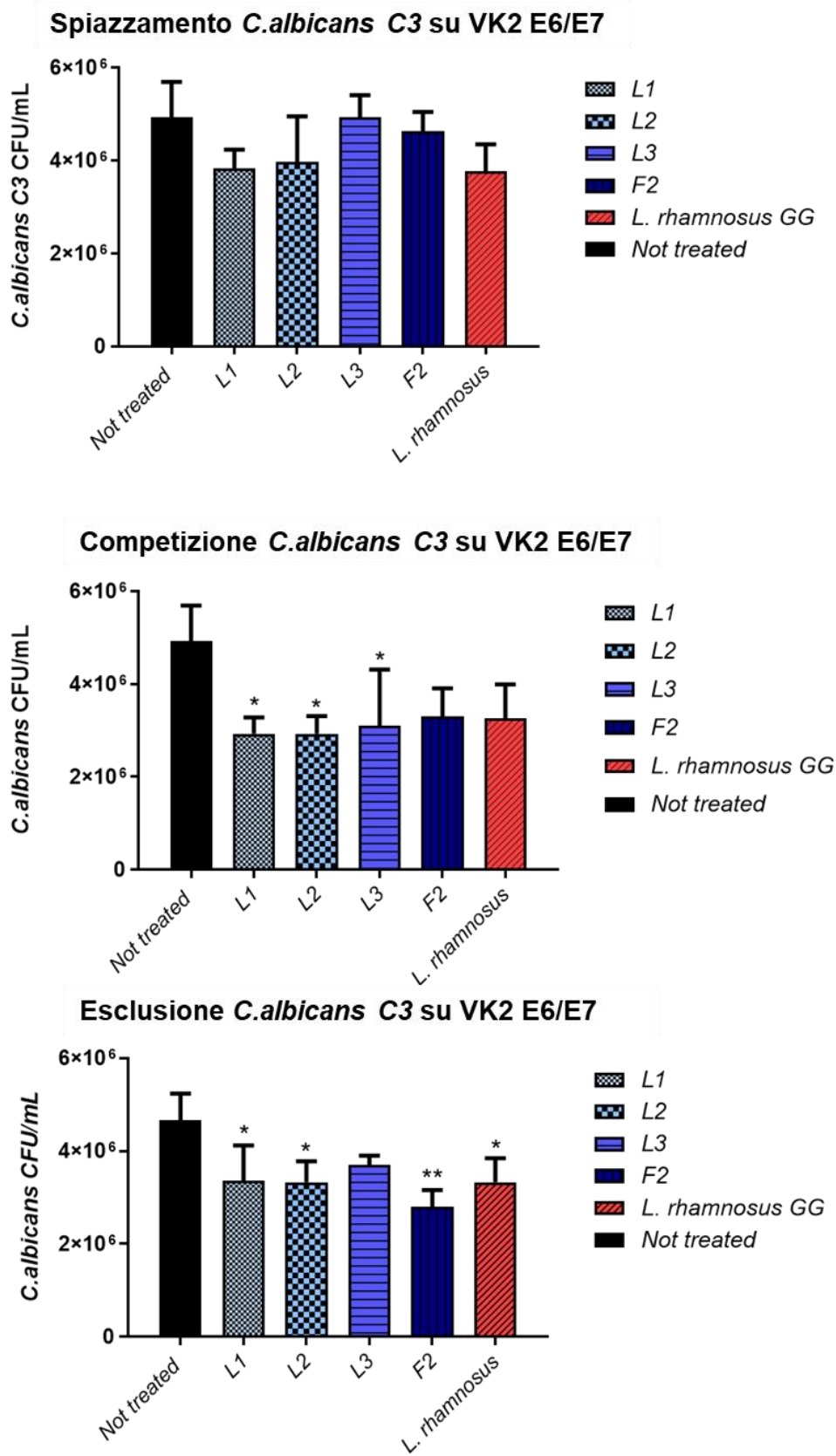
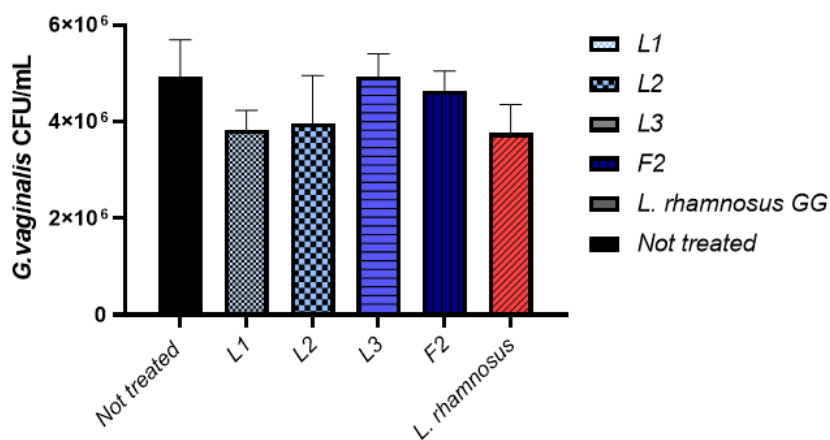
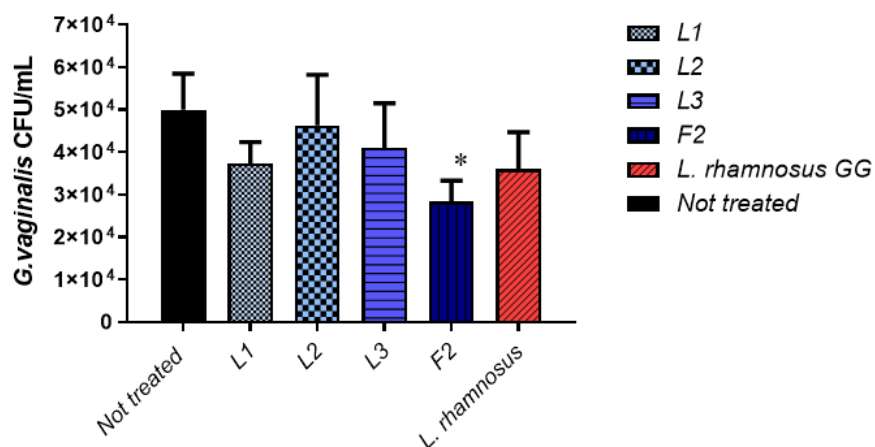


Figura 22 Variazione della percentuale di adesione alla linea VK2 E6/E7 di *C.albicans* C3 non trattata o trattata con i lattobacilli isolati dal latte materno e con *L.rhamnosus* GG (controllo positivo).

