



PharmExtracta®

Newsletter GINECOLOGIA & OSTETRICIA n. 2 - Aprile 2020

Gent.ma Dottoressa, Egr. Dottore,

proseguendo nel nostro lavoro di seria e innovativa informazione scientifica, abbiamo pensato di proporle **tre interessanti video** del **Dott. Francesco Di Piero** che esplicano le ultime acquisizioni e correlazioni inerenti al microbiota vaginale delle donne in ogni fase della vita.

- Microbiota al femminile – Parte 1 Struttura e dinamica dei microbioti
- Microbiota al femminile – Parte 2 Classificazione e caratteristiche del microbiota vaginale
- Microbiota al femminile – Parte 3 Peculiarità di *Lactobacillus crispatus* M247 (**CRISPACT**)

Sperando di aver fatto una cosa gradita ed in attesa che l'informatore scientifico possa tornare ad incontrarla, le auguriamo cordiali saluti.



Microbiota al femminile: correlazioni tra il tipo di microbiota vaginale e il corrispondente stato di salute o malattia

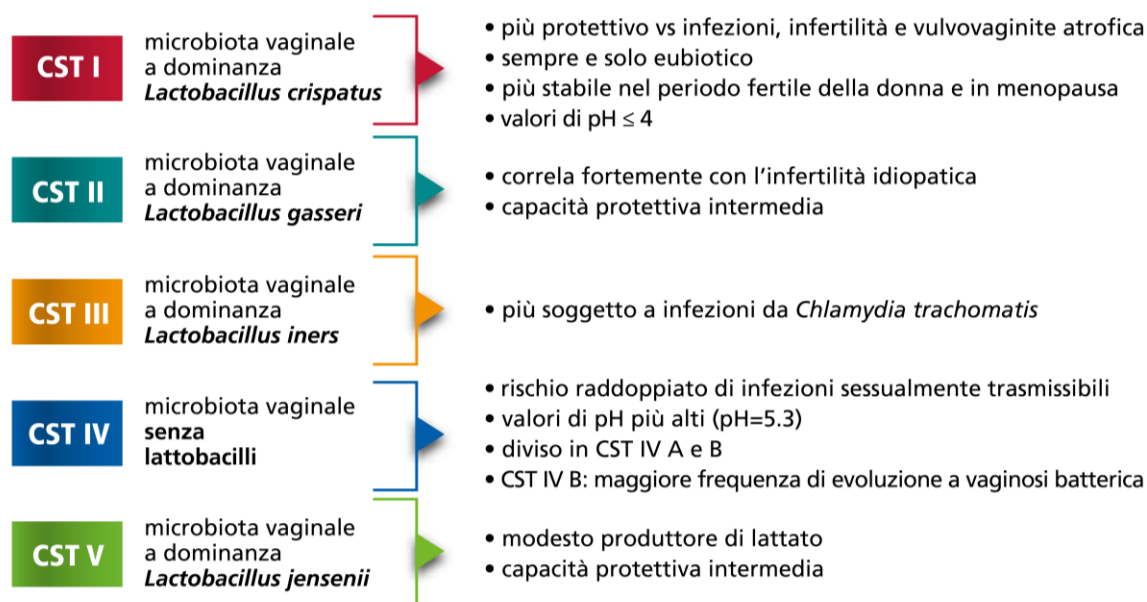


Qualunque siano, la **dominanza dei lattobacilli nell'ambiente vaginale determina valori più bassi di pH e di Nugent score** e la loro ormai accertata funzione protettiva^{1,2} si deve alla capacità di:

- sintetizzare perossido di idrogeno H₂O₂
- acidificare l'ambiente vaginale metabolizzando il glicogeno e producendo acido lattico
- contrastare microrganismi patogeni occupando le loro sedi di adesione attraverso la formazione di un biofilm, sulle pareti vaginali, che gli toglie spazio e nutrimento.

Attualmente è consolidato il ruolo protettivo di *Lactobacillus crispatus*, il lattobacillo capace di rendere privilegiato, per stabilità e aspetti di benessere, il microbiota vaginale durante tutta la vita della donna, dalla pubertà alla menopausa¹.

