

MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	**102013902139770**
Data Deposito	**22/03/2013**
Data Pubblicazione	**22/09/2014**

Classifiche IPC

Titolo

CEPPO DI LACTOBACILLUS E SUO USO COME PROBIOTICO

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione dal titolo:

"Ceppo di *Lactobacillus* e suo uso come probiotico"

a nome: EUROSPITAL S.p.A.

inventori: Marina Elli, Sara Soldi, Daniela Cattivelli

SETTORE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione rientra nel campo dei batteri probiotici, in particolare si riferisce ad un ceppo di *Lactobacillus rhamnosus* CBA-L64, in grado di stimolare il sistema immunitario quando ingerito. La presente invenzione si riferisce inoltre a composizioni comprendenti tale microrganismo.

CAMPO TECNICO

La difesa dell'organismo contro patogeni esterni è svolto dal sistema immune, composto dal sistema immune innato e acquisito, e che è in grado di indurre sia una risposta sistemica che a livello mucosale.

La flora batterica intestinale svolge un ruolo di estrema rilevanza nel mantenimento della salute umana prevenendo l'infezione da parte di patogeni e contribuendo a formare e mantenere la funzione immune a livello delle mucose. Questa caratteristica si osserva sia nell'individuo adulto, sia nel bambino, durante tutto il periodo dello sviluppo. L'adesione di diversi ceppi batterici alla superficie delle cellule epiteliali della mucosa intestinale è un requisito importante per la successiva colonizzazione del tratto gastrointestinale umano (1) anche se le interazioni tra batteri ed epiteli intestinali non sono ancora del tutto note (2).

Tra i costituenti dell'epitelio intestinale, i Lattobacilli vengono spesso utilizzati come probiotici, cioè come microrganismi che, se ingeriti, possono avere effetti benefici sulla salute umana. Altri microrganismi probiotici come i Bifidi, possono svolgere attività immunomodulante nell'organismo ospite (3). Il legame tra le proteine di superficie (SLP) dei Lattobacilli con i recettori glicoproteici o glicolipidici sulla superficie degli enterociti, promuove inoltre la sintesi di diverse citochine (4, 5).

Diversi studi hanno mostrato che i microrganismi probiotici, che includono ceppi batterici appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus,* hanno diverse proprietà e funzioni: aderiscono al tessuto epiteliale dell'ospite, resistono all'attività degli acidi gastrici e alla bile, eliminano i patogeni e ne riducono la capacità di adesione,

producono acidi, perossido d'idrogeno e batteriocine che impediscono la riproduzione dei patogeni, non sono patogeni né carcinogenici e migliorano la microflora intestinale (4). Hanno inoltre mostrato attività gastroprotettiva in pazienti pediatrici, attività immunomodulante, capacità di ridurre le allergie alimentari oltre al mantenimento dell'integrità della flora intestinale e alcuni ceppi del genere *Lactobacillus*, hanno mostrato effetti positivi nella riduzione della durata e intensità della diarrea (6).

Tra le potenziali attività dei probiotici, quella più frequentemente studiata per la sua rilevanza, è la loro capacità di modulare il sistema immune a livello delle mucose e a livello sistemico. La comprensione dei meccanismi attraverso i quali i microrganismi probiotici delle flora intestinale modulano le risposte immunitarie, può risultare di notevole rilevanza terapeutica, per la produzione di supplementi probiotici con effetto terapeutico immunomodulante specifico.

L'efficacia dei probiotici nel trattamento delle manifestazioni allergiche, ma anche delle patologie infiammatorie, non soltanto del tratto gastroenterico, è testimoniata da diverse ricerche condotte negli ultimi anni.

Uno studio recente randomizzato, controllato in doppio cieco ha mostrato che il ceppo LGG di *Lactobacillus rhamnosus*, aggiunto al latte formulato, può ridurre il rischio di infezioni ricorrenti già a partire dai primi mesi di vita. In particolare, in associazione con *Bifidobacterium lactis Bb-12*, LGG riduce il rischio di sviluppare otiti e infezioni, ricorrenti alle vie respiratorie, e quindi l'utilizzo della terapia antibiotica, durante il primo anno di vita (7).

I Lattobacilli favoriscono anche lo sviluppo di una risposta immune di tipo Th1, bilanciando così l'equilibrio tra risposta Th1 e Th2 sbilanciata in direzione Th2 nei soggetti allergici. Diversi studi hanno dimostrato quindi che l'impiego di probiotici, in particolare di Lattobacilli, può migliorare la sintomatologia allergica nei soggetti predisposti. Uno studio condotto su bambini in età pre-scolare affetti da rinite e asma di natura allergica ha mostrato che la somministrazione di un particolare ceppo di *Lactobacillus casei* favorisce la riduzione degli episodi di rinite e la durata degli episodi diarroici rispetto ai controlli trattati con placebo (8).

Uno studio "in vitro" ha mostrato che la presenza di *Lactobacillus casei* DN-114 001 in coltura con linfociti derivati da lamina propria di pazienti affetti da morbo di Crohn inibisce la produzione della proteina anti-apoptotica Bcl-2, aumenta la percentuale del linfociti postivi alla deossiuridina trifosfato, mentre diminuisce la percentuale di linfociti T

attivati. L'equilibrio della microflora, anche a livello locale, può favorire quindi la ricostituzione dell'omeostasi immunologica (9).

La domanda di brevetto EP 2 241 616 si riferisce a ceppi di Lactobacillus rhamnosus HN001 e HN067, di Lactobacillus acidophilus HN017, e Bifidobacterium lactis HN01 che forniscono effetti di aumento immunitario quando ingeriti.

La domanda EP 2 251 002 si riferisce a ceppi probiotici non replicativi e il loro uso per preparare una composizione per trattare o prevenire i disturbi correlati una difesa immunitaria compromessa.

La domanda EP 2 407 532 si riferisce a ceppi di Lactobacillus rhamnosus HERO 22A, Lactobacillus paracasei HERO 7 e Bifidobacterium breve HERO 15B e alle loro proprietà probiotiche che hanno effetti benefici sulla salute di chi li ingerisce.

La domanda EP 1 974 735 si riferisce all'uso di specifici Lactobacilli rhamnosus e Bifidobacterium longum per la produzione di un medicinale o una composizione terapeutica nutrizionale da somministrare a neonati almeno per i primi tre mesi di vita per una profilassi a lungo termine della diarrea.

La domanda EP 2 216 035 si riferisce all'uso di probiotici quali Lactobacillus rhamnosus CNCM I-4096 per trattare o prevenire l'obesità.

Poiché diversi probiotici presentano effetti diversi e poiché gli stessi ceppi di batteri appartenenti alla stessa specie presentano caratteristiche fisiologiche o proprietà probiotiche diverse, l'identificazione e la caratterizzazione di nuovi ceppi probiotici è molto importante, soprattutto alla luce della loro applicazione nell'industria alimentare e farmaceutica.

Esiste quindi la necessità di isolare ulteriori batteri lattici in grado di agire come probiotici e immunostimolanti, da utilizzare come farmaci o all'interno di prodotti alimentari, o come integratori.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

E' stato ora isolato, dalle feci di un bambino sano, un nuovo ceppo di micorganismi probiotici costituito da *Lactobacillus rhamnosus,* qui denominato *Lactobacillus rhamnosus* CBA-L64 (CBA-L64) o *Lactobacillus rhamnosus* 5/5 (5/5). La coltura pura di tale ceppo è stata sottoposta ad identificazione tassonomica e a test in vitro di probioticità. E' stato quindi rilevato che il ceppo CBA-L64 possiede caratteristiche probiotiche, i.e.

resistenza al succo gastrico simulato, al succo pancreatico simulato, ai sali di bile e adesione alle cellule epiteliali.

Tale ceppo è stato inoltre sottoposto a prove di stimolazione del sistema immunitario ed è risultato essere dotato di particolari proprietà immunomodulanti. Il ceppo esercita un'azione prevalente di promozione dell'immunità acquisita. In particolare, il ceppo CBA-L64 permette di ottenere:

- un aumento delle cellule dendritiche plasmacitoidi CD123+ in una pre-coltura di cellule dendritiche;
- un aumento delle cellule NK e NKT in una pre-coltura e post-coltura dopo 24 ore di cellule dendritiche;
- un aumento dei linfociti T CD4+ dopo 6 gg di post-coltura;
- un aumento della produzione di IFN-gamma dopo la fine del trattamento;
- un aumento del rilascio di IL-12.

I linfociti T sono un gruppo di leucociti che esercitano un ruolo centrale nella Immunità acquisita cellulo-mediata. Sono distinti dagli altri linfociti, quali i linfociti B e le cellule natural killer (NK) per la presenza di uno specifico recettore presente sulla loro superficie chiamato recettore delle cellule T. I linfociti T riescono a riconoscere un antigene solo se esso viene "presentato" sulla superficie di una cellula complessata con le proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), e non quindi nella sua forma solubile. I linfociti T possiedono un sistema di recettori, TCR/CD4-CD8, tramite i quali riescono a riconoscere il peptide antigenico, presente in un complesso con le proteine dell'MHC. I linfociti T non hanno però solo una funzione effettrice capace di eliminare cellule tumorali, infette e organismi patogeni, ma hanno anche una funzione regolatrice tramite la produzione di linfochine, molecole che sono alla base di fenomeni di cooperazione cellulare nella risposta immunitaria. Le cellule a funzione effettrice possiedono la molecola di riconoscimento CD8 (sono dette CD8+) e sono i linfociti T citotossici (CTL); le cellule con funzione regolatrice sono marcate dalla CD4 (dette CD4+) e sono i linfociti T helper (CTH).

L'attività delle cellule Natural killer (NK) rappresenta una forma di difesa precoce contro infezioni intracellulari. Le cellule NK sono infatti in grado di riconoscere e uccidere cellule tumorali o infettate da virus. L'attività NK viene influenzata da diverse citochine come IL-12 e gli interferoni α e β prodotti durante le fasi precoci di molte infezioni. IL-12 può agire in sinergia con TNF-α e stimolare la produzione di IFN-γ da parte delle cellule

NK. In questo modo l'attività delle cellule NK permette il controllo di alcune infezioni prima ancora che le cellule T siano state stimolate a produrre queste citochine.

Una rara sottoclasse dei linfociti NK, i linfociti NKT, possiedono caratteristiche ascrivibili sia alla popolazione T che alla popolazione NK in quanto esprimono recettori per l'antigene del tipo αβ come i linfociti T, tuttavia, a differenza di questi, il recettore non è generato per ricombinazione somatica ma dalla linea germinativa, esattamente come quelli dei linfociti NK.

Le cellule NKT possiedono attività regolatoria e svolgono un ruolo di collegamento tra immunità innata ed acquisita.

Le cellule dendritiche plasmacitoidi (CD123+) invadono i tessuti durante il processo infiammatorio e, oltre a essere coinvolte nella patogenesi dell'infiammazione, contribuiscono alla modulazione della risposta immune innata e acquisita, in quanto possiedono proprietà regolatorie.

E' quindi un oggetto dell'invenzione un microorganismo probiotico caratterizzato dall'essere costituito da *Lactobacillus rhamnosus* CBA-L64 depositato secondo il Trattato di Budapest presso il Centro BCCM/LMG con numero LMG P-27358 (Deposito n. LMG P-27358 del 17 Dicembre 2012 in accordo con il Trattato di Budapest presso Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM^{TM}), BCCM^{TM}/LMG, Bacteria Collection Laboratorium Voor Microbiologie, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgio).

Detto microrganismo è preferibilmente caratterizzato dal fatto di essere presente sotto forma di coltura biologica pura e/o dal fatto di essere isolato e/o dal fatto di essere sotto forma di cellule vitali.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è una composizione comprendente il microorganismo secondo l'invenzione, in concentrazione immunostimolante, e eccipienti e/o diluenti fisiologicamente accettabili.

La composizione secondo l'invenzione è preferibilmente in forma liofilizzata.

La composizione secondo l'invenzione è preferibilmente in forma di integratore dietetico o alimentare.

Un altro oggetto dell'invenzione è un prodotto alimentare comprendente il microorganismo secondo l'invenzione.

Detto prodotto alimentare comprende preferibilmente: latte, yogurt, formaggio, latte in polvere, cereali e derivati, zuppe in forma disidratata, derivati, succhi e bevande di frutta e/o alimenti per specifici usi nutrizionali.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è una composizione farmaceutica comprendente il microorganismo secondo l'invenzione, in concentrazione immunostimolante, e eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili.

Un altro oggetto dell'invenzione è il microorganismo secondo l'invenzione per uso medico, preferibilmente per uso nella stimolazione dell'immunità acquisita e/o naturale, e/o nella prevenzione/trattamento di asma, e/o nella prevenzione/trattamento di disturbi gastrointestinali, e/o nell'eliminazione/modulazione dei principali patogeni digestivi e/o nel contenimento dei processi infiammatori a livello intestinale.

Nell'ambito dell'invenzione, l'esperto dell'arte realizza che sono anche compresi microrganismi probiotici omologhi o mutanti di Lactobacillus rhamnosus CBA-L64, che abbiano le stesse proprietà, ad esempio che aumentino l'immunità, che siano fisiologicamente accettabili e/o che siano colture biologiche pure, o che abbiano un profilo multibanda ottenuto con la tecnica REP fingerprinting (repetitive extragenic palindromic elements) o un pattern di restrizione ottenuto con l'enzima di restrizione Not I oppure con l'enzima Sfi I ed elettroforesi su gel in campo pulsato (PFGE) sovrapponibile a quello di CBA-L64.

Il termine "probiotico" si riferisce preferibilmente a quelle preparazioni cellulari microbiche o a cellule microbiche o a componenti delle cellule microbiche che presentano effetti benefici sulla salute e il benessere dell'ospite.

La presente invenzioni si riferisce ad eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili come quelli comunemente associati a capsule, compresse o polveri.