Spiazzamento *G.vaginalis* DSM4944 su VK2 E6/E7



Competizione *G.vaginalis* DSM4944 su VK2 E6/E7



Esclusione *G.vaginalis* DSM4944 su VK2 E6/E7

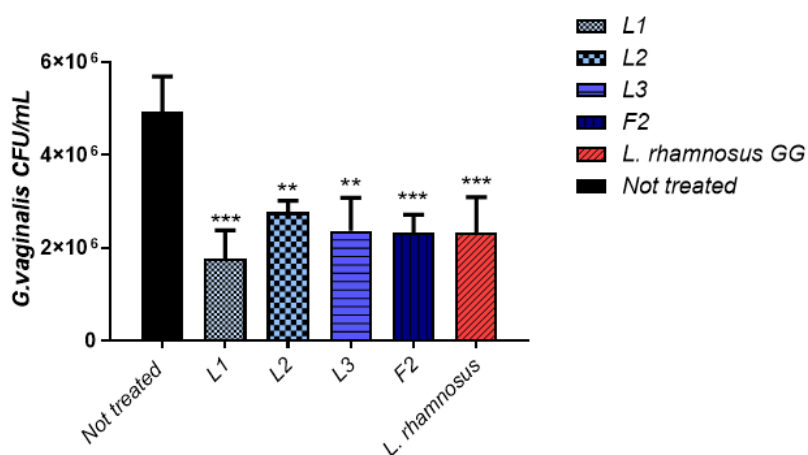


Figura 23 Variazione della percentuale di adesione alla linea VK2 E6/E7 di *G.vaginalis* DSM4944 non trattata o trattata con i lattobacilli isolati dal latte materno e con *L.rhamnosus* GG (controllo positivo).

4.14 Saggio di migrazione delle cellule VK2 E6/E7

I ceppi L1, L2, L3 e F2 non ostacolano la migrazione delle cellule dell'epitelio vaginale VK² E6/E7 e conservano una tendenza di rimarginazione simile a tutti i tempi testati (Figura 24).

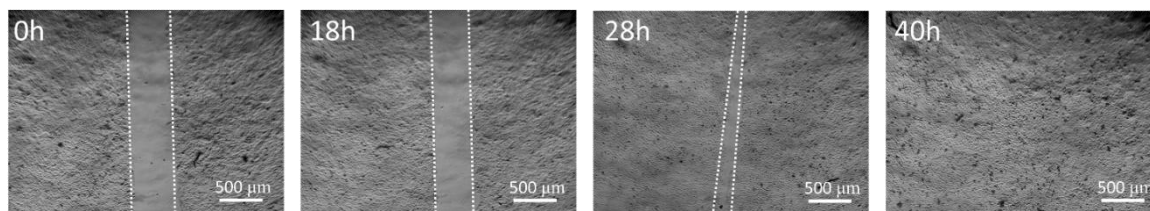


Figura 24 Capacità di migrazione delle cellule epiteliali VK2 E6/E7 trattate con L1. Le immagini al microscopio sono rappresentative del risultato di tre esperimenti indipendenti. Le linee bianche tratteggiate indicano l'area del setto, ingrandimento 40x.

È stato rilevato che la linea cellulare VK2 E6/E7, se trattata con le sospensioni dei ceppi con potenzialità probiotiche, ha esibito una velocità di migrazione comparabile al controllo non trattato. Viceversa, sia *G. vaginalis* DSM 4944 che *C. albicans* C3, hanno notevolmente rallentato la migrazione/proliferazione della linea cellulare causando una riduzione molto significativa ($p < 0.01$) della capacità di rimarginazione al punto che, anche al termine del periodo di monitoraggio, non si è osservata la chiusura del setto.

Le cellule trattate con i CFS di L1, L2, L3 e F2 al pari del controllo positivo (*L. rhamnosus* GG) hanno mostrato una significativa differenza ($p < 0.01$) del tasso di proliferazione rispetto alle cellule trattate con i due microrganismi patogeni raggiungendo la totale rimarginazione del setto alla quarantesima ora (T40) (Figura 25).

Migrazione delle VK2 E6/E7

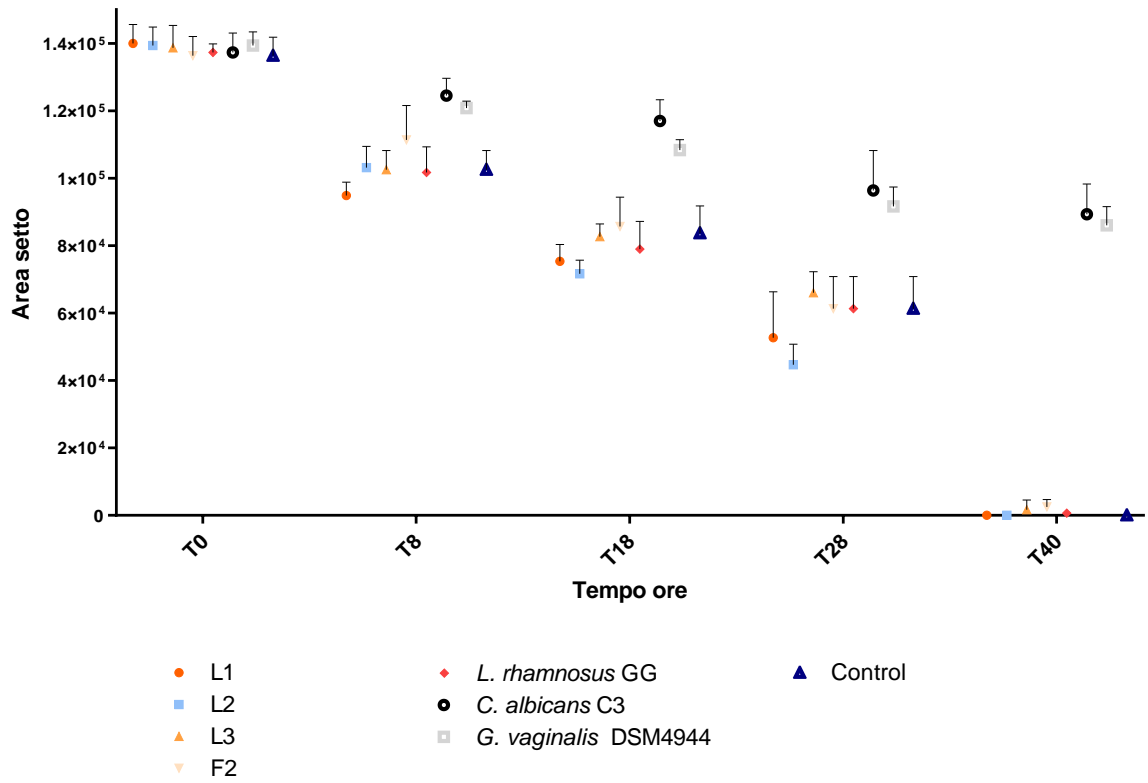


Figura 25 Saggio di migrazione delle cellule VK2 E6/E7 in presenza di ceppi potenzialmente probiotici, del controllo positivo (*L.rhamnosus* GG) e dei patogeni vaginali *G.vaginalis* DSM4944 e *C.albicans* C3.