Il microbiota vaginale a dominanza *Lactobacillus crispatus* risulta essere quello con la maggior possibilità di ridurre i rischi di infezione, parto pretermine, infertilità idiopatica e atrofia vaginale.



COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA E RISCHIO INFETTIVO

Le pubblicazioni dimostrano chiaramente che il microbiota vaginale in cui domina la specie *Lactobacillus crispatus* limita l'infettività delle principali forme microbiche batteriche, fungine, protozoarie e virali.

Infezioni da *Chlamydia trachomatis*: *L. crispatus* è il lattobacillo che sperimentalmente dimostra la maggiore azione antagonista diretta vs *Chlamydia*³.

Infezioni da *Gardnerella vaginalis*: *L. crispatus* è l'unico lattobacillo, tra i dominanti *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, a potersi opporre alla naturale aggressività di *Gardnerella*,

sequestrando il ferro necessario alla proliferazione del patogeno durante il periodo mestruale, competendo con specifiche proteine ai siti di adesione sull'epitelio e perché interferisce direttamente con la vaginolisina limitandone gli effetti biologici⁴.

Vaginosi batterica da Mycoplasma, Atopobium, Megasphaera, Sneathia e Prevotella etc.: tale comunità batterica è tanto più presente quanto più Lactobacillus crispatus è assente⁵.
Infezioni da Candida: L. crispatus è il lattobacillo con la maggiore azione antagonista diretta vs Candida albicans perché interferisce meccanicamente con il processo di penetrazione delle ife nelle cellule epiteliali vaginali⁶.

Infezioni da Trichomonas vaginalis: L. crispatus correla con una azione antagonista diretta⁷.

Infezioni da HPV persistente. La frequenza di negatività per HPV correla fortemente con il microbiota vaginale in cui domina la specie Lactobacillus crispatus⁸.

COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA ED INFERTILITÀ

È stato dimostrato che l'assenza di aspetti di disbiosi vaginale correla con una fertilità migliore: l'infertilità idiopatica si associa infatti con una minor produzione e rilascio di lattato e ad un microbiota senza lattobacilli o a dominanza L. gasseri⁹.

In caso di procreazione assistita, L. crispatus ha dimostrato di aumentare in maniera significativa la riuscita dell'impianto ed il numero di bambini nati, con un'importante riduzione del rischio infettivo. I dati si riferiscono ad una procedura nella quale si contamina l'armamentario impiegato nella procedura d'impianto intra-uterino con Lactobacillus crispatus¹⁰.

COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA E MENOPAUSA

È ormai accertato che il più frequente microbiota vaginale della donna in peri- e post-menopausa è caratterizzato dall'assenza di L. crispatus, così come anche l'atrofia tissutale è stata correlata con l'assenza di Lactobacillus crispatus¹¹.

Vulvovaginite atrofica in menopausa: il più frequente microbiota vaginale è caratterizzato dall'assenza di L. crispatus mentre il rischio di sviluppare vulvo-vaginite atrofica si riduce di 25 volte nelle donne con microbiota a dominanza Lactobacillus crispatus¹¹.

Poiché la somministrazione di estrogeni aumenta il consorzio lattobacillare vaginale solo se è presente qualche lattobacillo, se il microbiota ne è totalmente privo la terapia ormonale sostitutiva in menopausa avrà uno scarso o ridotto successo nel contrastare i segni e sintomi della condizione. Nelle donne con almeno parziale contenuto lattobacillare le chance di successo della TOS sono 3 volte maggiori di quelle calcolate in donne con lattobacilli assenti¹².

SELEZIONE E DEPOSITO DEI CEPPI DI Lactobacillus crispatus

I ceppi probiotici di L. crispatus con genomi depositati nelle varie ceppoteche del mondo, documentati in letteratura, in chiave microbiologica e ginecologica, utili per essere impiegati per la costruzione di un microbiota vaginale a dominanza L. crispatus sono solo 4: il ceppo L1 il ceppo ST12, il ceppo CTV-053 ed il ceppo M247^{13,14,15}.