Il termine "concentrazione immunostimolante" si riferisce, ad esempio, a concentrazioni tra $1x10^9$ e $1x10^{10}$ UFC/g. La somministrazione è ad esempio effettuata con 1 assunzione/die di 1 grammo di ceppo liofilizzato, alla concentrazione di 1×10^{10} UFC/g (1 g).

L'utilizzo del microrganismo oggetto dell'invenzione è sicuro nell'uomo e possiede una resistenza al contatto con il succo gastrico simulato, ed è quindi adatto all'applicazione gastro-intestinale.

La presente invenzione verrà descritta in esempi non limitativi, facendo riferimento alle seguenti figure:

Figura 1. Amplificazione specie-specifica di CBA-L64. 1) molecular marker 200 bp (Promega), 2) L.rhamnosus ATCC53013; 3) L.rhamnosus ATCC 10863; 4) L.rhamnosus ATCC14957; 5) L.rhamnosus CBA-L64; 6) L.rhamnosus CBA-L92; 7) L.rhamnosus CBA-L93; 8) L.rhamnosus ATCC 11982; 9) controllo negativo. In Figura 1 è riportato l'esito dell'elettroforesi su gel d'agarosio 1,5% dell'amplificazione specie-specifica. Il prodotto di amplificazione di 290 bp è stato ottenuto sia per i controlli positivi (ceppi della collezione ATCC) sia per il ceppo oggetto di interesse CBA-L64.

Figura 2. Profilo ceppo-specifico di CBA-L64 confrontato con quello di altri ceppi di *L.rhamnosus*. La legenda è riportata in Tab. 1, al n. 10 il marcatore di peso molecolare 200 bp (Promega).

Figura 3. Profilo ceppo-specifico di CBA-L64 confrontato con quello di altri ceppi di L.rhamnosus. La legenda è riportata in Tab. 1, marcatore di peso molecolare Lambda DNA (Sigma). La figura riporta i profili PFGE con digestione NotI del ceppo CBA-L64 rispetto a ceppi di collezione e commerciali appartenenti alla stessa specie (L.rhamnosus).

Figura 4. Profilo ceppo-specifico di CBA-L64 confrontato con quello di altri ceppi di L.rhamnosus. La legenda è riportata in Tab. 1. La figura riporta i profili PFGE con digestione Sfi I del ceppo CBA-L64 rispetto a ceppi di collezione e commerciali appartenenti alla stessa specie.

Figura 5. Ricerca del ceppo CBA-L64 nei soggetti testati. L'immagine riportata rappresenta i profili di analisi Rep-PCR ottenuti dalle colonie raccolte dal soggetto 5. M indica il profilo controllo del ceppo puro CBA-L64 utilizzato come indicatore per la comparazione. Dall'immagine è possibile notare come per il soggetto considerato, 7 colonie (corrispondenti ai pozzetti da 1 a 6 e il pozzetto 13) presentano un profilo identico a quello del ceppo di riferimento. Il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 ha mostrato un ottimo livello di recovery fecale.

Figura 6. Proporzione relativa delle sottopopolazioni di cellule dendritiche in coltura (CD11 mieloidi e CD123 plasmacitoidi), prima della messa a contatto in-vitro con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65.

I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2).

Si evidenzia un significativo aumento delle cellule dendritiche plasmacitoidi nel post-trattamento nel gruppo 2. Tale aumento è più elevato di quanto riscontrato nel gruppo controllo 1 mentre nel gruppo 3 non si osservano variazioni degne di nota.

Figura 7. Proporzione relativa delle sottopopolazioni di linfociti T (CD3, CD4, CD8), prima della messa a contatto in-vitro con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65. I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Non si evidenzia nessuna variazione significativa nelle proporzioni dei diversi tipi di linfociti T nei 3 gruppi considerati, sia quello che ha assunto il ceppo CBA-L64 sia nei gruppi controllo.

Figura 8. Proporzione relativa delle sottopopolazioni di cellule Natural Killer NK ed NKT, prima della messa a contatto in-vitro con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65. I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Si evidenzia un significativo aumento delle cellule NK ed NKT nel post-trattamento nel gruppo 2 (fase di sospensione). Tale aumento è più elevato di quanto riscontrato nel gruppo controllo 1, per quanto riguarda specificamente le cellule NK, mentre nel gruppo 3 non si osservano variazioni degne di nota.

Figura 9. Proporzione relativa delle sottopopolazioni di cellule dendritiche CD11 mieloidi in coltura, dopo la messa a contatto in-vitro per 24 ore con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65. I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Il dato "basale" si riferisce alla fase precedente l'inizio del contatto con le cellule del probiotico e quindi all'assenza della stimolazione. Le barre colorate indicano, da sinistra a destra, il dato basale (grigio chiaro), il dato a seguito del contatto con il ceppo L.rhamnosus CBA-

L64 (grigio scuro), con il ceppo L.rhamnosus CBA-L65 (bianco) e con il ceppo L.paracasei CBA-L66 (nero). Nel gruppo 2 trattato con il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 si osserva la riduzione delle cellule dendritiche mieloidi sia durante sia dopo l'assunzione (basale) come anche a seguito di stimolazione con i 3 ceppi batterici considerati. Nessuna variazione apprezzabile nel gruppo 3. Nel gruppo 1, che ha assunto uno dei ceppi controllo, la produzione di cellule mieloidi aumenta nel basale soprattutto dopo la cessazione dell'assunzione.

Figura 10. Proporzione relativa delle sottopopolazioni di cellule dendritiche CD123 plasmacitoidi in coltura, dopo la messa a contatto in-vitro per 24 ore con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65. I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Il dato "basale" si riferisce alla fase precedente l'inizio del contatto con le cellule del probiotico e quindi all'assenza della stimolazione. Le barre colorate indicano, da sinistra a destra, il dato basale (grigio chiaro), il dato a seguito del contatto con il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 (grigio scuro), con il ceppo L.rhamnosus CBA-L65 (bianco) e con il ceppo L.paracasei CBA-L66 (nero). Nel gruppo 2 solo la stimolazione con il ceppo controllo L.paracasei CBA-L66 determina un significativo incremento delle cellule dendritiche plasmacitoidi alla fine dell'assunzione mentre negli altri gruppi non si osservano variazioni significative. Il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 è in grado di stimolare la produzione di cellule CD123 nei soggetti che hanno assunto il ceppo L.rhamnosus controllo.

Figura 11. Proporzione relativa delle sottopopolazioni di cellule Natural Killer NK in coltura, dopo la messa a contatto in-vitro per 24 ore con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65. I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Il dato "basale" si riferisce alla fase precedente l'inizio del contatto con le cellule del probiotico e quindi all'assenza della stimolazione. Le barre colorate indicano, da sinistra a destra, il dato

basale (grigio chiaro), il dato a seguito del contatto con il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 (grigio scuro), con il ceppo L.rhamnosus CBA-L65 (bianco) e con il ceppo L.paracasei CBA-L66 (nero). Non si osserva nessuna variazione apprezzabile nei 3 gruppi di soggetti sia in assenza sia in presenza di stimolazione per contatto con i ceppi probiotici.

Figura 12. Proporzione relativa delle sottopopolazioni di cellule Natural Killer NKT in coltura, dopo la messa a contatto in-vitro per 24 ore con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65. I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Il dato "basale" si riferisce alla fase precedente l'inizio del contatto con le cellule del probiotico e quindi all'assenza della stimolazione. Le barre colorate indicano, da sinistra a destra, il dato basale (grigio chiaro), il dato a seguito del contatto con il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 (grigio scuro), con il ceppo L.rhamnosus CBA-L65 (bianco) e con il ceppo L.paracasei CBA-L66 (nero). Si osserva una variazione significativa nel basale solo nell'ambito del gruppo 2 che ha assunto il ceppo CBA-L64.

Figura 13. Proporzione relativa di CD4+ di linfociti T (immunità acquisita), dopo la messa a contatto in-vitro per 6 giorni con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65. I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Il dato "basale" si riferisce alla fase precedente l'inizio del contatto con le cellule del probiotico e quindi all'assenza della stimolazione. Le barre colorate indicano, da sinistra a destra, il dato basale (grigio chiaro), il dato a seguito del contatto con il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 (grigio scuro), con il ceppo L.rhamnosus CBA-L65 (bianco) e con il ceppo L.paracasei CBA-L66 (nero).

Il più significativo incremento dei linfociti T CD4+ si verifica nel gruppo 2, che ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64, sia durante sia dopo l'assunzione ed a seguito dell'esposizione al ceppo L.rhamnosus controllo (CBA-L65).

Figura 14. Proporzione relativa di CD8+ linfociti T (immunità acquisita), dopo la messa a contatto in-vitro per 6 giorni con i ceppi probiotici, nei soggetti trattati con probiotici. Il

gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65.

I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Il dato "basale" si riferisce alla fase precedente l'inizio del contatto con le cellule del probiotico e quindi all'assenza della stimolazione. Le barre colorate indicano, da sinistra a destra, il dato basale (grigio chiaro), il dato a seguito del contatto con il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 (grigio scuro), con il ceppo L.rhamnosus CBA-L65 (bianco) e con il ceppo L.paracasei CBA-L66 (nero).

Non si osserva nessuna variazione significativa in nessuno dei gruppi considerati e per nessuno dei ceppi.

Figura 15. Attività delle cellule Natural Killer NK, forma di difesa precoce contro le infezioni intracellulari, nei soggetti trattati con probiotici. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65.

I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Nel gruppo 2 e nel gruppo controllo 3 si verifica un incremento significativo dell'attività delle cellule NK sia durante sia dopo l'assunzione.

Figura 16-18. La produzione di citochina IL-10 è espressa come incremento percentuale della produzione in presenza dei 3 ceppi batterici. Il suo livello è stato valutato, sia dopo 24 ore sia dopo 6 giorni di stimolazione, nei 3 gruppi considerati. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo oggetto del presente documento L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65.

I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2).

Dopo 24 ore di stimolazione, nel gruppo 2 la produzione di IL-10 appare inibita in tutti e 3 i tempi considerati mentre nei gruppi controllo il rilascio di IL-10 aumenta nel corso dell'assunzione.

Figure 19-21. Dopo 6 giorni di stimolazione, nei soggetti appartenenti al gruppo 2 aumenta la produzione di IL-10, ad opera di tutti i ceppi considerati, sia durante che dopo la fine del periodo di assunzione. Una risposta analoga è stata rilevata anche nel gruppo controllo che ha assunto L.rhmanosus ma non nel gruppo che ha assunto L.paracasei controllo.

Figure 22-27. La citochina TNF-alfa è coinvolta nei processi di infiammazione sistemica ed è coinvolta nella fase acuta dell'infiammazione. I linfociti in coltura isolati dal sangue dei volontari ed esposti per 24 ore e per 6 giorni alla stimolazione con il ceppo CBA-L64 e con i 2 ceppi controllo. Il surnatante del mezzo di coltura è stato separato e la concentrazione di TNF-alfa è stata valutata per le diverse condizioni di trattamento.Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65.

I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2).

Dopo 24 ore di stimolazione dei linfociti dei volontari, appartenenti ai 3 gruppi, con il ceppo CBA-L64 e con i 2 ceppi controllo, il gruppo 2 presenta una generale inibizione della produzione di TNF-alfa mentre nei gruppi controllo si osserva una stimolazione della produzione soprattutto nella fase di sospensione dell'assunzione dei batteri. Prolungando la durata della stimolazione a 6 giorni, il gruppo 2 mostra l'induzione della produzione di TNF-alfa solo durante la sospensione dell'assunzione (T2).

Figure 28-33. La glicoproteina IFN-γ è rilasciata dai linfociti CD8 e CD4 dopo stimolazione antigenica o policlonale ma anche dalle cellule NK. IFN-γ esercita una potente azione immunomodulatoria ed antivirale ed anti-proliferativa. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65.

I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2). Dopo 24 ore di stimolazione dei linfociti dei volontari, appartenenti ai 3 gruppi, con il ceppo CBA-L64 e con i 2 ceppi controllo, nel gruppo 2 si osserva una generale inibizione della produzione di IFN-γ con stimolazione della produzione solo a seguito del contatto con il ceppo L.paracasei controllo. Analogamente, prolungando la durata della stimolazione a 6 giorni, il gruppo 2

mostra l'induzione della produzione di IFN-γ in particolar modo durante la sospensione dell'assunzione (T2).

Figura 34. Il grafico riporta la produzione di IL-12, espressa in pg/ml, da parte dei linfociti in coltura prelevati dai soggetti appartenenti ai 3 gruppi di assunzione. Il gruppo 2 ha assunto il ceppo L.rhamnosus CBA-L64 mentre i gruppi 1 e 3 hanno assunto rispettivamente i ceppi controllo L.paracasei CBA-L66 ed L.rhamnosus CBA-L65. I tempi T0, T1 e T2 indicano rispettivamente il tempo basale, prima dell'inizio del periodo di assunzione del probiotico; dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di wash-out con sospensione dell'assunzione (T2).

Nel gruppo 2 la produzione di IL-12 aumenta durante l'assunzione e la sospensione in risposta alla stimolazione con tutti e 3 i ceppi batterici, sia CBA-L64 sia i controlli. Nei 2 gruppi controllo l'incremento, più modesto di quello evidenziato per il gruppo 2, si osserva solo nella fase di sospensione.

Figura 35. Il confronto tra i ceppi Lb.rhamnosus CBA-L64 ed il ceppo controllo Lb.rhamnosus ATCC 530103 (anche noto come Lb.rhamnosus GG o LGG, diffusamente utilizzato a livello commerciale in Italia ed all'estero) ha rivelato quanto segue:

- la perdita di vitalità (espressa come log10 UFC) subita dal ceppo CBA-L64 esposto per 1,5 ore al contatto con il succo gastrico è risultata pari a 1,41 mentre la perdita del ceppo commerciale si è attestata a 2,74, indicando una maggiore suscettibilità di quest'ultimo alla condizione di stress determinata dall'ambiente acido dello stomaco;
- l'esposizione al succo pancreatico simulato non ha determinato sia per CBA-L64 sia per ATCC53103 nessuna perdita di vitalità dopo 1,5 ore di contatto. Si veda anche Tabella 12.