Discussione e conclusioni

La composizione microbiologica del latte materno è stata studiata fin dal XIX secolo interpretando la presenza microbica da una prospettiva puramente infettivologica. L'attuale rivalutazione dei microbi quali commensali e la crescente disponibilità di nuove tecnologie, ha posto le basi per lo studio e la caratterizzazione del microbiota del latte materno (Moossavi, S. *et al.*, 2020). Questo *know-how* scientifico si traduce in un miglioramento della conoscenza del microbiota come *target* terapeutico per il trattamento e la prevenzione di patologie di varia natura (Laursen, M. F. *et al.*, 2021; Grady, N. G. *et al.*, 2016).

Un gran numero di malattie ad eziologia multifattoriale, tra cui quelle infiammatorie, autoimmuni, metaboliche, neoplastiche e neurodegenerative sono state recentemente associate alle disbiosi, vale a dire ad alterazioni compositive e funzionali del microbiota residente. Lo studio del microbiota è chiamato a decifrare i meccanismi coinvolti nella generazione e nella persistenza di configurazioni disbiotiche e a differenziarne le associazioni causali ospite-microbiota dai cambiamenti microbici secondari che accompagnano il decorso della malattia (Levy M. *et al.*, 2017).

In questo contesto, considerando che la vagina è il tratto dei genitali femminili esposto all'ambiente esterno, essa rappresenta un sito primario di interazione ospite-microbo. Il microbiota vaginale è costituito da una combinazione equilibrata di oltre 250 specie batteriche, tra cui *Lactobacillus spp* che ne costituisce la componente predominante (Podolsky, D.K. *et al.*, 1999, Qian, Z., 2021).

La disbiosi vaginale è caratterizzata dalla perdita della dominanza di *Lactobacillus spp* e dall'aumento della diversità microbica, pertanto, l'intervento sulla composizione del microbiota è significativo e promettente nella prevenzione e nel trattamento delle malattie ginecologiche. L'equilibrio microbico può essere alterato e indurre varie patologie infettive, caratterizzate da crescita eccessiva di batteri anaerobi come *Gardnerella vaginalis* (agente di vaginite batterica e vaginite atrofica, BV e AV) e lieviti quali *Candida albicans* (agente di candidosi vulvovaginale, VVC) (Han, Y., Liu, Z., & Chen, T. 2021).

Il trattamento di queste infezioni, tendenzialmente polimicrobiche, è costituito da agenti antimicrobici per via orale o intravaginale, che possono raggiungere un tasso di guarigione superiore all'80% (Nurbhai *et al.*, 2007; Sobel e Sobel, 2018).

Tuttavia, gli effetti collaterali concomitanti (diarrea, minzione anomala, bruciore, prurito e irritazione vaginale), la resistenza ai farmaci e l'alto tasso di recidive ostacolano la guarigione e rappresentano una minaccia per la salute (Xie *et al.*, 2017).

Per tale ragione, i probiotici, che ottimizzano la fisiologica eubiosi vaginale producendo sostanze antimicrobiche naturali, si sono dimostrati un valido ausilio terapeutico nella prevenzione e terapia delle infezioni dell'apparato genitale femminile (Barrons, R., & Tassone, D. 2008).

Numerosi studi *in vivo* e *trial* clinici hanno validato l'efficacia terapeutica della somministrazione di *Lactobacillus spp.* nel trattamento e nella riduzione delle recidive della BV attraverso il ripristino del microbiota vaginale (Mei, Z., & Li, D. 2022).

Studi *in vitro* dimostrano che i lattobacilli possono svolgere un'attività antimicrobica attraverso vari meccanismi contribuendo all'acidificazione del pH vaginale, producendo batteriocine, rilasciando biosurfattanti e co-aggregandosi con i patogeni per ridurre l'adesione alle cellule epiteliali (Foschi *et al.*, 2017).

Gli effetti benefici dei probiotici, che si esplicano soprattutto tramite competizione con i microrganismi patogeni, vanno valutati di pari passo ai criteri di sicurezza, come la sensibilità agli antibiotici, al fine di ridurre possibili *reservoir* di antibiotico resistenza (Daniali, M., Nikfar, S., & Abdollahi, M. 2020). Poiché non tutti i ceppi hanno le medesime potenzialità, la nicchia ecologica del microrganismo potrebbe essere discriminante ipotizzando che i ceppi isolati da latte materno possano essere particolarmente vocati quali potenziali probiotici fisiologici.

Nel presente studio, sono state valutate le potenzialità probiotiche di microrganismi isolati dal latte materno donato da volontarie sane. Inizialmente sono stati discriminati i microrganismi in grado di crescere in terreni selettivi e che corrispondessero alle caratteristiche microscopiche dei Batteri Acidi Lattici (LAB). Sono stati poi verificati i criteri di sicurezza definiti dall'EFSA selezionando i batteri lattici con un adeguato profilo di sensibilità agli antibiotici. Successivamente, sono stati valutati alcuni dei criteri di funzionalità quali l'attività antagonista nei confronti di agenti patogeni. Questa ha permesso di selezionare quattro batteri lattici con elevata attività antimicrobica nei confronti di un *pool* di microrganismi coinvolti nelle infezioni intestinali, cutanee, ma soprattutto vaginali caratterizzando preliminarmente un'attività antimicrobica di natura proteica (Diagramma 1).

Di notevole rilevanza è stata l'attività di inibizione della crescita *in vitro* e anche l'interferenza con la formazione del biofilm prodotto da *G. vaginalis* DSM4944 e *C. albicans* C3 che costituisce uno dei fattori principalmente coinvolti nell'eziologia e nel decorso delle infezioni vulvovaginali ricorrenti (Figura 14 Figura 15) (Qian, Z. *et al.*, 2021).

I microrganismi probiotici devono essere in grado di raggiungere, aderire e proliferare nel sito d'azione, per poter esplicare i loro effetti benefici (Salminen *et al.*, 1996). Di conseguenza, l'auto-aggregazione e il transito gastrointestinale *in vitro* sono stati valutati come criteri di funzionalità richiesti per l'attività probiotica. Le proprietà chimico-fisiche della superficie cellulare dei ceppi analizzati mostrano che la tendenza all'auto-aggregazione è aumentata con il passare del tempo, in accordo con i risultati ottenuti da altri autori (Collado M.C. *et al.*, 2008). Inoltre, solo uno dei quattro lattobacilli isolati ha mostrato una elevata sopravvivenza al transito gastrointestinale (Tabella 11 Tabella 12). Questo risultato mette in evidenza la necessità di un'adeguata formulazione farmaceutica mediante il processo di microincapsulazione al fine di soddisfare i criteri legislativi richiesti per la commercializzazione dei probiotici assunti per via orale (Vivek, K., 2022).

Gli studi fenotipici hanno permesso l'identificazione dei quattro ceppi (un *L. plantarum* e tre *L. fermentum*) tramite il profilo metabolico partendo da substrati differenti. I ceppi testati sono stati in grado di metabolizzare alcuni zuccheri, quali lattosio, galattosio, glucosio, fruttosio e mannosio, coinvolti nelle più comuni intolleranze glucidiche fornendo i presupposti per una futura sperimentazione in pazienti con intolleranze caratterizzate da specifici deficit enzimatici (Staudacher H., 2015).