Il ceppo probiotico L. crispatus M247, che rispetto agli altri presenta un numero maggiore di lavori pubblicati⁸ e peculiari capacità, è un ceppo selezionato nel 1989 da un gruppo di ricercatori piacentini all'interno di un programma di ricerca finalizzato all'isolamento di nuove specie batteriche ottenute da feci di neonato.

M247, che appartiene alla lista dei batteri QPS^{13,14} ha dimostrato di non presentare alcun gene codificante fattori di virulenza, resistenza agli antibiotici, elementi trasponibili ed è dotato di un solo cromosoma circolare, non presentando quindi plasmidi extra-cromosomiali.

In base alle sue comprovate caratteristiche, genotipiche, fenotipiche e probiotiche, il ceppo venne depositato nella ceppoteca di Ghent in Belgio nell'aprile del 2007 (codice IDA: LMG P-23257).

Il *Lactobacillus crispatus* M247 è disponibile con il nome commerciale di CRISPACT, 20 mld/UFC, stick orosolubili senza glutine e senza lattosio.

CRISPACT: COLONIZZAZIONE E PERSISTENZA

L'intero sequenziamento di *Lactobacillus crispatus* M247 ha evidenziato un pool di geni peculiari⁹ che spiegano le grandi capacità del ceppo.

Il ceppo M247, che ha come habitat privilegiato il tessuto vaginale, si auto-aggrega efficacemente risultando così altamente aderente, sia su muco ileale che su cellule enteriche umane, e con grandi capacità colonizzanti.

Nel genoma di M247 sono stati infatti identificati 18 geni per la sintesi di polimeri di esopolisaccaride (EPS) che migliorano le proprietà adesive ai substrati ed aumentano la capacità di difendersi dagli antagonismi che si generano con l'ospite, con altri commensali e con i patogeni.



Il risultato finale sarà la costituzione di un vero e proprio biofilm che esercita un effetto barriera impedendo l'adesione ad altri microrganismi.

Inoltre il genoma contiene, espresso, il gene LEA (*Lactobacillus Epithelium Adesin*) che codifica per una proteina d'aggancio che ottimizza la colonizzazione dell'epitelio vaginale¹⁹. Poiché tale proteina è impiegata anche da *Gardnerella* si sviluppano fenomeni di competizione diretta²⁰.

Un recente trial pilota eseguito su volontari sani ha dimostrato che la somministrazione di 10 miliardi di UFC/dose di M247 per 14 giorni determina una colonizzazione intestinale nel 70% dei trattati ed una vaginale nel 40% confermando la traslocazione dei batteri dall'intestino alla vagina²¹.

Uno studio più recente ha ulteriormente dimostrato che i lattobacilli, somministrati per bocca, raggiungevano la vagina a partire dalla terza settimana di terapia ed entro la quinta iniziavano a manifestarsi gli effetti positivi in termini di pH e di Nugent score²².

Dopo aver colonizzato, il ceppo M247 dimostra anche elevata persistenza essendo, anche dopo interruzione della somministrazione, recuperabile vivo e vitale sia dalle feci che dalle biopsie²³.

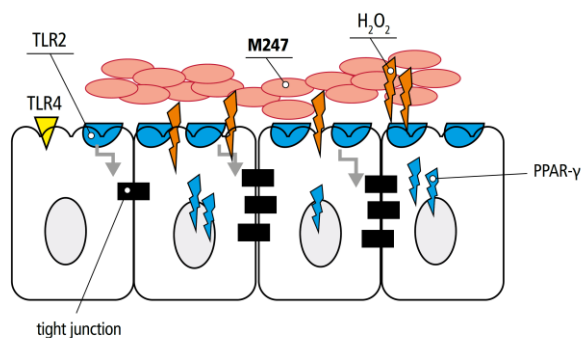
CRISPACT: CAPACITÀ DI SINTESI E RILASCIO DI PEROSSIDO DI IDROGENO

Le specie *L. jensenii*, *L. crispatus* e *L. gasseri* producono perossido di idrogeno in sede intestinale ed il *L. crispatus* M247 dimostra una capacità superiore a quella di qualunque altro^{2,21}.