Figura 36. I 2 ceppi sono stati coltivati in terreno di coltura MRS e nello stesso terreno addizionato dello 0,3% di sali di bile. La capacità di svilupparsi in tali mezzi di coltura è stata valutata mediante la misurazione della densità ottica a 600 nm. Il ceppo CBA-L64 ha rivelato una capacità moderatamente più elevata, rispetto al ceppo commerciale ATCC53103, di resistere alla presenza di sali di bile. Si veda anche Tabella 13.

ESEMPI

Materiali e Metodi

Il riferimento regolatorio per le attività descritte nel presente allegato è rappresentato dalle Linee Guida sui Probiotici "Indicazioni per alimenti e integratori contenenti microrganismi (batteri e/o lieviti) probiotici, tradizionalmente utilizzati per gli equilibri della flora intestinale" emanate dal Ministero della Salute, DIPARTIMENTO SANITA'

PUBBLICA VETERINARIA, SICUREZZA ALIMENTARE E DEGLI ORGANI COLLEGIALI, DIREZIONE GENERALE IGIENE E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E DELLA NUTRIZIONE UFFICIO IV EX DGSAN, Commissione unica per la dietetica e la nutrizione, emanato nel Dicembre 2005 e sua Revisione del 2011. In quest'ultimo documento si fa espresso riferimento all'utilizzazione del sequenziamento del 16S per la caratterizzazione di specie ed a quella della PFGE per l'identificazione a livello di ceppo. Le tecniche di fingerprint (es. RAPD, Eric) venivano invece espressamente indicate nel documento di Dicembre 2005.

Ceppi batterici

Il ceppo Lactobacillus rhamnosus CBA-L64 (anche detto L.rhamnosus 5/5) è stato isolato dalle feci di un bambino sano e la coltura pura è stata sottoposta ad identificazione tassonomica mediante metodi di biologia molecolare in accordo con le recenti linee guida del Ministero della Salute sui probiotici (Ottobre 2011) e a test in vitro di probioticità in osservanza alle linee guida FAO/WHO (2002).

Identificazione tassonomica a livello di specie

PCR specie-specifica

Una coppia di primers (Y2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' (SEQ ID NO:1) e rham 5'-TGCATCTTGATTTAATTTTG-3'(SEQ ID NO:2) per l'amplificazione di una porzione del gene codificante il 16SrRNA di L.rhamnosus, è stata utilizzata a fini identificativi, come indicato da Ward & Timmins (15).

La miscela di PCR (25 µl) conteneva 1 µl di ciascun primer, Y2 e RHAM, (NBS Biotech, Milan, Italy) e 25 µM di MegaMix (Microzone, UK)

Il ciclo di amplificazione consisteva in un'iniziale denaturazione di 3 min a 94°C; 30 cycles di 45 sec a 94°C, 45 sec a 45°C e 1 min a 72°C ed un'estensione finale di 5 min a 72°C.

La suddetta coppia di primers consente di differenziare, mediante il criterio di presenza/assenza, la specie L.rhamnosus da L.casei e L.paracasei.

Come è possibile rilevare dalla Figura 1, il prodotto di amplificazione di 290bp è stato ottenuto sia per i controlli positivi (ceppi della collezione ATCC) sia per il ceppo oggetto di interesse CBA-L64.

Sequenziamento parziale del gene codificante per il 16S rRNA

Il gene codificante il 16S rRNA di CBA-L64 è stato sequenziato parzialmente a partire dal DNA estratto dalle colonie isolate su piastre di MRS. Il DNA è stato prima amplificato mediante i primers P0 e P6 (13) (P0 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO:3) P6 5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA (SEQ ID NO:4)) poi visualizzato e quantificato su gel d'agarosio e poi preparato per il sequenziamento mediante il primer forward P0 ed il primer reverse P2 (P2 5'-GTCAGCTCGTGTCGTGAGAT (SEQ ID NO:5)) .

La sequenza ottenuta per il ceppo CBA-L64 è stata comparata con sequenze analoghe presenti nel GeneBank database mediante BLAST analysis.

Di seguito i risultati di similarità ottenuti per il ceppo CBA-L64:

Ricerca delle omologie con la sequenza del 16SDNA di CBA-L64

ALLINEAMENTO "FORWARD" (primer P0)

Query = CBA-L64

Sequence = controllo positivo, ATCC7469

```
gb|JQ580982.1|  Lactobacillus rhamnosus strain ATCC 7469 16S ribosomal
RNA gene,
partial sequence
Length=969

 Score =  1109 bits (600),  Expect = 0.0
 Identities = 600/600 (100%), Gaps = 0/600 (0%)
 Strand=Plus/Plus
```



ALLINEAMENTO "REVERSE" (primer P2)

Query = CBA-L64

Sequence = controllo positivo, ATCC53103 (LGG)

dbj|AP011548.1| Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103 DNA, complete genome

Length=3005051

Score = 1090 bits (590), Expect = 0.0
Identities = 590/590 (100%), Gaps = 0/590 (0%)
Strand=Plus/Minus



Identificazione tassonomica a livello di ceppo mediante Rep-PCR

Una serie di ceppi appartenenti alla specie L. rhamnosus, elencati in **Tab.1**, sono stati sottoposti a PCR ceppo-specifica mediante tecnica Rep-PCR. Alcuni ceppi sono stati acquisiti presso la collezione internazionale ATCC (American Type Culture Collection) ed altri sono stati isolati da prodotti commerciali.

Tab. 1 Ceppi di riferimento per la tracciabilità di CBA-L64

Codice	Ceppo di *L.rhamnosus*	Origine
1	*L.rhamnosus* RO11	Probiocap (Lallemand)
2	*L. rhamnosus* LGG	Dicoflor (Dicofarm)
3	L.rhamnosus ATCC53103	Collezione ATCC
4	*L. rhamnosus* CBA-L92	Isolato naturale di proprietà di AAT Srl
5	*L. rhamnosus*	Kalofreeze Donna (Paladin Pharma)
6	*L. rhamnosus* ATCC 14957	Collezione ATCC
7	L.rhamnosus	Lichtena (Giuliani)
8	*L.rhamnosus* CBA-L64	Isolato naturale di proprietà di

		AAT Srl
9	*L. rhamnosus* ATCC10863	Collezione ATCC

I DNA totali estratti da tali ceppi, mediante FTA Starter pack (Whatman, Maidstone, United Kingdom) sono poi stati amplificati via PCR con il primer GTG5 (16) ((GTG)5 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'(SEQ ID NO:6)). L'identificazione ceppo-specifica è infatti stata realizzata mediante la tecnica REP fingerprinting (repetitive extragenic palindromic elements) che consente di ottenere profili multibanda tipici dei singoli ceppi e che, comparati tra loro per ceppi diversi, forniscono affidabili indicazioni circa l'identità genetica tra ceppi batterici considerati originariamente diversi. Questa tecnica rappresenta un valido e riproducibile strumento per riconoscere e distinguere il ceppo CBA-L64 rispetto all'ampio panorama di ceppi di *L.rhamnosus* presenti sul mercato e nelle collezioni internazionali.

La figura 2 riporta i profili Rep del ceppo CBA-L64 rispetto a ceppi di collezione e commerciali appartenenti alla stessa specie (L.rhamnosus). L'analisi dei profili evidenzia come il ceppo in oggetto presenti un fingerprint diverso rispetto agli altri ceppi analizzati, confermando la sua diversa identità genetica.

Identificazione Tassonomica a livello di ceppo mediante mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

I DNA dei ceppi appartenenti alla specie L. rhamnosus, elencati in **Tab.1**, sono stati sottoposti ad analisi del profilo di ceppo-specificità mediante elettroforesi su gel in campo pulsato (PFGE). Alcuni ceppi sono stati acquisiti presso la collezione internazionale ATCC (American Type Culture Collection) ed altri sono stati isolati da prodotti commerciali.

I DNA totali sono stati estratti dai ceppi oggetto di analisi mediante il protocollo di lisi in-situ da cellule immobilizzate in agarosio low-melting.

IL DNA così ottenuto è stato quindi digerito con l'enzima di restrizione Not I (Promega) (**Fig. 3**) oppure con l'enzima Sfi I (**Fig. 4**) alla concentrazione di 50 U per reazione.

I prodotti della digestione sono stati sottoposti ad elettroforesi in campo pulsato per 22 ore a 14°C alle seguenti condizioni: gradiente 5 V/cm, pulse-time 1 – 15 secondi, angolo 120°. Tale analisi consente di ottenere profili multibanda tipici dei singoli ceppi e che, comparati tra loro per ceppi diversi, forniscono affidabili indicazioni circa l'identità genetica tra ceppi batterici considerati originariamente diversi. Questa tecnica è indicata sia dal

Ministero della Salute (Linee Guida 2011) sia da EFSA (come strumento consigliato per la identificazione dei ceppi probiotici.

Profilo di sensibilità agli antibiotici

Le minime concentrazioni inibenti (MICs), di 15 antibiotici sono state determinate. La determinazione delle MICs è stata eseguita impiegando il metodo ISO 10932:2010 come suggerito nella Scientific Opinion EFSA (2012) "Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance" (EFSA Journal 2012;10(6):2740). Come indicato nella normativa ISO 10932:2010 IDF 223:2010 è stato impiegato il ceppo Lactobacillus paracasei ATCC 334 come ceppo controllo.

In tabella n. 2 sono stati riportati i risultati delle MICs ottenute sia per il ceppo test CBA-L64 sia per il ceppo controllo L. paracasei ATCC 334 ed i relativi cut-off EFSA.

Il ceppo CBA-L64 presenta valori di MIC inferiori al cut off indicato da EFSA per quasi tutti gli antibiotici testati e può quindi essere definito sensibile a Gentamycin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline, Erythromycin, Clindamycin, Ampicillin e Vancomycin.

Nel caso del cloramfenicolo, sia il ceppo controllo sia il ceppo CBA-L64 presentano un valore di MIC superiore al cut off. Tuttavia, trattandosi di un solo fattore di diluizione di differenza ed evidenziandosi tale discrepanza anche nel ceppo controllo, la differenza osservata può essere imputata alla variabilità legata alle performances del terreno di coltura e quindi non indurre alla definizione del ceppo come resistente al cloramfenicolo.

Tab. 2 – Profilo della sensibilità agli antibiotici secondo la norma ISO 10932:2010.

L. rhamnosus CBA-L64			
Antibiotic	*L. rhamnosus* CBA-L64	*L. paracasei* ATCC 334	EFSA cut-off 2012 for *L. rhamnosus*
Concentration range (µg/ml)	(ug/ml)	(ug/ml)	(ug/ml)
Gentamycin	4	8	16
Kanamycin	64	64	64
Streptomycin	2	16	32
Tetracycline	0,5	1	8
Erythromycin	0,25	0,25	1
Clindamycin	0,5	0,125	1
Chloramphenicol	4	4	4
Ampicillin	0,25	0,5	4
Vancomycin	/*	/*	n.r.
Neomycin	16	8	n.r.
Virginiamycin	non testata	non testata	n.r.
Ciprofloxacin	4	4	n.r.
Linezolid	4	4	n.r.
Rifampicin	0,5	0,5	n.r.
Trimethoprim	/*	/*	n.r.
/* non applicabile			
n.r.* non richiesto da EFSA			

Test in vitro di sopravvivenza al succo gastrico simulato

L'analisi è stata condotta secondo le indicazioni fornite da Charteris et al., 1998, Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. (J Appl Microbiol. 84(5):759-68).

Tab. 3 – Resistenza al succo gastrico simulato (metodo Charteris)

CEPPO	T0 (carica iniziale)	T1 (1 min. contatto)	T90 (90 min. contatto)	T180 (180 min. contatto)
CBA-L64	$1,4 \times 10^8$ UFC/ml	1×10^8 UFC/ml	$2,1 \times 10^7$ UFC/ml	$< 10^4$ UFC/ml

L'analisi mostra una discreta sopravvivenza al transito gastrico. Poiché le condizioni analitiche descritte da Charteris risultano essere molto critiche e restrittive, questo saggio è stato ripetuto secondo quanto descritto da Corcoran et al., 2005, (Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 2005, p. 3060–3067 Vol. 71, No. 6)

Tab. 4 – Resistenza al succo gastrico simulato (metodo Corcoran)

CEPPO	T0 (carica iniziale)	T1 (1 min. contatto)	T240 (240 min. contatto)
CBA-L64	$2,2 \times 10^8$ UFC/ml	$2,8 \times 10^8$ UFC/ml	$3,2 \times 10^8$ UFC/ml

I risultati ottenuti mostrano come la sopravvivenza nei primi 45 minuti di contatto sia ulteriormente migliorata al variare delle condizioni del test.

Test in vitro di sopravvivenza al succo pancreatico simulato

L'analisi è stata condotta secondo le indicazioni fornite da Charteris et al., 1998 (Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract, J Appl Microbiol. 1998 May;84(5):759-68).

Tab. 5 – Resistenza al succo pancreatico simulato Il ceppo CBA-L64 ha mostrato un'ottima capacità di sopravvivenza al transito pancreatico simulato.

CEPPO	T0 (carica iniziale)	T1 (1 min. contatto)	T240 (240 min. contatto)
CBA-L64	$2,2 \times 10^8$ UFC/ml	$2,8 \times 10^8$ UFC/ml	$3,2 \times 10^8$ UFC/ml

Il ceppo CBA-L64 ha mostrato un'ottima capacità di sopravvivenza al transito pancreatico simulato.

Sopravvivenza in vitro ai sali di bile

L'analisi è stata condotta confrontando la capacità del ceppo di crescere in terreno selettivo per lattobacilli (MRS medium, Difco) con e senza l'aggiunta di 0,3% di sali di bile liofilizzati (Oxgall, Difco). I ceppi sono stati incubati a 37°C per 48 ore in anaerobiosi.