L'identificazione molecolare mediante sequenziamento della 16S rDNA ha confermato il profilo fenotipico (Figura 16, Figura 17 e Figura 18) evidenziando la presenza di questi ceppi nel latte materno in accordo anche con la più recente letteratura (Banić, M., *et al.*, 2022).

A seguito dell'identificazione, si è proceduto alla determinazione delle potenzialità probiotico-terapeutiche sulla linea cellulare di mucosa vaginale VK2 E6/E7. In accordo con studi precedenti (Jallouk, A. P. *et al.*, 2014; Coudeyras, S, 2008), i risultati ottenuti hanno confermato il tropismo dei microorganismi verso la linea cellulare sottolineato sia dalle capacità di adesione che dai saggi di vitalità cellulare (Figura 19 e Figura 21).

Inoltre, ciascuno dei lattobacilli è stato in grado di influenzare, se pur in maniera diversa, l'adesione dei patogeni alla linea cellulare VK2 E6/E7 che si riduce con valori statisticamente significativi soprattutto in pretrattamento (Figura 22 e Figura 23). Anche se in maniera preliminare, questi risultati suggeriscono che i quattro lattobacilli siano in grado di interferire con i meccanismi di adesione adoperati da *G.vaginalis* DSM4944 e *C.albicans* C3 nella distruzione della barriera epiteliale.

L'integrità della barriera epiteliale è necessaria per limitare l'ingresso di agenti patogeni e la riepitelizzazione è una fase importante della riparazione delle ferite mucosali, così come di quelle della pelle e di altri tessuti ripristinando l'integrità della barriera (Podolsky, D.K. *et al.*, 1999). Il saggio di migrazione ha permesso di verificare la capacità di promuovere la fisiologica proliferazione delle cellule epiteliali (Figura 25), in paragone all'infezione con *G.vaginalis* DSM4944 e *C.albicans* C3 dove si osserva una totale inibizione della migrazione, confermando la tendenza a creare lesioni nell'epitelio vaginale (Zevin AS, *et al.*, 2016).

In conclusione, il presente studio ha dimostrato che il microbiota del latte materno può essere una risorsa di validi microrganismi con potenzialità probiotico-terapeutiche. Nello specifico, sono stati identificati tre ceppi di *L. fermentum* e un *L.plantarum* che hanno dimostrato caratteristiche di sicurezza necessarie per un probiotico come l'elevata sensibilità agli antibiotici. Per quanto riguarda i criteri di funzionalità, hanno mostrato capacità di auto-aggregazione e adesione, attività antagonistica nei confronti della crescita e della formazione di biofilm prodotto dai patogeni vaginali garantendo la fisiologica proliferazione delle cellule epiteliali vaginali.

Questi risultati offrono numerosi spunti di ricerca. Ad esempio, vista l'attività antimicrobica nei confronti di ceppi patogeni coinvolti in vari distretti corporei, sarebbe interessante valutarne l'attività anche sulle specifiche linee cellulari considerando infezioni polimicrobiche e trattamenti con combinazioni di probiotici, prebiotici e post-biotici. Contestualmente si potrebbe valutare il ruolo di questi ceppi nella flogosi e nello stress ossidativo tipici dei processi infettivi. Per esplorare a fondo i meccanismi e la sicurezza dei probiotici saranno necessari ulteriori studi su modelli animali e *trial* clinici.

5 Bibliografia

1. Abrahamsson T.R., Jakobsson H.E., Andersson A.F., Björkstén B., Engstrand L., Jenmalm M.C. (2012). "Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema". *J Allergy Clinical Immunology*. 129(2): 434-40.
2. Ahern, G.J.; Hennessy, A.; Ryan, C.A.; Ross, R.P.; Stanton, C. *Advances in infant formula science. Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2019, 10, 75–102
3. Akbari E., Asemi Z., Daneshvar K.R., Bahmani F., Kouchaki E., Tamtaji O.R., Hamidi G.A., Salami M. (2016). "Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial". *Frontiers in Aging Neuroscience*. 8: 256.
4. American Association for the Advancement of Science. (1889). *BACTERIA IN MILK AND ITS PRODUCTS*. *Science*, (341), 116-118.
5. Anjum, Jasia, et al. "Lactobacillus commensals autochthonous to human milk have the hallmarks of potent probiotics." *Microbiology* 166.10 (2020): 966-980.
6. Appanna, V. D. (2018). *Human microbes-the power within: Health, healing and beyond*. Springer.
7. Babina, K., Salikhova, D., Polyakova, M., Svitich, O., Samoylikov, R., Ahmad El-Abed, S., ... & Novozhilova, N. (2022). The effect of oral probiotics (*Streptococcus salivarius* k12) on the salivary level of secretory immunoglobulin a, salivation rate, and oral biofilm: a pilot randomized clinical trial. *Nutrients*, 14(5), 1124.
8. Banić, M., Butorac, K., Čuljak, N., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Bellich, B., ... & Kos, B. (2022). The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Biomolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14382.
9. Barichella M., Pacchetti C., Bolliri C., Cassani E., Iorio L., Pusani C., Pinelli G., Privitera G., Cesari I., Faierman S.A., Caccialanza R., Pezzoli G. and Cereda E. (2016). "Probiotics and prebiotic fiber for constipation associated with Parkinson disease: An RCT". *Neurology* 87(12): 1274-80.
10. Barrons, R., & Tassone, D. (2008). Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clinical therapeutics*, 30(3), 453-468.
11. Belhadj, F.Z.B.; Boublenza, F.; Karam, N.-E. Stress tolerance in *Lactobacillus plantarum* LMF6 isolated from human breast milk. *South Asian J. Exp. Biol.* 2020, 9, 173–184.
12. Bellaguarda E. and Chang E.B. (2015). "Curr Gastroenterol IBD and the gut microbiota--from bench to personalized medicin". *Current gastroenterology reports* 17(4): 15.
13. Bergmann, H., Rodríguez, J. M., Salminen, S., & Szajewska, H. (2014). Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. *British Journal of Nutrition*, 112(7), 1119-1128.