Il perossido di idrogeno è un metabolita rilasciato per innescare fenomeni antinfiammatori: le cellule dell'epitelio intestinale dell'ospite attivano PPAR- gamma²⁴ che induce una serie di eventi che portano alla riduzione dell'espressione di TLR4 e all'aumento dell'espressione di TLR2²⁵.

TLR4 media l'interazione con l'LPS dei batteri Gram negativi a cui segue il rilascio di sostanze infiammatorie come il TNF-alfa.

TLR2 media invece la neo-sintesi delle proteine delle giunzioni serrate.



La conseguenza finale di un'attivazione di PPAR-gamma da parte del perossido di idrogeno è quindi una risposta antinfiammatoria dovuta alla minor presenza di TNF-alfa e ad un irrobustimento delle giunzioni serrate.

CRISPACT: CAPACITÀ DI SINTESI E RILASCIO DI ACIDO LATTICO

Ad oggi gran parte del ruolo protettivo dei lattobacilli si ritiene possa essere legato principalmente alla produzione e rilascio di acido lattico. È infatti ormai acquisito che i lattobacilli, grazie alla produzione di lattato, metabolicamente ottenuto dalla demolizione del glicogeno presente nella mucosa dell'ospite grazie alla sua spinta estrogenica, bonificano l'ambiente vaginale mantenendo il pH a circa 4, valore ostile alla crescita di altri microrganismi potenzialmente patogeni.

Poiché i lattobacilli non sono dotati di pool enzimatici capaci di degradare il glicogeno, tale opera di demolizione viene operata dalle amilasi presenti nel tessuto vaginale e prodotte dall'ospite.

Solamente il frutto di tale catabolismo è quindi oggetto di ulteriore degradazione enzimatica lattobacillare: solo la forma deprotonata del lattato può essere protonata a basso pH e solo la forma protonata risulta protettiva da infezioni batteriche e virali ^{1,2}.

Il microbiota vaginale a dominanza *Lactobacillus crispatus* è il maggior produttore di lattato, quindi il ceppo M247 è il lattobacillo con la maggiore capacità di ridurre il rischio infettivo e l'infertilità sine causa.

CRISPACT: POSSIBILITÀ DI IMPIEGO CLINICO IN GINECOLOGIA

Può essere un valido aiuto nella:

1. **paziente con infezioni vaginali batteriche, fungine e protozoarie recidivanti** con il fine di ripristinare l'eubiosi vaginale e ridurre l'instabilità dell'ambiente e quindi anche il ricorso a periodiche/ripetute terapie antibiotiche e antimicotiche sistemiche o locali
2. **paziente con diagnosi di HPV persistente da oltre 6 mesi** per ripristinare l'eubiosi vaginale e ridurre l'instabilità dell'ambiente ed il rischio oncologico
3. **paziente con infertilità idiopatica, o con un tentativo di PMA fallito**, per ripristinare l'eubiosi vaginale e ridurre l'instabilità dell'ambiente aumentando la possibilità di ottenere una gravidanza e la riuscita della procedura di impianto intra-uterino
4. **paziente in menopausa con segni iniziali di vulvo-vaginite atrofica** al fine di migliorare l'atrofia tissutale, ridurre l'instabilità e l'infiammazione dell'ambiente vaginale e ripristinare l'eubiosi.

Bibliografia

1. Di Pierro «Argomenti di Terapia Batterica» II Edizione 2019 – CEC Editore 475-532
2. Martin R, Suarez JE. Biosynthesis and degradation of H2O2 by vaginal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(2):400-5
3. Tamarelle J, de Barbeyrac B, Le Hen I, Thiébaud A, Bébéar C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E. Vaginal microbiota composition and association with prevalent Chlamydia trachomatis infection: a cross-sectional study of young women attending a STI clinic in France. *Sex Transm Infect.* 2018;94(8):616-618
4. Castro J, Martins AP, Rodrigues ME, Cerca N. *Lactobacillus crispatus* represses vaginolysin expression by BV associated Gardnerella vaginalis and reduces cell cytotoxicity. *Anaerobe.* 2018;50:60-63
5. Vitali B, Cruciani F, Picone G, Parolin C, Donders G, Laghi L. Vaginal microbiome and metabolome highlight speci_c signatures of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(12):2367-76
6. Wang S, Wang Q, Yang E, Yan L, Li T, Zhuang H. Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal *Lactobacillus crispatus* Are Able to Strongly Inhibit *Candida albicans* Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-related Gene Expressions. *Front Microbiol.* 2017;8:564
7. Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, Gajer P, Ault K, Peralta L, Forney LJ, Carlton JM, Abdo Z, Ravel J. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex Transm Dis.* 2012;39(10):807-12