Tab. 6 – Resistenza ai sali di bile

CEPPO	MRS	MRS + 0,3%OXGALL (Difco)
CBA-L64	$1,4 \times 10^9$ UFC/ml	$2,6 \times 10^9$ UFC/ml

Il ceppo CBA-L64 ha mostrato un'ottima capacità di sopravvivenza ai sali di bile.

Adesione in vitro all'epitelio intestinale

L'analisi è stata svolta valutando la capacità del ceppo di aderire ad un monostrato di cellule intestinali coltivate in vitro.

Per questa prova è stata utilizzata la linea cellulare HT-29 e la valutazione dell'adesione è stata fatta dopo 1 ora di co-cultura (determinazione mediante conta in piastra).

Tab. 7 – Adesione a linea cellulare intestinale

CEPPO	% cellule adese /totale cells batteriche – linea cellulare HT-29	Indice di adesione (batteri x 100 cellule epiteliali)
CBA-L64	3% (media su tre valutazioni)	15,04 +/-0,4

Il test è stato ripetuto utilizzando la linea cellulare Caco2 e il muco (mucina suina tipo II) :

Tabella 8

CEPPO	%cellule adese/totale cells batteriche – linea cellulare Caco2	Indice di Adesione (batteri x 100 cellule Caco2)
CBA-L64	3% (media su tre valutazioni)	85,04+/-16

Tabella 9

CEPPO	% cellule adese alla mucina (test in piastra)
CBA-L64	27,18%

Produzione di citochine da cellule dendritiche e proliferazione dei linfociti

Dopo 24 ore di contatto del ceppo con cellule dendritiche (rapporto 1:1 batteri/cells) sono state misurate le seguenti quantità di IL10 ed IL12.

Tab. 10 – Rilascio di citochine

CEPPO	PROLIFERAZIONE DEI LINFOCITI	IL10 (pg/ml)	IL12 (pg/ml)
L. rhamnosus CBA-L64	neg	48	4,2

Prova di persistenza in-vivo – studio di fattibilità

Lo studio in oggetto ha come scopo la verifica delle capacità di colonizzazione in vivo del ceppo CBA-L64.

Lo studio è stato svolto selezionando 3 soggetti adulti sani che hanno firmato il consenso informato.

A ciascun soggetto è stato somministrato il ceppo CBA-L64 per tre settimane, ad una concentrazione di 1 x 1010 UFC/die; lo studio si è completato dopo una settimana di sospensione dell'assunzione.

Prima dell'assunzione della prima dose di probiotico, dopo 3 settimane di trattamento ed una settimana dopo la sospensione del probiotico sono stati prelevati e analizzati a fresco dei campioni fecali, per determinare se il ceppo somministrato è capace di permanere a livello intestinale.

I campioni sono stati seminati su terreno selettivo per lattobacilli (Rogosa, Difco, + vancomicina) e successivamente le colonie sono state analizzate mediante Rep PCR per l'identificazione del ceppo.

Risultati della prova

GRUPPO "B" – Lactobacillus rhamnosus CBA-L64

Le semine dei campioni fecali raccolti al tempo zero, prima dell'assunzione dei ceppi probiotici, mostrano una carica in lattobacilli eterofermentanti compresa tra 2.1x104 UFC/g e 1,4x106 UFC/g di feci.

Dopo tre settimane di assunzione dei probiotici la carica microbica fecale in lattobacilli eterofermentanti risulta compresa tra 6.7x104 UFC/g e 4.1x107 UFC/g; alla fine della sperimentazione, dopo una settimana di sospensione della somministrazione, la carica microbica fecale in lattobacilli eterofermentanti risulta compresa tra 2,5x104 UFC/g e 3.6x105 UFC/g.

Il ceppo, come determinato mediante Rep-PCR, risulta presente nel 100% dei soggetti analizzati dopo 21 giorni di trattamento e nel 33,3% dei soggetti dopo 7 giorni di sospensione. I risultati dettagliati sono esposti nella **tabella 11** sottostante e in **figura 5**.

Tabella 11

SOGGETTI	T0 (UFC/g)	T21 (UFC/g)	T28 (UFC/g)
4	$1.4x10^4$	$2.4x10^7$	$3.6x10^5$
5	$2.1x10^4$	$4.1x10^7$	$2.5x10^5$
6	$2.1x10^4$	$5.7x10^7$	$9.4x10^4$

SOGGETTI	T21 (n. colonie positive/colonie totali analizzate)	T28 (n. colonie positive/colonie totali analizzate)
4	6/6	0/5
5	11/11	2/6
6	4/13	0/9

Tabella 12. TOLLERANZA AL TRANSITO GASTRO-INTESTINALE SIMULATO

Tempo di contatto (ore)	Succo gastrico simulato		Succo pancreatico	
	ATCC 53103	CBA-L64	ATCC 53103	CBA-L64
0	8,96	8,49	8,94	8,34
1,5	6,22	7,08	8,94	8,45

Tabella 13. CRESCITA DEI CEPPI IN TERRENO DI COLTURA IN PRESENZA DI SALI DI BILE

	MRS	MRS oxgall 0,3%
ATCC 53103	1,65	1,11
CBA-L64	1,87	1,32

Analisi proprietà immunomodulanti in vivo

Ceppi batterici

I ceppi batterici, di origine fecale, sono stati forniti alla concentrazione di $1x10^8$ cfu/ml in terreno di coltura sterile. I ceppi batterici sono stati sottoposti ad irraggiamento per 24 ore con intensità di 33Gy all'irradiatore al Cesio (^{137}Cs), come previsto dagli studi di irraggiamento.

Al termine dell'irraggiamento, i batteri sono stati risospesi in terreno RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologues, Scotland) concentrazione di $1x10^6$ cfu/ml.

Soggetti partecipanti allo studio

Per lo studio sono stati arruolati 9 volontari adulti sani presso l'istituto AAT (Advanced Analytical Technologies) di Piacenza che hanno firmato il consenso informato. I volontari sono stati suddivisi in tre gruppi che hanno assunto ciascuno un preparato contenente un ceppo probiotico differente:

- gruppo 1: *Lactobacillus paracasei* CBA-L66 (ceppo controllo)
- gruppo 2: *Lactobacillus rhamnosus* 5/5 (CBA-L64)
- gruppo 3: *Lactobacillus rhamnosus* CBA-L65 (ceppo controllo).

I volontari hanno assunto 1 busta al giorno, contenente 1 grammo di ceppo liofilizzato, alla concentrazione di 1 x 10^{10} UFC/g.

Ai soggetti partecipanti allo studio sono stati prelevati circa 10 ml di sangue venoso in contenitore eparinato ai tre tempi concordati.

Separazione dei linfociti da sangue periferico

Il sangue periferico è stato separato su Fycoll Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS,Oslo,Norway) come precedentemente descritto (10) e le cellule mononucleate recuperate sono state congelate in FCS al 10% di DMSO e criopreservate in azoto liquido a –180°C.

Colture cellulari in presenza dei Lattobacilli

I linfociti separati da sangue periferico sono stati scongelati al momento dell'utilizzo in bagnetto termostatato a 37°C e risospesi in terreno RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologues, Scotland) con l'aggiunta del 10% di FCS (Foetal Calf Serum, Euroclone).

Dopo essere stati contati, i linfociti sono stati messi in coltura alla concentrazione di $1x10^6$/ml in piastre a 96 pozzetti a fondo a U (Corning Costar) in presenza del *Lactobacillus rhamnosus* 5/5, del *Lactobacillus rhamnosus* CBA-L65 (ceppo controllo) e del *Lactobacillus paracasei CBA-L66* (ceppo controllo) in rapporto di concentrazione 1:1. Le cellule e i batteri sono quindi stati incubati per 24 ore e 7 giorni in incubatore a 37°C, con il 5% di CO_2.

Valutazione del fenotipo cellulare

Le cellule mononucleate dei partecipanti allo studio prima della coltura "in vitro" sia dopo 24 ore e 7 giorni in coltura, sono state incubate per 30 minuti con anticorpi monoclonali marcati con diversi fluorocromi e successivamente analizzate al citofluorimetro FACScanto (Becton Dickinson - BD, Milan, Italy). Sono state determinate le sottoclassi di linfociti CD4, CD8, le cellule natural killer NK (CD16/56), le cellule NKT (CD3/56) e le sottopopolazioni delle cellule dendritiche mieloidi (HLADR/CD11c$^+$) e plasmacitoidi (HLADR/CD123$^+$) prima della coltura "in vitro" sia prima dell'assunzione del prodotto probiotico, sia dopo 20 giorni di assunzione sia dopo 7 giorni di sospensione. Tutti gli anticorpi sono stati forniti dalla Becton Dickinson. I dati sono stati analizzati mediante il software BD-Diva (BD).

Valutazione della produzione di citochine

Dopo 24 ore e 6 giorni in coltura con i batteri, sono stati raccolti i surnatanti per il dosaggio delle citochine IL-10, IL-12, IFN-γ e TNF-α prodotte in seguito alla

stimolazione antigenica, mediante metodica ELISA messa a punto nel nostro laboratorio. Gli anticorpi per la determinazione quantitativa di IL-10, IL-12, TNF-α e lo standard dell'IFN-γ sono stati forniti da Endogen-Tema, (U.S.A.). La ditta Mabtech (Sweden) ha invece fornito gli anticorpi per il dosaggio dell'IFN- γ.

Attività Natural Killer (NK)

Per lo studio dell'attività NK, i linfociti ai tempi T0, T1 e T2 sono stati piastrati overnight in terreno RPMI 1640 +10% FCS ad una concentrazione di $2x10^6$/ml. Un numero sufficiente di cellule K562, una linea cellulare tumorale di linfoma umano, sono state marcate overnight con ^{51}Cr (Perkin Elmer, USA). Il giorno successivo le cellule K562 sono state contate, è stata valutata l'emissione di raggi γ, mediante il conteggio dei CPM (colpi per minuto) effettuata con un Auto-gamma Counter (Packard) e sono state piastrate in una piastra a 96 pozzetti a fondo a U ad una concentrazione variabile da 1000 a 3000 cells/well, dipendente dell'intensità di emissione. I linfociti , dopo essere stati contati, sono stati incubati per 4 ore a 37° C a contatto con le cellule K562 in rapporto di concentrazione 1:10, 1:30 e 1:100 rispetto a queste ultime. L'attività delle cellule NK è stata valutata come percentuale di lisi delle cellule K562 .

RISULTATI

L'attività immunomodulante dei ceppi di Lattobacilli (Lactobacillus rhamnosus 5/5, Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) e Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo)) è stata valutata in colture cellulari di linfociti di volontari adulti sani che hanno assunto per 21 giorni dei preparati probiotico i tre Lattobacilli separati.

In particolare sono stati valutati prima dell'assunzione dei probiotici (T0), dopo 21 giorni di assunzione (T1) e dopo 7 giorni di sospensione (T2), l'effetto "in vitro" dei tre Lattobacilli sulla produzione di citochine, sul fenotipo cellulare e sull'attività litica della cellule Natural Killer (NK).

Valutazione del fenotipo cellulare

Pre-coltura

La valutazione del fenotipo cellulare è stata effettuata sia prima che dopo la coltura cellulare con i ceppi batterici oggetto di studio.

Le cellule dendritiche oltre a svolgere il ruolo di cellule presentanti l'antigene, sono anche implicate nella regolazione della risposta innata e nel mantenimento della tolleranza

immunolgica. Si possono distinguere due sottopopolazioni principali: le cellule dendritiche mieloidi (CD11c+) e le cellule dendritiche plasmacitoidi (CD123+).

Le cellule dendritiche CD11c+ sono maggiormente coinvolte nei processi infiammatori e producono citochine e mediatori infiammatori che richiamano altre cellule dell'immunità innata nella sede dell'infiammazione.

Le cellule dendritiche plasmacitocidi (CD123+) invadono i tessuti durante il processo infiammatorio e, oltre a essere coinvolte nella patogenesi dell'infiammazione, contribuiscono alla modulazione della risposta immune innata e acquisita, in quanto possiedono proprietà regolatorie.

Come mostrato in figura 6, nel gruppo 1 si osserva una diminuzione della percentuale di cellule dendritiche CD11c+ dopo l'assunzione del prodotto, mentre al T2 (dopo la sospensione), la percentuale aumenta di nuovo quasi ma sempre inferiore al basale. Le cellule CD123+, aumentano al T1 dopo assunzione del prodotto Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) e si mantengono anche dopo la sospensione. Nel gruppo 2 la cellule CD11c+ non variano molto dopo l'assunzione del prodotto e diminuiscono dopo la sospensione, mentre le cellule CD123+ aumentano dopo la sospensione. Nel gruppo 3 non si osservano differenze apprezzabili dopo l'assunzione e dopo la sospensione in entrambe le sottopopolazioni.

Come mostrato in figura 7, le sottopopolazioni di linfociti T non variano in modo significativo dopo l'assunzione dei preparati probiotici o dopo la sospensione in tutti i tre gruppi di soggetti.

La popolazione delle cellule NK aumenta nel gruppo 1 sia dopo l'assunzione del probiotico Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo), sia dopo la sospensione (anche se in misura minore). Nel gruppo 2 la popolazione di cellule NK aumenta soprattutto dopo 7 giorni di sospensione (al T2) dall'assunzione del probiotico 5/5, mentre nel gruppo 3 non si osservano cambiamenti rilevanti.

La popolazione di cellule NKT non varia in modo apprezzabile nei tre gruppi al T1 o al T2, tranne che nel gruppo 2 dove si osserva un aumento sensibile della percentuale di cellule NKT dopo la sospensione. Le cellule NKT, possiedono il marcatore dei linfociti CD3, e il marcatore CD56. Possiedono attività regolatoria e svolgono un ruolo di collegamento tra l'immunità innata ed acquisita. (Figura 8)

Post-coltura 24 ore

Dopo 24 ore di coltura in presenza dei tre ceppi probiotici 5/5, Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) e Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo), è stata valutata la percentuale delle sottopopolazioni delle cellule dell'immunità innata, in particolare le cellule dendritiche e le cellule NK ed NKT.