14. Bhat B, Bajaj BK. Multifarious cholesterol lowering potential of lactic acid bacteria equipped with desired probiotic functional attributes. *3 Biotech* 2020;10:1–16. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02183-8>.
15. Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 3(2), 135-140
16. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, D Lieber A, Wu F, Perez-Perez GI, Chen Y, Schweizer W, Zheng X, Contreras M, Dominguez-Bello MG, Blaser MJ. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med.* 2016 Jun 15;8(343):343ra82. doi: 10.1126/scitranslmed.aad7121. PMID: 27306664; PMCID: PMC5308924.
17. Bond, D.M.; Morris, J.M.; Nassar, N. Study protocol: Evaluation of the probiotic *Lactobacillus Fermentum* CECT5716 for the prevention of mastitis in breastfeeding women: A randomised controlled trial. *BMC Pregnancy Childbirth* 2017, 17, 148.
18. Boreman, G.D., *Modulation transfer function in optical and electro-optical systems. Vol. 4. 2001: SPIE press Bellingham, Washington.*
19. Boris, S., Suárez, J. E., & Barbés, C. (1998). Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus fermentum* RC-14. *Canadian journal of microbiology*, 44(4), 314-320.
20. Botes, M.; Loos, B.; van Reenen, C.A.; Dicks, L.M. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA
21. Bradshaw, C.S., Sobel, J.D. (2016). *Current Treatment of Vaginal Candidiasis and Bacterial Vaginosis: Critical Review and Analysis. Clinical Microbiology Reviews*, 29(2), 498-520. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-15>
22. Buford, TW (2017). "(Dis) Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease." *Microbiome* 5: 80.
23. Cai, H., Rodríguez-Díaz, J., Martín, M. C., & Fernández-García, E. (2019). *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain with immunomodulatory properties, protects mice against induced colitis. *Nutrients*, 11(4), 820.
24. Castellani, A., Low, G. C., Nabarro, D., & Ross, R. (1927). *de Kruif's Microbe Hunters. Science*, 65(1683), 325-325.
25. Cebeci, A. and Gürakan C. (2003). "Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains". *Food Microbiology* 20(5): 511-518.
26. Chacon, E., Acosta, D., & Lemasters, J. J. (1997). Primary cultures of cardiac myocytes as in vitro models for pharmacological and toxicological assessments. *In vitro methods in pharmaceutical research*, 209-223.
27. Chanda W., Joseph T.P., Wang W., Padhiar A.A. and Zhong M. (2017). "The potential management of oral candidiasis using anti-biofilm therapies". *Hypotheses* 106: 15-18.
28. Collado, M.C.; Meriluoto, J.; Salminen, S. Adhesion and aggregation proprieties of probiotic and pathogen strain. *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 226, 1065–1073

29. Corsetti, A., Settanni, L., Valmori, S., & Suzzi, G. (2008). Effectt of environmental and nutritional factors on the production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Enterococcus faecium* strains. *Ital J Food Sci*, 20, 493-504..
30. Coudeyras, S., Jugie, G., Vermerie, M., & Forestier, C. (2008). Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2008.
31. Cozzolino, A., Vergalito, F., Tremonte, P., Iorizzo, M., Lombardi, S. J., Sorrentino, E., ... & Succi, M. (2020). Preliminary evaluation of the safety and probiotic potential of *Akkermansia muciniphila* DSM 22959 in comparison with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microorganisms*, 8(2), 189.
32. Damaceno, Q.S.; Souza, J.P.; Nicoli, J.R.; Paula, R.L.; Assis, G.B.; Figueiredo, H.C.; Azevedo, V.; Martins, F.S. Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2017, 9, 371–379.
33. Daniali, M., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2020). Antibiotic resistance propagation through probiotics. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 16(12), 1207-1215.
34. De Oliveira G.L.V., Leite A.Z., Higuchi B.S., Gonzaga M.I. and Mariano V.S. (2017). “Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases”. *Immunology*. 152(1): 1-12.
35. De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M. and De Vos W.M. (2006). “*Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential prebiotico properties in the human intestinal tract”. *International Dairy Journal* 16: 1018–1028.
36. DeLong, K., Zulfiqar, F., Hoffmann, D. E., Tarzian, A. J., & Ensign, L. M. (2019). Vaginal microbiota transplantation: the next frontier. *Journal of Law, Medicine & Ethics*, 47(4), 555-567..
37. Dimitriu, P.A.; Iker, B.; Malik, K.; Leung, H.; Mohn, W.; Hillebrand, G.G. New insights into the intrinsic and extrinsic factors that shape the human skin microbiome. *MBio* 2019, 10, e00839-19.
38. Diop, K., Diop, C.M., Haddad, N., Begum, S., Cisse, M., Whaley, S., Diouf, M.L., Wynn, A., Diallo, B., Diouf, K., Drame, F.M., Gueye, D., Faye-Kettela, R., Gueye, M., Diop-Ndiaye, H., Mboup, S., Malhotra, U., Vermund, S.H. (2021). Vaginal microbiota in Senegalese women with and without bacterial vaginosis: A community-based cross-sectional study. *PLoS ONE*, 16(2), e0246547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246547>
39. Donders, G.G.G., Bellen, G., Rezeberga, D. (2021). Interactions between vaginal microbiota, genital tract inflammation and human papillomavirus infection in women. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(1), 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.08.011>
40. Duranti S., Ferrario C., Ventura M. and Turroni F. (2017). “Obesity and microbiota: an example of an intricate relationship”. *Genes and Nutrition*. 15: 12:18.
41. EFSA Guidance on the assessment of bacterial antimicrobial susceptibility. *EFSA J*. 2012;10:2740.
42. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., ... & Wright, M. (2018). Scientific opinion on the safety of monacolins in red yeast rice. *EFSA Journal*, 16(8), e05368.
43. Ekmekci, H., Aslim, B., & Ozturk, S. (2009). Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiology and immunology*, 53(2), 59-65.].

44. Enck P., Zimmermann K., Rusch K., Schwartz A., Klosterhalfen S. and Frick J. S. (2009). "The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults". *Zeitschrift für Gastroenterologie* 47(07): 653-658.
45. Fallani M., Amarri S., Uusijarvi A., Adam R., Khanna S., Aguilera M., Gil A., Vieites J.M., Norin E., Young D., Scott J.A., Dorè J. and Edwards C.A. (2011). "Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres". *Microbiology* 157(5): 1385-1392.
46. Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2013). *The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacological research*, 69(1), 1-10.
47. Fong, W., Li, Q., & Yu, J. (2020). *Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. Oncogene*, 1-19.
48. Foschi, C., Salvo, M., Cevenini, R., Parolin, C., Vitali, B., & Marangoni, A. (2017). *Vaginal lactobacilli reduce Neisseria gonorrhoeae viability through multiple strategies: an in vitro study. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 502.
49. Gibson G.R. (1999). "Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin". *The journal of nutrition* 129(7): 1438S-41S
50. Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scott K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D., Verbeke K. and Reid G. (2017). "Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics". *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 14(8): 491-502.
51. Gilliland S.E., Nelson C.R., Maxwell C. (1985). "Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*". *Applied and Environmental Microbiology* 49(2): 377-81.
52. Gonzalez, E., Brereton, N. J., Li, C., Lopez Leyva, L., Solomons, N. W., Agellon, L. B., ... & Koski, K. G. (2021). *Distinct changes occur in the human breast milk microbiome between early and established lactation in breastfeeding Guatemalan mothers. Frontiers in Microbiology*, 12, 557180.
53. Grady, N. G., Petrof, E. O., & Claud, E. C. (2016, December). *Microbial therapeutic interventions. In Seminars in Fetal and Neonatal Medicine (Vol. 21, No. 6, pp. 418-423). WB Saunders.*
54. Guarner F., Khan A.G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J., Lemair T., Kaufmann P., De Paula J.A., Fedorak R., Shanahan F., Sanders M.E., Szajewska H., Ramakrishna B.S., Karakan T., Kim N. and Fedorak R. (2011). "World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics" *Journal of clinical gastroenterology* 46(6):468-481.
55. Han, Y., Liu, Z., & Chen, T. (2021). *Role of vaginal microbiota dysbiosis in gynecological diseases and the potential interventions. Frontiers in microbiology*, 12, 643422.
56. He, Y., Niu, X., Wang, B., Na, R., Xiao, B., & Yang, H. (2020). *Evaluation of the inhibitory effects of Lactobacillus gasseri and Lactobacillus crispatus on the adhesion of seven common lower genital tract infection-causing pathogens to vaginal epithelial cells. Frontiers in medicine*, 7, 284.