8. Di Paola M, Sani C, Clemente AM, Iossa A, Perissi E, Castronovo G, Tanturli M, Rivero D, Cozzolino F, Cavalieri D, Carozzi F, De Filippo C, Torcia MG. Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sci Rep.* 2017;7(1):10200
9. Campisciano G, Florian F, D'Eustacchio A, Stankovic D, Ricci G, De Seta F, Comar M. Subclinical alteration of the cervical-vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. *J Cell Physiol.* 2017 Jul;232(7):1681-1688
10. Sirota I, Zarek SM, Segars JH. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med.* 2014;32(1):35-42
11. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Fadrosch D, Chang K, Silver MI, Viscidi RP, Burke AE, Ravel J, Gravitt PE. Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause.* 2018 Nov;25(11):1321-1330
12. Mitchell CM, Srinivasan S, Plantinga A, Wu MC, Reed SD, Guthrie KA, LaCroix AZ, Fiedler T, Munch M, Liu C, Hoffman NG, Blair IA, Newton K, Freeman EW, Joffe H, Cohen L, Fredricks DN. Associations between improvement in genitourinary symptoms of menopause and changes in the vaginal ecosystem. *Menopause.* 2018;25(5):500-507
13. Schillinger U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *Int J Food Microbiol.* 1999;47(1-2):79-87
14. Patton DL, Cosgrove Sweeney YT, Antonio MA, Rabe LK, Hillier SL. *Lactobacillus crispatus* capsules: single-use safety study in the *Macaca nemestrina* model. *Sex Transm Dis.* 2003;30(7):568-70
15. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;167(2):185-9
16. Von Wright A. Regulating the safety of probiotics: the European approach. *Curr Pharm Des.* 2005;11(1):17-23
17. No Authors. *EFSA Journal* 2015; 13(6), 4138:1-84
18. Di Pierro «Argomenti di Terapia Batterica» II Edizione 2019 – CEC Editore 533-550
19. Edelman SM, Lehti TA, Kainulainen V, Antikainen J, Kylväjä R, Baumann M, Westerlund-Wikström B, Korhonen TK. Identification
20. Ojala T, Kankainen M, Castro J, Cerca N, Edelman S, Westerlund-Wikstrom B, Paulin L, Holm L, Auvinen P. Comparative
21. Di Pierro F, Bertuccioli A, Cattivelli D, Soldi S, Elli M. *Lactobacillus crispatus* M247: a possible tool to counteract CST IV. *Nutrafoods.* 2018; 17:169-172
22. Strus M, Chmielarczyk A, Kochan P, Adamski P, Chelmicki Z, Chelmicki A, Patucha A, Heczko PB. Studies on the effects of probiotic *Lactobacillus* mixture given orally on vaginal and rectal colonization and on parameters of vaginal health in women with intermediate vaginal flora. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;163(2):210-5
23. Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, Elli M, Brun P, Cavaggioni A, Tormen D, Sturniolo GC, Morelli L, Palu G. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;43(2):197-204
24. Voltan S, Martines D, Elli M, Brun P, Longo S, Porzionato A, Macchi V, D'Inca R, Scarpa M, Palu G, Sturniolo GC, Morelli L, Castagliuolo I. *Lactobacillus crispatus* M247-derived H2O2 acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-gamma in the intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1216-27
25. Voltan S, Castagliuolo I, Elli M, Longo S, Brun P, D'Inca R, Porzionato A, Macchi V, Palu G, Sturniolo GC, Morelli L, Martines D. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(9):1138-48