Come mostrato nella figura 9, nel gruppo 1 le cellule dendritiche mieloidi CD11c+ aumentano dopo la sospensione al T2, in particolare nel basale (senza cioè la stimolazione in "in vitro" con i ceppi batterici). Nel gruppo 2 le cellule CD11c+ diminuiscono dopo l'assunzione del prodotto e dopo la sospensione in seguito a stimolazione "in vitro" con tutti i tre ceppi probiotici. Nel gruppo 3 non si osservano invece differenze apprezzabili.

Le cellule CD123, nel gruppo 1 non variano in modo apprezzabile dopo stimolazione "in vitro" con i ceppi batterici a tutti i tre tempi. Nel gruppo 2 le cellule dendritiche CD123+ aumentano dopo stimolazione in vitro con Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) al T0 e dopo sospensione al T2. Nel gruppo 3 aumentano dopo stimolazione "in vitro" con 5/5 e Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) al T2 (figura 10)

La popolazione di cellule NK dopo stimolazione con i ceppi batterici non subisce significative variazioni in tutti i tre gruppi sia prima dell'assunzione, sia dopo l'assunzione, sia dopo la sospensione dell'assunzione (figura 11).

Le cellule NKT subiscono variazioni rilevanti solo nel gruppo 2, che ha assunto il probiotico 5/5. In particolare si osserva l'aumento della percentuale di cellule NKT dopo la sospensione dell'assunzione del prodotto probiotico al T2 in condizioni basali (figura 12). La presenza "in vitro" dei ceppi probiotici non stimola in modo significativo la proliferazione delle cellule NKT negli altri gruppi.

Post-coltura 6 giorni

Dopo 6 giorni in coltura con i ceppi batterici è stata valutata la percentuale dei linfociti T dell'immunità acquisita.

In particolare i linfociti T CD4+ aumentano nei soggetti che hanno assunto il 5/5 (gruppo 2) in presenza di Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) "in vitro" sia dopo l'assunzione del prodotto (T1) sia dopo la sospensione (T2) (figura 13).

I linfociti TCD8+, che possiedono funzione citotossica, non subiscono significative variazioni dopo l'assunzione dei prodotti probiotici in tutti i tre gruppi di partecipanti o dopo la sospensione, come mostrato nella figura 14.

Attività Natural Killer

L'attività delle cellule Natural killer rappresenta una forma di difesa precoce contro infezioni intracellulari. Le cellule NK sono infatti in grado di riconoscere e uccidere cellule tumorali o infettate da virus. L'attività NK viene influenzata da diverse citochine come IL-12 e gli interferoni α e β prodotti durante le fasi precoci di molte infezioni. IL-12 può agire in sinergia con TNF-α e stimolare la produzione di IFN-γ da parte delle cellule NK. In questo modo l'attività delle cellule NK permette il controllo di alcune infezioni prima ancora che le cellule T siano state stimolate a produrre queste citochine.

L'attività delle cellule Natural Killer, misurata come percentuale di lisi delle cellule K562 utilizzate come target, ha mostrato un incremento nei soggetti che hanno assunto il prodotto Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) dopo i 21 giorni di assunzione, ma diminuisce dopo sospensione al T2. Nel gruppo 2 l'attività NK aumenta dopo assunzione del prodotto 5/5 e ulteriormente dopo i 7 giorni di assunzione, così come nel gruppo 3. La stimolazione dell'attività NK da parte del ceppo 5/5 e del ceppo di Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) si mantiene quindi anche dopo una settimana di sospensione (figura 15).

Produzione in vitro di citochine

La produzione di citochine è stata valutata sia dopo 24 ore, da parte delle cellule dell'immunità innata, sia dopo 6 giorni in coltura, da parte delle cellule dell'immunità acquisita.

Per le citochine IL-10, IFN-γ, TNF-α è stato calcolato l'incremento percentuale della produzione in presenza dei tre ceppi batterici "in vitro", per IL-12 sono stati invece riportati i valori di concentrazione espressi in pg/ml.

IL-10

IL-10 è una citochina con effetti pleiotropici prodotta da cellule Th1, ma anche da cellule dell'immunità innata come le cellule dendritiche e favorisce il differenziamento dei linfociti T naïve in T regolatori Th1 e Th3.

Prodotta anche da macrofagi e monociti, IL-10 inibisce l'espressione di citochine Th1, antigeni MHC di classe II e di molecole costimolatorie sui macrofagi e viene riconosciuta come citochina regolatoria, in quanto influenza la produzione di diverse citochine IFN-γ, IL-2, IL-3, GM-CSF e la capacità delle APC di presentare l'antigene e agisce in sinergia con TNF-α stimolando l'attività delle cellule NK (12). Inoltre IL-10 è in grado di

influenzare anche la risposta acquista aumentando la sopravvivenza e la proliferazione di cellule B e la produzione di anticorpi.

Dopo 24 ore in coltura la produzione di IL-10 aumenta nei soggetti che hanno assunto il Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) (gruppo 1), aumenta dopo l'assunzione e in presenza "in vitro" del Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) e dello stesso Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo). Tale aumento è maggiore dopo i 7 giorni di sospensione, a seguito della stimolazione con i medesimi batteri Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) e Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo).

Nel gruppo 2, l'assunzione del prodotto 5/5 inibisce la produzione di IL-10 a seguito della stimolazione "in vitro" con i tre ceppi batterici, che al T0 è maggiormente stimolata da Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo).

Nel gruppo 3, l'assunzione di Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo), stimola la produzione di IL-10 a seguito della presenza "in vitro" di tutti i tre ceppi batterici, in particolare al T2 (figure 16, 17, 18).

Dopo 6 giorni in coltura, nel gruppo 1, le cellule dell'immunità innata producono maggiormente IL-10 in presenza dello stesso Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo), dopo i 21 giorni di assunzione. Nel gruppo 2, in presenza "in vitro" di 5/5, del Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) e Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) dopo l'assunzione di 5/5. La stimolazione si mantiene anche dopo 7 giorni di sospensione dell'assunzione di 5/5.

Analogamente le cellule dell'immunità innata reagiscono in presenza del Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) (gruppo 3) aumentando la produzione di IL-10 sia al T1 che al T2 in presenza "in vitro" dei tre ceppi batterici (figure 19, 20, 21).

TNF-α

TNF-α è una citochina coinvolta nei processi di infiammazione sistemica e partecipa alla reazione di fase acuta dell'infiammazione. TNF-α è in grado di indurre apoptosi, regola la proliferazione cellulare, il differenziamento, il processo di tumorigenesi e svolge un ruolo regolatorio sull'attività delle cellule del sistema immune. TNF-α è prodotto prevalentemente dai macrofagi, ma anche da una grande varietà di cellule linfoidi, mastcellule, cellule endoteliali, cardiomiociti, cellule del tessuto adiposo, fibroblasti e cellule del tessuto nervoso.

Dopo 24 ore la produzione di TNF-α prodotto nei surnatanti di coltura dei linfociti dei volontari che hanno assunto il probiotico Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) (gruppo 1), viene stimolata solo al T2 in particolare in risposta al Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo).

Nel gruppo 2, l'assunzione di 5/5 inibisce la produzione di TNF-α stimolata da 5/5, Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) e Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) "in vitro" sia al T1 che al T2.

Nel gruppo 3 la produzione di TNF-α aumenta in seguito all'assunzione del Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) e per stimolazione "in vitro" con i tre ceppi batterici, anche dopo la sospensione al T2 (figure 22, 23, 24).

Dopo 6 giorni, nel gruppo 1 si osserva l'aumento della produzione di TNF-α dopo assunzione (T1) in risposta alla stimolazione "in vitro" con lo stesso Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo). Nel gruppo 2, TNF-α aumenta solo dopo la sospensione, in seguito a stimolazione con Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) (figure 25, 26, 27).

IFN-γ

IFN-γ è una glicoprotreina omodimerica sintetizzata e rilasciata dai linfociti T CD8 e dai linfociti CD4 con profilo Th1 o Th0 dopo stimolazione antigenica o policlonale, nonché dalle cellule Natural Killer (NK). In quest'ultimo tipo cellulare, la produzione di IFN-γ è indotta da IL-2 e IL-12. Oltre ad una discreta attività anti-virale e anti-proliferativa, IFN-γ esercita una potente azione immunomodulatoria. Nei monociti, IFN-γ aumenta l'espressione di molecole di adesione, la capacità di endocitosi e fagocitosi, la produzione di TNF-α e di radicali dell'ossigeno, l'espressione degli antigeni MHC di classe I e II nonché del recettore ad alta affinità per il frammento Fc delle IgG (CD64). Inoltre IFN-γ induce la proliferazione di linfociti B e la produzione di alcune classi di Immunoglobuline e induce il differenziamento dei linfociti T naïve in Th1, inibendo la proliferazione delle cellule Th2.

Dopo 24 ore in coltura, nel gruppo 1 che ha assunto il Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo), la produzione di IFN-γ aumenta al T1 dopo stimolazione "in vitro" con Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) e soprattutto Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo).

Nel gruppo 2, prima dell'assunzione si osserva la stimolazione della produzione di IFN-γ in risposta a Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo). L'assunzione di 5/5 inibisce la produzione di IFN-γ immediatamente dopo l'assunzione in risposta ai tre ceppi batterici al T1, mentre al T2 dopo la sospensione la produzione aumenta in risposta allo stesso 5/5 e a Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo).

Nel gruppo 3, si osserva l'aumento della produzione di IFN-γ dopo 21 giorni di assunzione del Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) a seguito della risposta "in vitro" a Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) (figure 28, 29, 30).

Dopo 6 giorni in coltura la produzione di IFN-γ nel gruppo 1 aumenta dopo l'assunzione del probiotico Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) a seguito della stimolazione "in vitro" con lo stesso Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo).

Nel gruppo 2, l'assunzione di 5/5 sembra inibire la produzione di IFN-γ dopo stimolazione con i tre ceppi al T1, mentre dopo 7 giorni di sospensione la produzione aumenta di nuovo, in particolare dopo stimolazione con lo stesso 5/5.

Nel gruppo 3, l'assunzione del Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) inibisce la produzione di IFN-γ al T1, mentre dopo i 7 giorni di sospensione la produzione di IFN-γ aumenta in particolare in risposta al Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) e Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) (figure 31, 32, 33).

IL-12

IL-12 viene prodotta da cellule dendritiche, macrofagi e cellule B linfoblastoidi (NC-37). E' coinvolta nella stimolazione della produzione di IFN-γ e TNF-α da parte di linfociti T-citotossici e cellule NK, favorendone l'attività citotossica, e nell'induzione al differenziamento dei linfociti T Naive in Th1 (importante per la resistenza ai patogeni). IL-12 è in grado di ridurre la produzione di IL-4 e possiede anche attività anti-angiogenica (attività anti-cancro) (13).

Per quanto riguarda la produzione di IL-12, abbiamo espresso i risultati in termini di concentrazioni in pg/ml, in quanto IL-12 viene prodotta in concentrazioni molto basse e le variazioni sono poco apprezzabili come incremento percentuale. Dalla figura 34 è possibile osservare che dopo 24 ore in coltura, nel gruppo 1 IL-12 subisce un decremento dopo assunzione di Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo), ma dopo 7 giorni di sospensione la produzione aumenta soprattutto in risposta allo stesso Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo).

Nel gruppo 2 la produzione di IL-12 aumenta in risposta a tutti i tre ceppi batterici sia dopo 21 giorni di assunzione di 5/5 sia dopo 7 giorni di sospensione.

Nel gruppo 3 si osserva un decremento della produzione di IL-12 dopo stimolazione "in vitro" con Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) al T1 e un aumento dopo stimolazione con Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) al T2 (figura 34).

Dopo 6 giorni la produzione di IL-12 nel gruppo 1 aumenta al T1 e al T2 dopo stimolazione "in vitro" con Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo), mentre diminuisce dopo stimolazione con 5/5 e Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) al T1.

Nel gruppo 2, l'assunzione di 5/5, stimola la produzione di IL-12 in risposta a 5/5, Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo), Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo) anche dopo la sospensione di 7 giorni al T2.

Nel gruppo 3, l'assunzione del Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) stimola la produzione di IL-12 dopo 21 giorni in condizioni basali, la produzione in risposta a 5/5 e Lactobacillus rhamnosus CBA-L65 (ceppo controllo) è ridotta, mentre IL-12 aumenta al T2 dopo sospensione in risposta a Lactobacillus paracasei CBA-L66 (ceppo controllo).

BIBLIOGRAFIA:

1. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Imaoka A, Itoh K. Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. Infect Immun. 1999;67:3504-11.
2. Ichiki, Y.; Bowlus, C. L.; Shimoda, S.; Ishibashi, H.; Vierling, J.M. ; Gershwin, M.E. T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). Autoimmunity Rev. 5 (1–9), 2006.
3. Kelly, D. ; Conway, S.; Aminov, R. *Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation.* Trends in Immunology, 2005; 26: 326-333.
4. Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potentiale pharmaceutical applications. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2002; 15:1-9.
5. Annuk H, Hynes SO, Hirmo S, Mikelsaar M, Wadstrom T. Characterization and differentation of lactobacilli by lectin typing. 2001; 50: 1069-74.