57. Hedberg, Maria, et al. "Sugar fermentation in probiotic bacteria—an in vitro study." *Oral microbiology and immunology* 23.6 (2008): 482-485.
58. Heeney D.D. and Gareau M.G. (2017). "Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride?". *Current Opinion in Biotechnology*. 49: 140-147.
59. Heikkilä, M.P.; Saris, P. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 471–478.
60. Henderson B. and Wilson M. (1996). "Homo bacteriens and a network of surprise". *Journal of medical microbiology* 45(6): 393-394.
61. Hermansson, H.; Kumar, H.; Collado, M.C.; Salminen, S.; Isolauri, E.; Rautava, S. Breast milk microbiota is shaped by mode of delivery and intrapartum antibiotic exposure. *Front. Nutr.* 2019, 6, 4.
62. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J, Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C. and Sanders M.E. (2014). "Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic". *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 11(8): 506-514.
63. Ho, Nhan T., et al. "Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations." *Nature communications* 9.1 (2018): 4169.
64. Hockett, K. L., & Baltrus, D. A. (2017). Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (119).
65. Hotel, A. C. P., & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-10..
66. Isolauri, E., & Salminen, S. (2021). The intestinal microbiota: a predisposing factor for allergies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(2), 179-185.
67. Jackson, M. S., Bird, A. R., & McOrist, A. L. (2002). Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 51(3), 313-321.
68. Jallouk, A. P., Moley, K. H., Omurtag, K., Hu, G., Lanza, G. M., Wickline, S. A., & Hood, J. L. (2014). Nanoparticle incorporation of melittin reduces sperm and vaginal epithelium cytotoxicity. *PLoS One*, 9(4), e95411.
69. Jara, S.; Sánchez, M.; Vera, R.; Cofré, J.; Castro, E. The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. *Anaerobe* 2011, 17, 474–477.
70. Javed, S., Munir, A., Javed, G. A., Latif, Z., Javed, S., & Arshad, N. (2023). Genetic diversity, cholesterol reduction, and presence of conserved bile salt hydrolase gene in probiotic strains from human milk. *Letters in Applied Microbiology*, 76(3), ovad024.
71. Jia W., Li H., Zhao L. and Nicholson J.K. (2008). "Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting". *Nature Reviews Drug Discovery* 7(2): 123-9.

72. Khodayar-Pardo, P.; Mira-Pascual, L.; Collado, M.C.; Martínez-Costa, C. *Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota*. *J. Perinatol.* 2014, 34, 599–605
73. Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., ... & Siezen, R. J. (2003). *Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1990-1995.
74. Kobyliak N., Virchenko O. and Falayeyeva T. (2016). "Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity". *Nutrition Journal* 15: 43.
75. Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., ... & Ley, R. E. (2011). *Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4578-4585.
76. Langdon A., Crook N. and Dantas G. (2016). "The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation". *Genome* 8(1): 39.
77. Laursen, M. F., Pekmez, C. T., Larsson, M. W., Lind, M. V., Yonemitsu, C., Larnkjær, A., ... & Bahl, M. I. (2021). *Maternal milk microbiota and oligosaccharides contribute to the infant gut microbiota assembly*. *ISME Communications*, 1(1), 1-13.
78. Lee Y.K. and Mazmanian S.K. (2007). "Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?". *Science* 330: 1768-73.
79. Lee, H. Y., Park, J. H., Seok, S. H., Baek, M. W., & Kim, D. J. (2016). *Lactobacillus fermentum Strain JDFM216 Stimulates the Immunosenescence-Related Gene Expression Profile in Immune Cells*. *Journal of Medicinal Food*, 19(5), 454-462.
80. Leuschner, R. G., & Lücke, F. K. (1999). *Behavior of Lactobacillus fermentum during the production and ripening of cheese*. *International Journal of Food Microbiology*, 46(1), 35-45.
81. Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2017). *Dysbiosis and the immune system*. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 219-232.
82. Li, S.-W.; Watanabe, K.; Hsu, C.-C.; Chao, S.-H.; Yang, Z.-H.; Lin, Y.-J.; Chen, C.-C.; Cao, Y.-M.; Huang, H.-C.; Chang, C.-H. *Bacterial composition and diversity in breast milk samples from mothers living in Taiwan and mainland China*. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 965.
83. Liu, G. X., Kong, J., Lu, W. W., Kong, W. T., Tian, H., Tian, X. Y., & Huo, G. C. (2011). *β -Galactosidase with transgalactosylation activity from Lactobacillus fermentum K4*. *Journal of dairy science*, 94(12), 5811-5820.
84. López-García, J., et al., *HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation*. *Journal of functional biomaterials*, 2014. 5(2): p. 43-57.
85. Łubiech, K., & Twarużek, M. (2020). *Lactobacillus bacteria in breast milk*. *Nutrients*, 12(12), 3783.
86. Magnifico, I., Perna, A., Cutuli, M. A., Medoro, A., Pietrangelo, L., Guarneri, A., ... & Di Marco, R. (2023). *A Wall Fragment of Cutibacterium acnes Preserves Junctional Integrity Altered by Staphylococcus aureus in an Ex Vivo Porcine Skin Model*. *Pharmaceutics*, 15(4), 1224.

87. Mantis N. J., Rol N. and Corthésy B. (2011). "Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut". *Mucosal Immunology* 4(6): 603–611.
88. Marco, M. L., Pavan, S., & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 204-210.
89. Marcone, V., Rocca, G., Lichtner, M., Calzolari, E., & Armanini, D. (2016). *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, and *Lactobacillus jensenii* vaginal strains: coculture characterization and preliminary probiotic application. *International journal of microbiology*, 2016.
90. Margulis, L. (1996). "Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life." *Proceedings of the national academy of sciences* 93(3): 1071-1076.
91. Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
92. Marrazzo, J.M., Hillier, S.L. (2013). Bacterial Vaginosis. *The New England Journal of Medicine*, 368(22), 2146-2155. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1210049>
93. Mayo, B., Rachid, C. T. C. C., Alegria, A., Leite, A. M. O., Peixoto, R. S., Delgado, S., & Fernández, M. (2010). Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Current Genomics*, 11(6), 418-429.
94. McCarville, Justin L., Alberto Caminero, and Elena F. Verdu. "Novel perspectives on therapeutic modulation of the gut microbiota." *Therapeutic advances in gastroenterology* 9.4 (2016): 580-593.
95. McGuire, Michelle K., and Mark A. McGuire. "Got bacteria? The astounding, yet not-so-surprising, microbiome of human milk." *Current opinion in biotechnology* 44 (2017): 63-68.
96. Mei, Z., & Li, D. (2022). The role of probiotics in vaginal health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1074.
97. Metchnikoff E. (1907). "Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction". In: *The prolongation of life optimist studies*". Heinemann W (Ed.) London, UK 161-183.
98. Ministero della Salute, 2013 "Revisione Linee Guida sui Probiotici e Probiotici".
99. Mohammadi, A. A., Jazayeri, S., Khosravi-Darani, K., Solati, Z., Mohammadpour, N., & Asemi, Z. (2018). The effects of probiotics on mental health and hypothalamic-pituitary-adrenal axis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers. *Nutritional neuroscience*, 21(9), 676-684.
100. Mohammedsaeed W, Cruickshank S, McBain AJ, O'Neill CA. *Lactobacillus rhamnosus* GG lysate increases re-epithelialization of keratinocyte scratch assays by promoting migration. *Sci Rep*. 2015;5:16147.
101. Molin, G., Jeppsson, B., Johansson, M. L., Ahrné, S., Nobaek, S., Ståhl, M., & Bengmark, S. (1993). Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3), 314-323.
102. Molina-Tijeras, J.A.; Díez-Echave, P.; Vezza, T.; Hidalgo-García, L.; Ruiz-Malagón, A.J.; Rodríguez-Sojo, M.J.; Romero, M.; Robles-Vera, I.; García, F.; Plaza-Díaz, J.; et al. *Lactobacillus*