6. Saito T. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria for the *Lactobacillus acidophilus* group and their application to functional food. Animal Science Journal 2004 ; 75 : 1-3.
7. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy - a randomised, double-blind, placebo-controlled study. Br J Nutr. 2008 Nov 6:1-5.
8. Giovannini M, Agostoni C, Riva E, Salvini F, Ruscitto A, Zuccotti GV, Radaelli G; Felicita Study Group. A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing Lactobacillus casei in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. Pediatr Res. 2007 Aug;62(2):215-20
9. Carol M, Borruel N, Antolin M, Llopis M, Casellas F, Guarner F, Malagelada JR. Modulation of apoptosis in intestinal lymphocytes by a probiotic bacteria in Crohn's disease. J Leukoc Biol. 2006; 79(5):917-22.
10. Castellazzi AM, Maccario R, Moretta A, De Amici M, Gasparoni A, Chirirco G, Rondini G. Effect of active and passive smoking during pregnancy on natural killer cell activity in infants. J Allergy Clin Immunol 1999;103:172,3.
11. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. Immunol Rev. 2008 Jun;223:114-31.
12. Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, Kou D, Itoh J, Binion DG, Levine AD, Blumberg RS, Fiocchi C. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. Gut. 2007 Dec;56(12):1696-705. Epub 2007 Aug 6
13. Di Cello F. & Fani R. (1996) A molecular strategy for the study of natural bacterial communities by PCR-based techniques. Minerva Biotecnol. 8:126–134.
14. Tosi L, Berruti G, Danielsen M. et al. (2007). Susceptibility of Streptococcus thermophilus antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek 92(1): 21-28.
15. Ward L.J.H. & Timmins M.J. (1999) Differentiation of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol 29:90–92.
16. Gevers D, Huys G, Swings J (2001) Applicability of rep-PCR ¢ngerprinting for identi¢cation of Lactobacillus species. FEMS Microbiology Letters 205:31-36.

RIVENDICAZIONI

1. Microorganismo probiotico caratterizzato dall'essere costituito da Lactobacillus rhamnosus CBA-L64, depositato secondo il Trattato di Budapest presso il Centro BCCM/LMG con numero LMG P-27358.

2. Il microrganismo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto di essere presente sotto forma di coltura biologica pura.

3. Il microrganismo secondo la rivendicazione 1 o 2 caratterizzato dal fatto di essere isolato.

4. Il microrganismo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto di essere sotto forma di cellule vitali.

5. Una composizione comprendente il microorganismo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in concentrazione immunostimolante, e eccipienti e/o diluenti fisiologicamente accettabili.

6. Composizione secondo la rivendicazione 5, in forma liofilizzata.

7. Composizione secondo le rivendicazioni 5 o 6 in forma di integratore dietetico o alimentare.

8. Prodotto alimentare comprendente il microorganismo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4.

9. Prodotto alimentare secondo la rivendicazione 8, comprendente: latte, yogurt, formaggio, latte in polvere, cereali e derivati, zuppe in forma disidratata, derivati, succhi e bevande di frutta e/o alimenti per specifici usi nutrizionali.

10. Composizione farmaceutica comprendente il microorganismo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in concentrazione immunostimolante, e eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili.

11. Il microorganismo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 per uso medico.

12. Il microorganismo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 per uso nella stimolazione dell'immunità acquisita e/o naturale, e/o nella prevenzione/trattamento di asma, e/o nella prevenzione/trattamento di disturbi gastrointestinali, e/o nell'eliminazione/modulazione dei principali patogeni digestivi e/o nel contenimento dei processi infiammatori a livello intestinale.

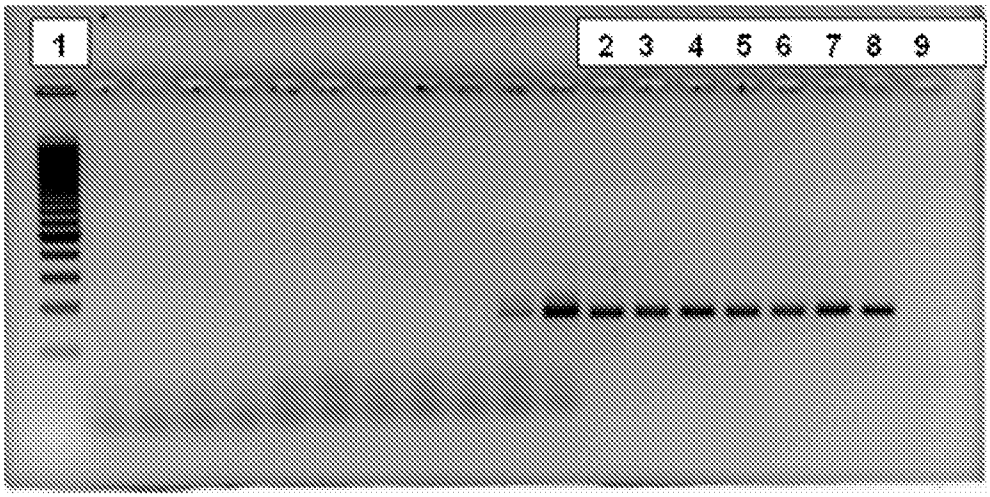


Fig.1

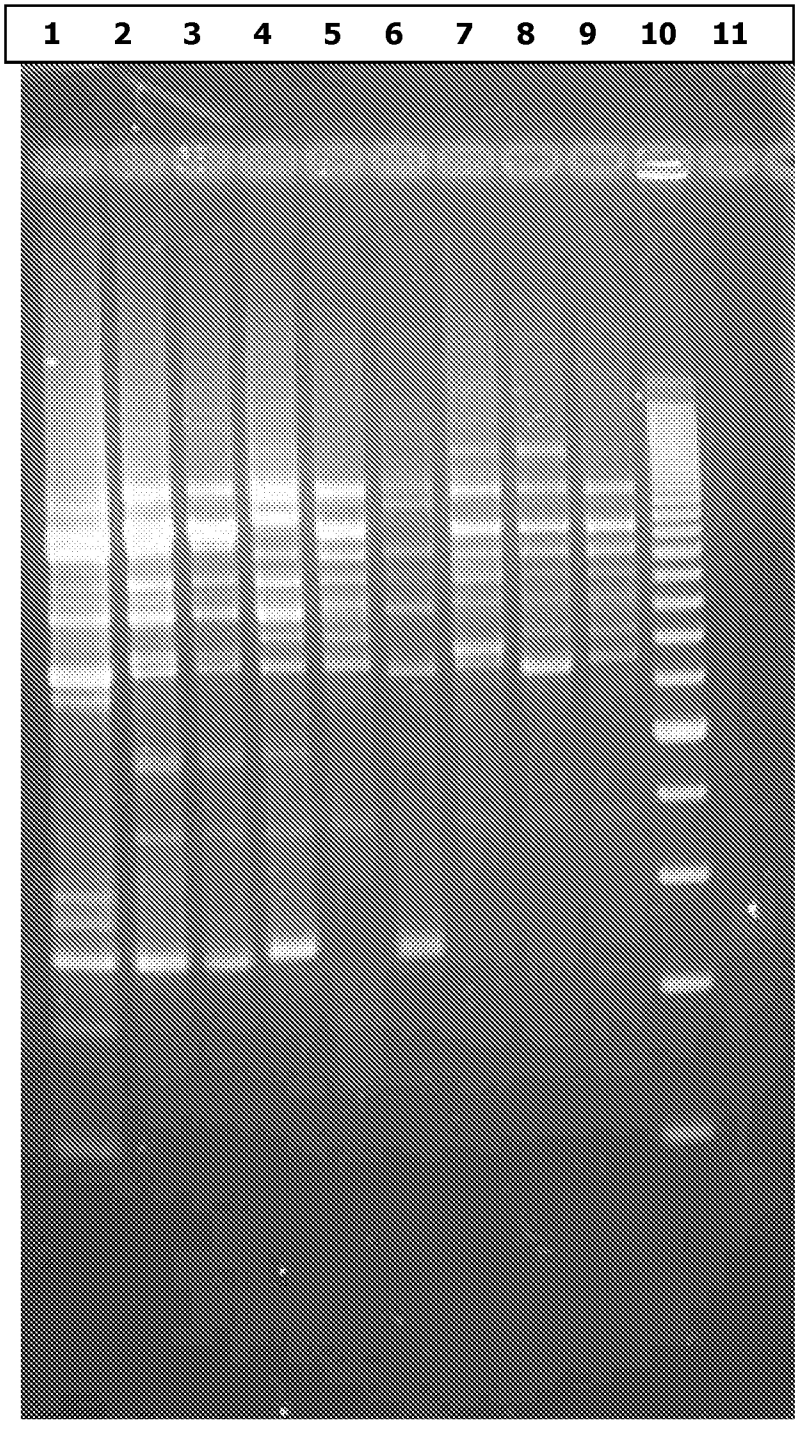


Fig.2

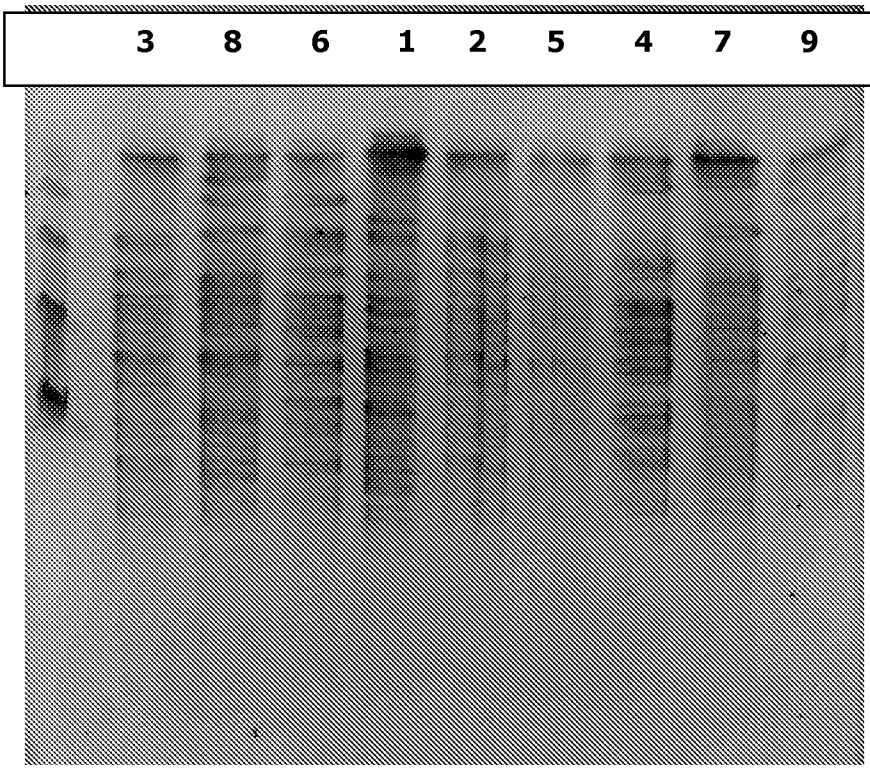


Fig.3

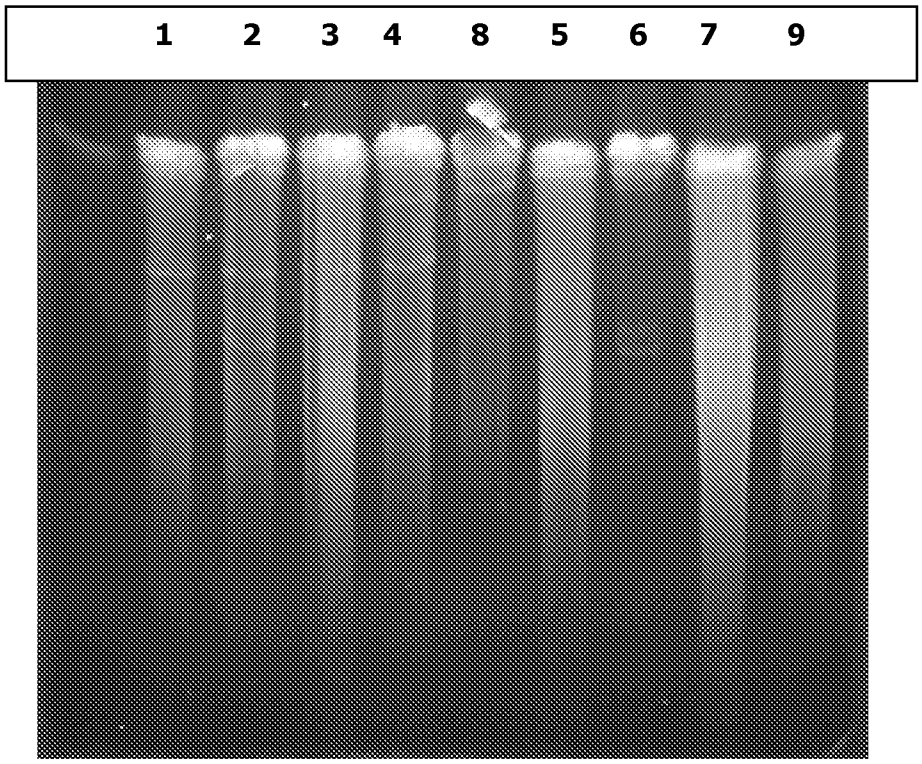


Fig. 4

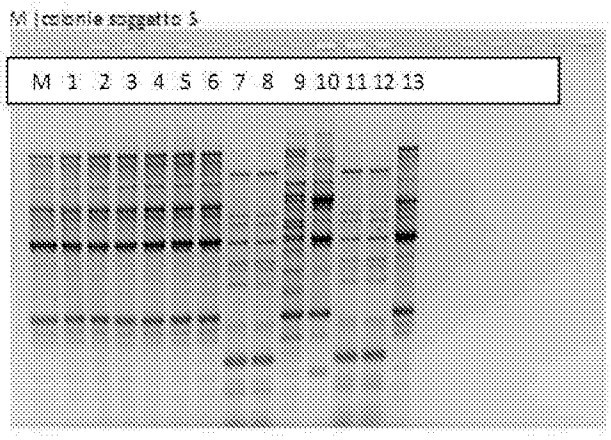


Fig. 5

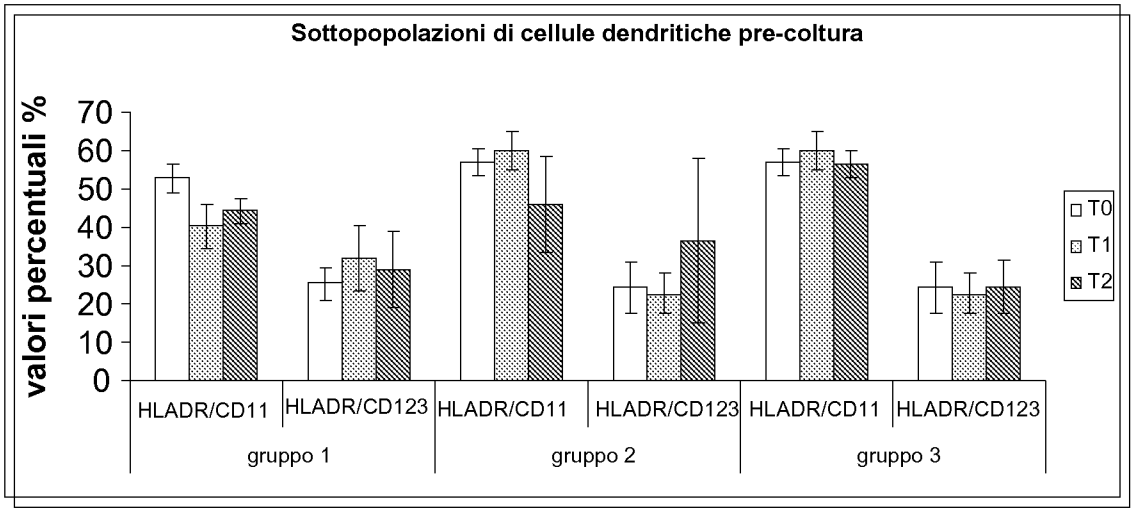

Sottopopolazioni di cellule dendritiche pre-coltura
valori percentuali %
70
60
50
40
30
20
10
0
HLADR/CD11
HLADR/CD123
HLADR/CD11
HLADR/CD123
HLADR/CD11
HLADR/CD123
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
T0
T1
T2

Fig. 6

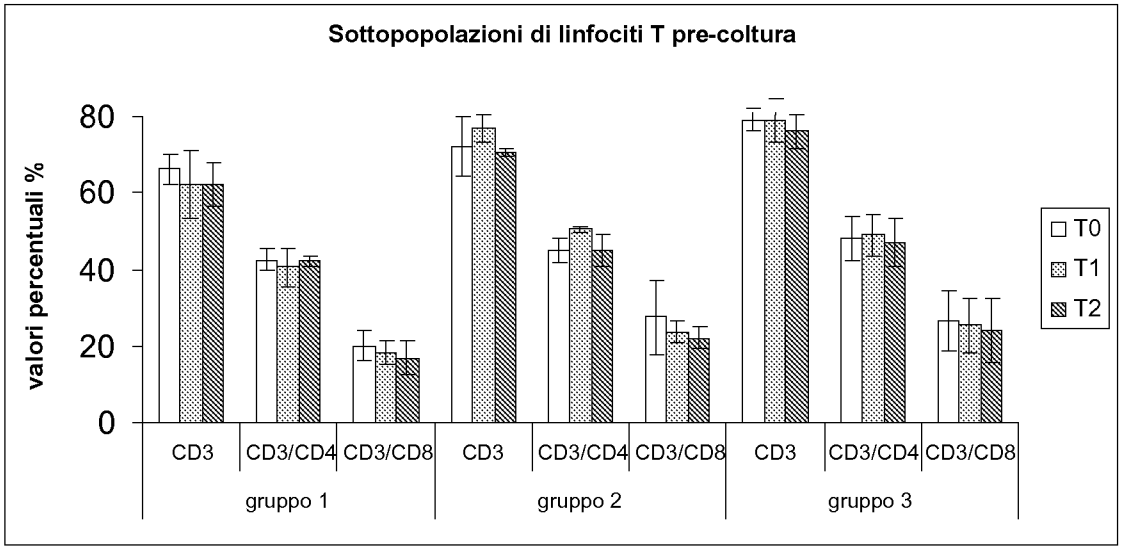

Sottopopolazioni di linfociti T pre-coltura
valori percentuali %
80
60
40
20
0
CD3
CD3/CD4
CD3/CD8
CD3
CD3/CD4
CD3/CD8
CD3
CD3/CD4
CD3/CD8
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
T0
T1
T2

Fig. 7

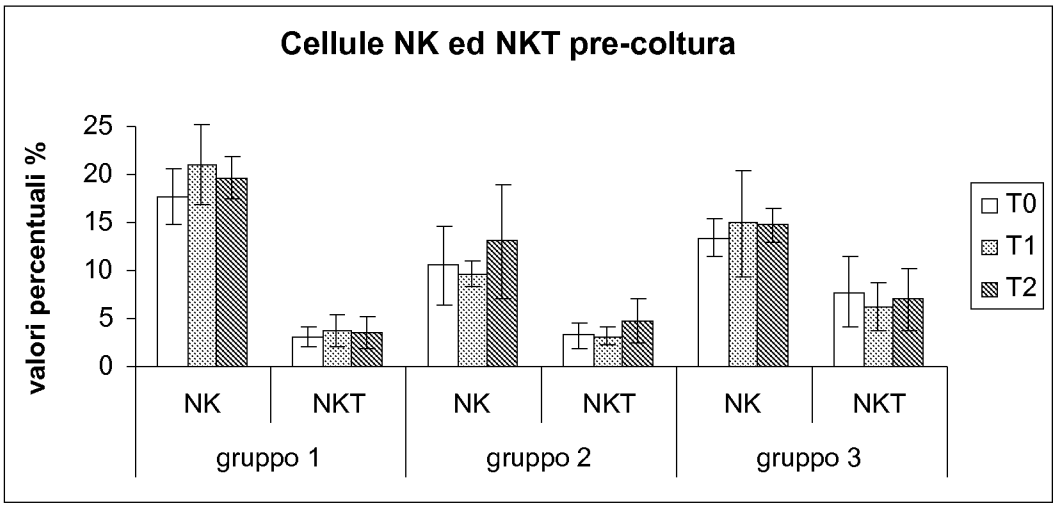

Cellule NK ed NKT pre-coltura
valori percentuali %
25
20
15
10
5
0
NK
NKT
NK
NKT
NK
NKT
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
T0
T1
T2

Fig.8

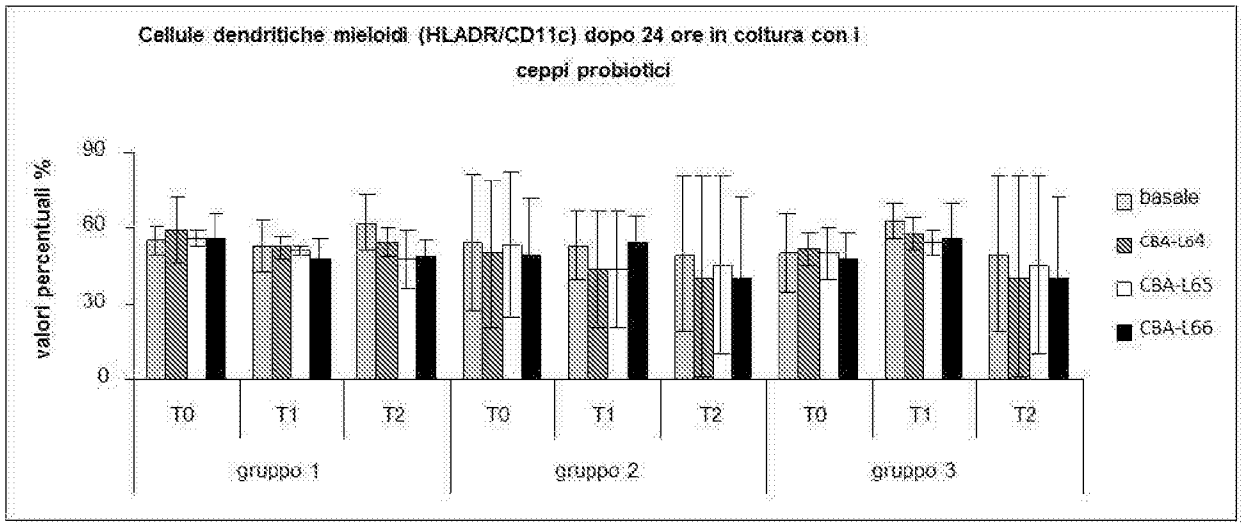

Cellule dendritiche mieloidi (HLADR/CD11c) dopo 24 ore in coltura con i ceppi probiotici
valori percentuali %
90
60
30
0
T0
T1
T2
T0
T1
T2
T0
T1
T2
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
basale
CBA-L64
CBA-L65
CBA-L66

Fig.9

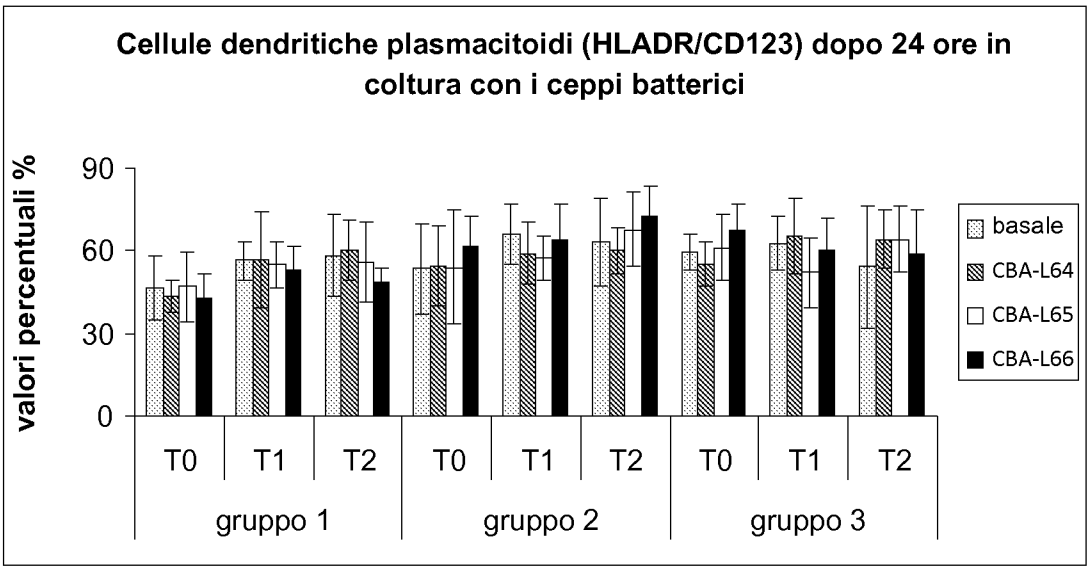

Cellule dendritiche plasmacitoidi (HLADR/CD123) dopo 24 ore in coltura con i ceppi batterici
valori percentuali %
90
60
30
0
T0
T1
T2
T0
T1
T2
T0
T1
T2
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
basale
CBA-L64
CBA-L65
CBA-L66

Fig.10

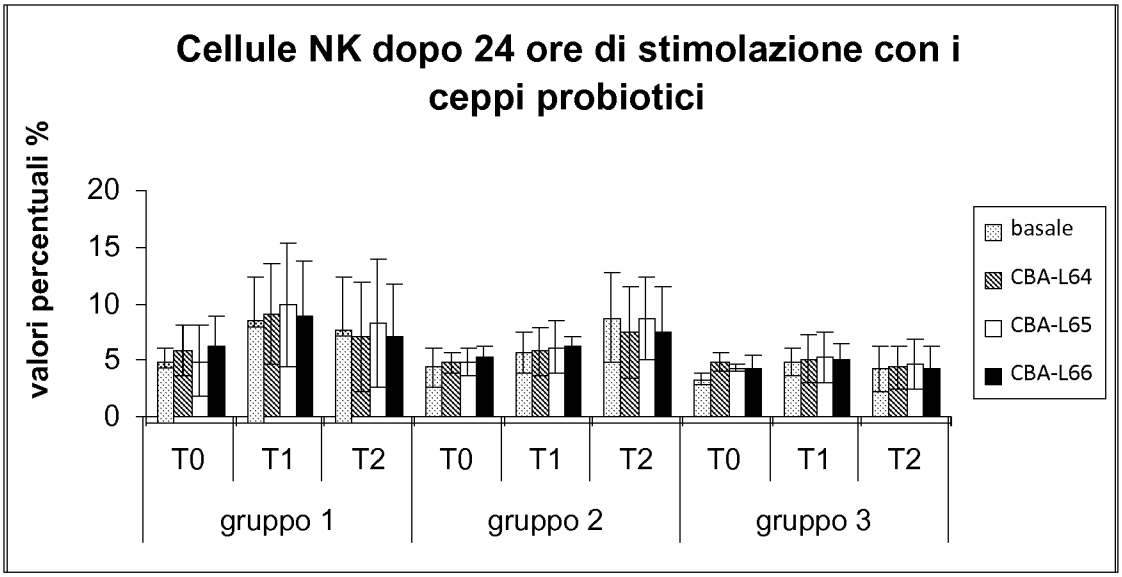

Cellule NK dopo 24 ore di stimolazione con i ceppi probiotici
valori percentuali %
20
15
10
5
0
T0
T1
T2
T0
T1
T2
T0
T1
T2
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
basale
CBA-L64
CBA-L65
CBA-L66