- fermentum* CECT5716 ameliorates high fat diet-induced obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis. *Pharm. Res.* 2021, 167, 105471.
103. Moloney R.D., Johnson A.C., O'Maoney S.M., Dinan T.G., Greenwood Van Meerveled B. and Cryan J.F. (2016). "Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome". *CNS Neuroscience and Therapeutics* 22(2): 102-17.
104. Moossavi, S., & Azad, M. B. (2020). Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut Microbes*, 12(1), 1667722.
105. Moossavi, S., Sepehri, S., Robertson, B., Bode, L., Goruk, S., Field, C. J., ... & Turvey, S. E. (2019). Composition and variation of the human milk microbiota are influenced by maternal and early-life factors. *Cell host & microbe*, 25(2), 324-335.
106. Motevaseli E., Dianatpour A. and Ghafouri-Fard S. (2017). "The Role of Probiotics in Cancer Treatment: Emphasis on their In vivo and In vitro Anti-metastatic Effects". *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 6(2): 66-76.
107. Mu, Q., Tavella, V. J., Luo, X. M., & Bian, X. M. (2018). The role of *Lactobacillus* and its immunomodulatory properties in the intestinal tract. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(11), 895-910.
108. Olivares, M.; Díaz-Ropero, M.; Martín, R.; Rodríguez, J.; Xaus, J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 101, 72–79.
109. Ooi L.G. and Liong M.T. (2010). "Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings". *International journal of molecular sciences* 11(6): 2499-2522.
110. Ortiz, L., Ruiz, F., Pascual, L., & Barberis, L. (2014). Effect of two probiotic strains of *Lactobacillus* on in vitro adherence of *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus aureus* to vaginal epithelial cells. *Current microbiology*, 68, 679-684.
111. Ouwehand A.C. (2007). "Antiallergic effects of probiotics." *J Nutr.* 137(2): 794S-7S.
112. Palmer C., Bik E.M., Digiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O. (2007). "Development of the human infant intestinal microbiota". *PLoS Biology* 5(7): e177.
113. Pannaraj, P.S.; Li, F.; Cerini, C.; Bender, J.M.; Yang, S.; Rollie, A.; Adisetiyo, H.; Zabih, S.; Lincez, P.J.; Bittinger, K.; et al. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr.* 2017, 171, 647–654.
114. Pastor-Villaescusa, B.; Blanco-Rojo, R.; Olivares, M. Evaluation of the Effect of *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716 on Gastrointestinal Infections in Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms* 2021, 9, 1412.
115. Pérez-Sánchez, T., Borrero, J., Jiménez, J. J., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Gueimonde, M. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 64, 259-266.
116. Petrova, M. I., Lievens, E., Malik, S., Imholz, N., Lebeer, S., & Vanderleyden, J. (2015). *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Frontiers in physiology*, 6, 81.

117. Pino A, Bartolo E, Caggia C et al. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. *Sci Rep* 2019;9:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40304-3>.
118. Podolsky, D. K. (1999). V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(3), G495-G499.
119. Qian, Z., Zhu, H., Zhao, D., Yang, P., Gao, F., Lu, C., ... & Chen, D. (2021). Probiotic *Lactobacillus* sp. strains inhibit growth, adhesion, biofilm formation, and gene expression of bacterial vaginosis-inducing *Gardnerella vaginalis*. *Microorganisms*, 9(4), 728.
120. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C. and Mende D.R. (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing". *Nature* 464: 59–65.
121. Rajoka, Muhammad Shahid Riaz, et al. "Characterization, the antioxidant and antimicrobial activity of exopolysaccharide isolated from poultry origin *Lactobacilli*." *Probiotics and antimicrobial proteins* 11 (2019): 1132-1142.
122. Rajoka, Muhammad Shahid Riaz, et al. "Techno-functional properties and immunomodulatory potential of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* MM89 isolated from human breast milk." *Food Chemistry* 377 (2022): 131954.
123. Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., ... & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4680-4687.
124. Robles-Vera, I.; Toral, M.; de la Visitación, N.; Sánchez, M.; Romero, M.; Olivares, M.; Jiménez, R.; Duarte, J. The Probiotic *Lactobacillus fermentum* Prevents Dysbiosis and Vascular Oxidative Stress in Rats with Hypertension Induced by Chronic Nitric Oxide Blockade. *Mol. Nutr. Food Res.* 2018, 62, e1800298.
125. Rodríguez, J.M. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv. Nutr.* 2014, 5, 779–784.
126. Rodríguez-Nogales, A.; Algieri, F.; Garrido-Mesa, J.; Vezza, T.; Utrilla, M.P.; Chueca, N.; Garcia, F.; Olivares, M.; RodríguezCabezas, M.E.; Galvez, J. Differential intestinal anti-inflammatory effects of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus salivarius* in DSS mouse colitis: Impact on microRNAs expression and microbiota composition. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017, 61, 144.
127. Rodríguez-Nogales, A.; Algieri, F.; Vezza, T.; Garrido-Mesa, N.; Olivares, M.; Comalada, M.; Riccardi, C.; Utrilla, M.P.; RodríguezCabezas, M.E.; Galvez, J. The viability of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 is not essential to exert intestinal anti-inflammatory properties. *Food Funct.* 2015, 6, 1176–1184.
128. Rodríguez-Sojo, M. J., Ruiz-Malagón, A. J., Rodríguez-Cabezas, M. E., Gálvez, J., & Rodríguez-Nogales, A. (2021). *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716: mechanisms and therapeutic insights. *Nutrients*, 13(3), 1016.
129. Rohani, M. G., & Parks, W. C. (2015). Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix biology*, 44, 113-121.

130. Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M. Margolles A. (2017). "Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease". *Molecular Nutrition and Food Research* 61(1).
131. Sanders, M. E. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement_2), S58-S61.
132. Sandhya P. Danda D., Sharma D., Scaria V. (2015). "Does the buck stop with the bugs? an overview of microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis". *International Journal of Rheumatic Diseases*. 19(1): 8-20.
133. Santarmaki, V.; Kourkoutas, Y.; Zoumpopoulou, G.; Mavrogonatou, E.; Kiortzidis, M.; Chorianopoulos, N.; Tassou, C.; Tsakalidou, E.; Simopoulos, C.; Ypsilantis, P. Survival, Intestinal Mucosa Adhesion, and Immunomodulatory Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains. *Curr. Microb.* 2017, 74, 1061–1067.
134. Satyanarayana, T.; Johri, B.N.; Das, S.K. (Eds.) *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments*; Springer: Singapore, 2019.
135. Schillinger U., Guigas C. and Holzapfel W. H. (2005). "In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products". *International Dairy Journal*. 15(12): 1289-1297.
136. Schnorr S. L., Candela M., Rampelli S., Centanni M., Consolandi C., Basaglia G. and Fiori J. (2014). "Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers". *Nature communications* 5.
137. Sender R., Fuchs S. and Milo R. (2016). "Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans". *Cell* 164(3): 337-340.
138. Sender R., Fuchs S. and Milo R. (2016). "Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body." *PLoS biology* 14(8): e1002533.
139. Shaaban S.Y., El Gendy Y.G., Mehanna N.S., El-Senousy W.M., El-Feki H.S.A., Saad K. and El-Asheer O.M. (2017). "The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study". *Nutritional Neuroscience*. 7: 1-6.
140. Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed research international*, 2014..
141. Sobel, J.D. (2016). Vulvovaginal Candidosis. *Lancet*, 387(10023), 1999-2012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00257-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00257-4)
142. Song, Y. L., Kato, N., Liu, C. X., Matsumiya, Y., Kato, H., & Watanabe, K. (2000). Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S–23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS microbiology letters*, 187(2), 167-173.
143. Soto, A.; Martín, V.; Jiménez, E.; Mader, I.; Rodríguez, J.M.; Fernández, L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: Influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014, 59, 78

144. Staudacher H. (2015). "Probiotics for lactose intolerance and irritable bowel syndrome". *British journal of community nursing* S12-S14.
145. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Dakic, I.; Savic, B.; Svabic-Vlahovic, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 2000, 40, 175–179
146. Takada, K., Komine-Aizawa, S., Kuramochi, T., Ito, S., Trinh, Q. D., Pham, N. T. K., ... & Hayakawa, S. (2018). *Lactobacillus crispatus* accelerates re-epithelialization in vaginal epithelial cell line MS 74. *American Journal of Reproductive Immunology*, 80(3), e13027.
147. Tavella, V. J., Luo, X. M., & Bian, X. M. (2018). The role of *Lactobacillus* and its immunomodulatory properties in the intestinal tract. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(11), 895-910.
148. Togo, A. H., Grine, G., Khelaifia, S., Des Robert, C., Brevaut, V., Caputo, A., ... & Raoult, D. (2019). Culture of methanogenic archaea from human colostrum and milk. *Scientific Reports*, 9(1), 18653.
149. Touré, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., & Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1058-1069.
150. Triantaphillidou, S., R.E.J.J.o.I.S. Jacobson, and Technology, Measurements of the modulation transfer function of image displays. *Journal of Imaging Science and Technology*, 2004.48(1):p.58-65.
151. Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1999). Chemical characterisation and activity of the cell-bound exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG compared with those of *L. casei* 2115 and *L. acidophilus* GG. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 557-564.
152. Ursell L.K., Clemente J.C., Rideout J.R., Gevers D., Caporaso J.G. and Knight R. (2012). "The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites". *The journal of allergy and clinical immunology* 129(5): 1204-1208.
153. Venditti, N., Vergalito, F., Magnifico, I., Cutuli, M. A., Pietrangelo, L., Cozzolino, A., ... & Di Marco, R. (2021). The *Lepidoptera Galleria mellonella* "in vivo" model: A preliminary pilot study on oral administration of *Lactobacillus plantarum* (now *Lactiplantibacillus plantarum*). *New Microbiol*, 44, 42-50. .
154. Vergin F. (1954). "Anti- und Probiotika". *Hippokrates* 25:116–119.
155. Vitali, B., Cruciani, F., Baldassarre, M. E., Capursi, T., Spisni, E., Valerii, M. C., ... & Brigidi, P. (2016). Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC microbiology*, 16(1), 233.
156. Vlainić J.V., Šuran J., Vlainić T., Vukorep A.L. (2016). "Probiotics as an Adjuvant Therapy in Major Depressive Disorder". *Current Neuropharmacology*. 14(8): 952-958.
157. Walker WA. (2017) "The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child, and adult health". *Pediatric Research*. 82(3): 387-395.
158. Wang, C., Cao, A., Yang, C., & Yang, W. (2021). *Lactobacillus fermentum* ameliorates lead-induced oxidative stress in the liver and brain of rats. *Microbial Pathogenesis*, 154, 104807

159. Winglee K., Howard A.G., Sha W., Gharaibeh R.Z., Liu J., Jin D., Fodor A.A., Gordon-Larsen P. (2017). "Recent urbanization in China is correlated with a Westernized microbiome encoding increased virulence and antibiotic resistance genes". *Microbiome* 5(1): 121.
160. Wu C, Dai C, Tong L, Lv H, Zhou X. Evaluation of the Probiotic Potential of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *indicus* WDS-7 Isolated from Chinese Traditional Fermented Buffalo Milk In vitro. *Pol J Microbiol.* 2022
161. Yano J.M., Yu K., Donaldson G.P., Shastri G.G., Ann P., Ma L., Nagler C.R., Ismagilov R.F., Mazmanian S.K. and Hsiao E.Y. (2015). "Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis". *Cell Press Journal* 161(2): 264-76.
162. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. (2012) "Human gut microbiome viewed across age and geography". *Nature* 486(7402): 222-227.
163. Yu, X., Zhang, Y., Pei, K., Tan, J., Tian, H., Xu, T., ... & Huang, X. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum* attenuates Coxsackievirus B3-induced pancreatitis through the BAX/BCL2/CASP3 signaling pathway. *Food & Function.*
164. Zangl, I., Beyer, R., Gattesco, A., Labuda, R., Pap, I. J., Strauss, J., & Schüller, C. (2023). *Limosilactobacillus fermentum* Limits *Candida glabrata* Growth by Ergosterol Depletion. *Microbiology Spectrum*, e03326-22.
165. Zevin, A. S., Xie, I. Y., Birse, K., Arnold, K., Romas, L., Westmacott, G., ... & Burgener, A. D. (2016). Microbiome composition and function drives wound-healing impairment in the female genital tract. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005889.
166. Zhang, W., Azevedo, M. P., Wen, K., & Li, G. (2021). Fermented Foods and Beverages Containing Lactic Acid Bacteria: A Pathway for the Improvement of the Gut Environment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 486-502.
167. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.