Fig.11

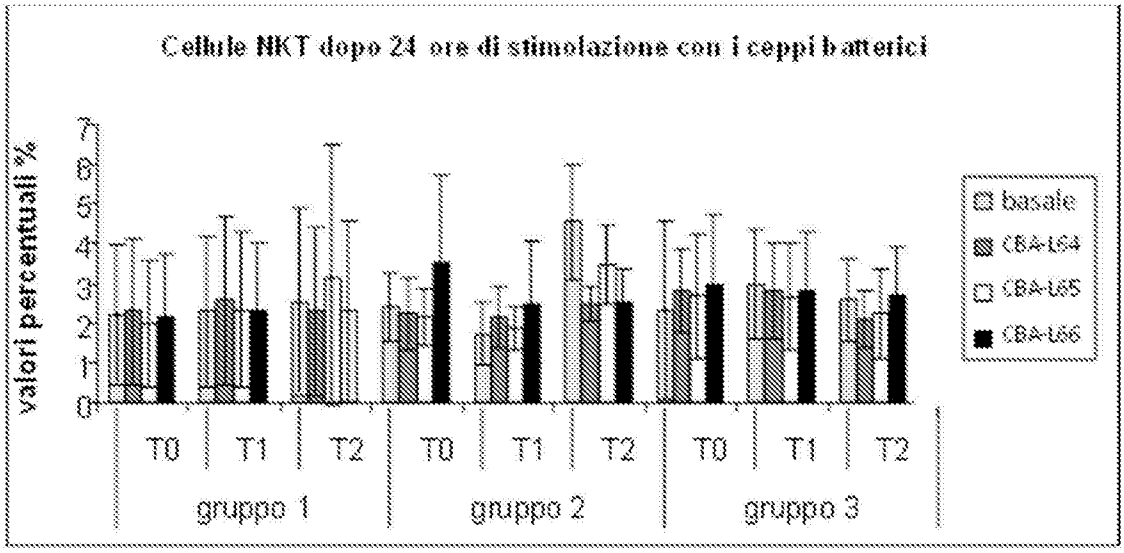

Cellule NKT dopo 24 ore di stimolazione con i ceppi batterici
valori percentuali %
0
1
2
3
4
5
6
7
T0
T1
T2
T0
T1
T2
T0
T1
T2
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
basale
CBA-L64
CBA-L65
CBA-L66

Fig.12

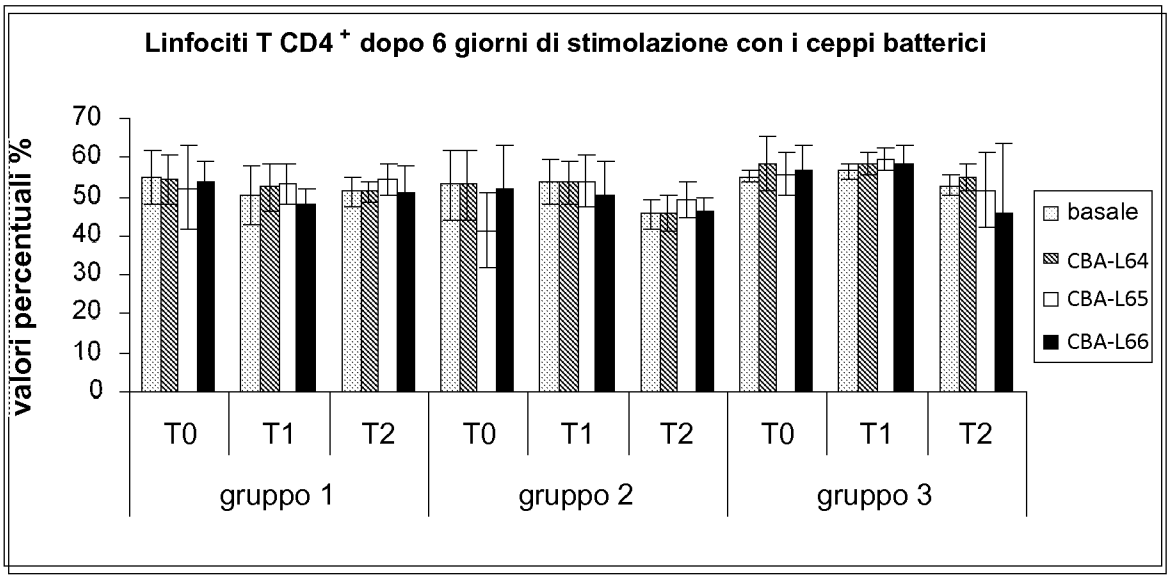

Linfociti T CD4 + dopo 6 giorni di stimolazione con i ceppi batterici
valori percentuali %
0
10
20
30
40
50
60
70
T0
T1
T2
T0
T1
T2
T0
T1
T2
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
basale
CBA-L64
CBA-L65
CBA-L66

Fig. 13

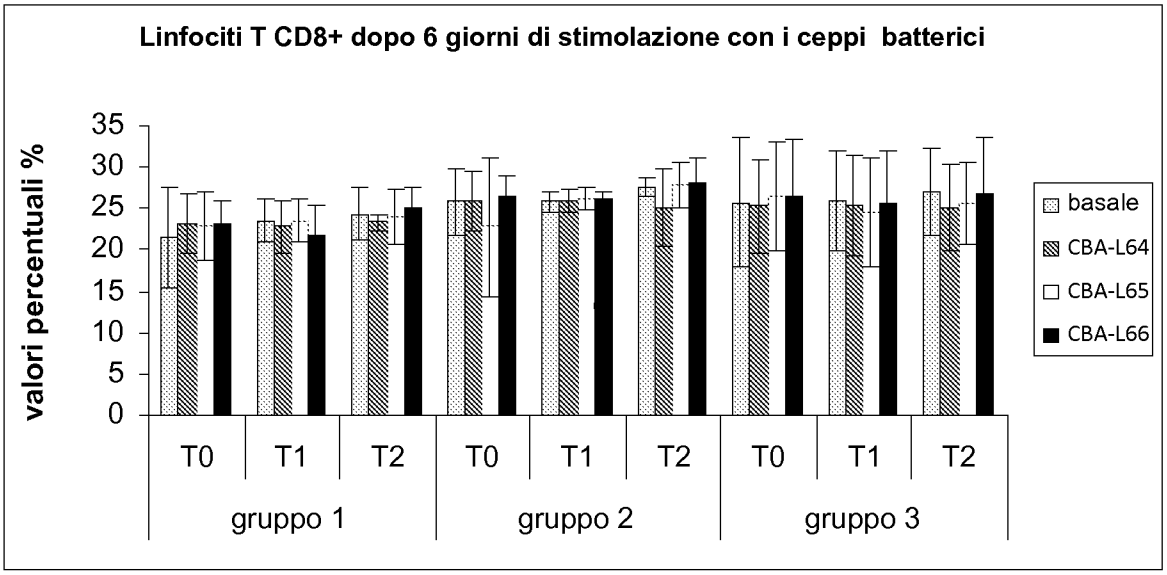

Linfociti T CD8+ dopo 6 giorni di stimolazione con i ceppi batterici
valori percentuali %
35
30
25
20
15
10
5
0
T0
T1
T2
T0
T1
T2
T0
T1
T2
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
basale
CBA-L64
CBA-L65
CBA-L66

Fig. 14

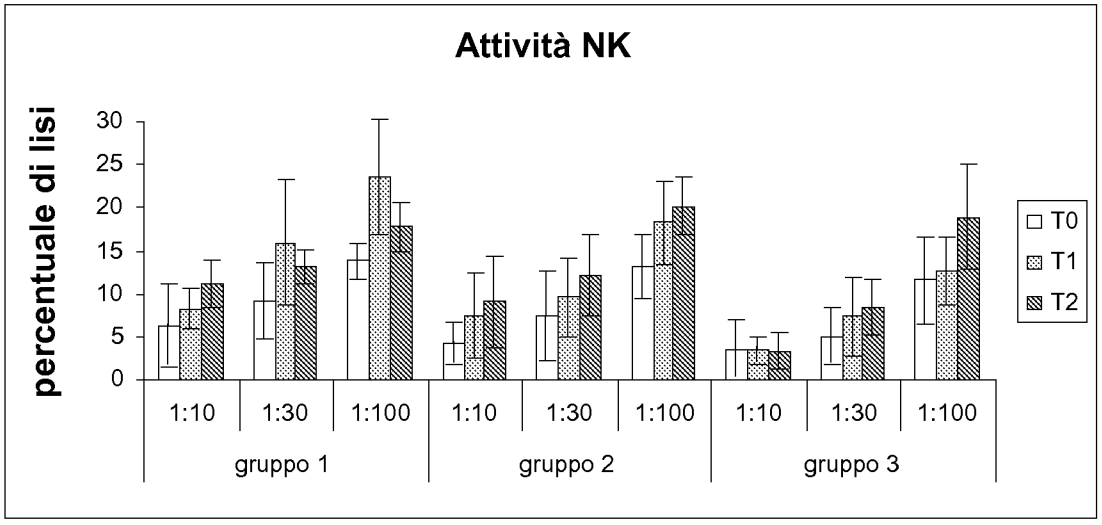

Attività NK
percentuale di lisi
30
25
20
15
10
5
0
1:10
1:30
1:100
1:10
1:30
1:100
1:10
1:30
1:100
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
T0
T1
T2

Fig. 15

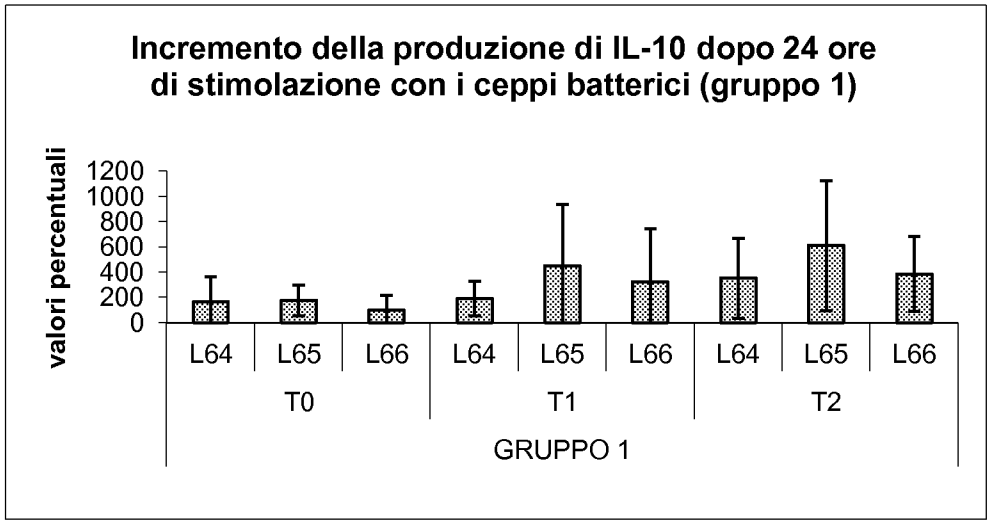

Incremento della produzione di IL-10 dopo 24 ore di stimolazione con i ceppi batterici (gruppo 1)
valori percentuali
1200
1000
800
600
400
200
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 1

Fig. 16

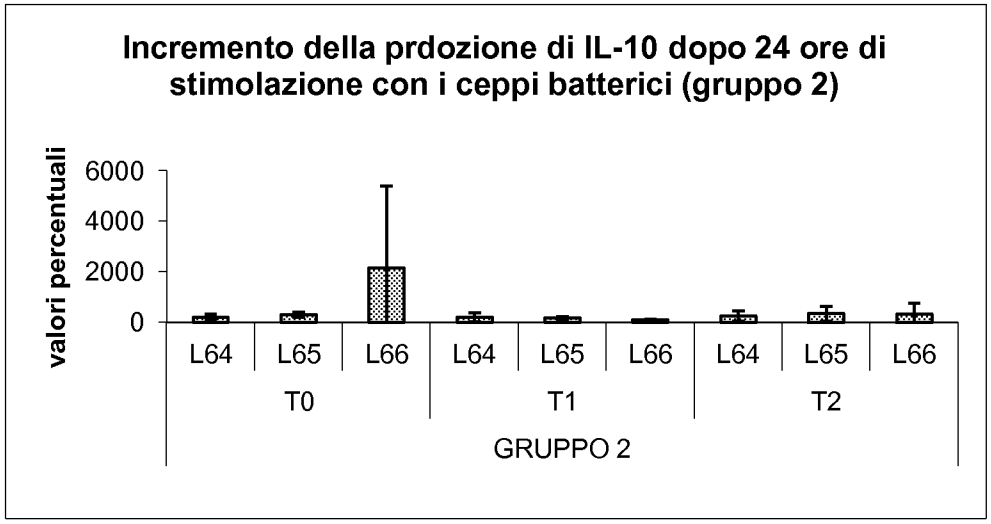

Incremento della prdozione di IL-10 dopo 24 ore di stimolazione con i ceppi batterici (gruppo 2)
valori percentuali
6000
4000
2000
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 2

Fig. 17

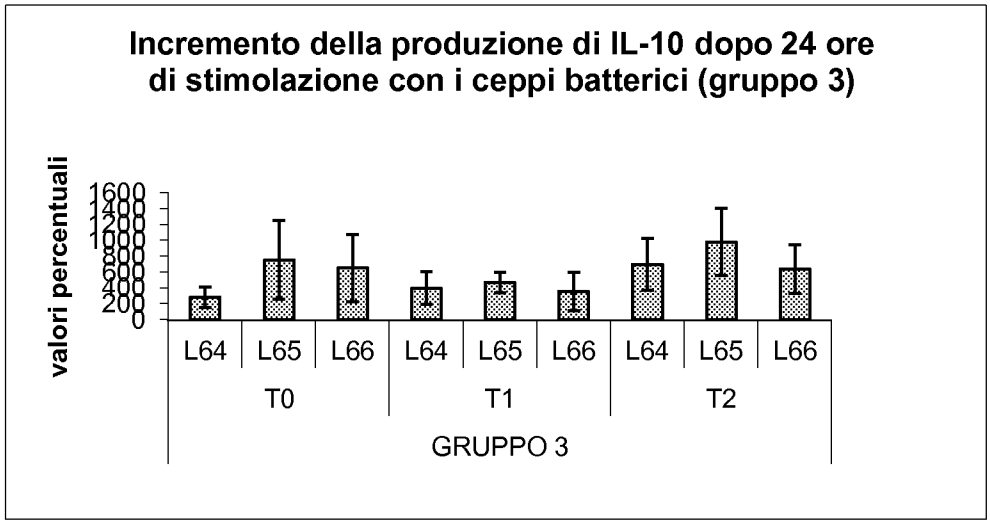

Incremento della produzione di IL-10 dopo 24 ore
di stimolazione con i ceppi batterici (gruppo 3)
valori percentuali
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 3

Fig. 18

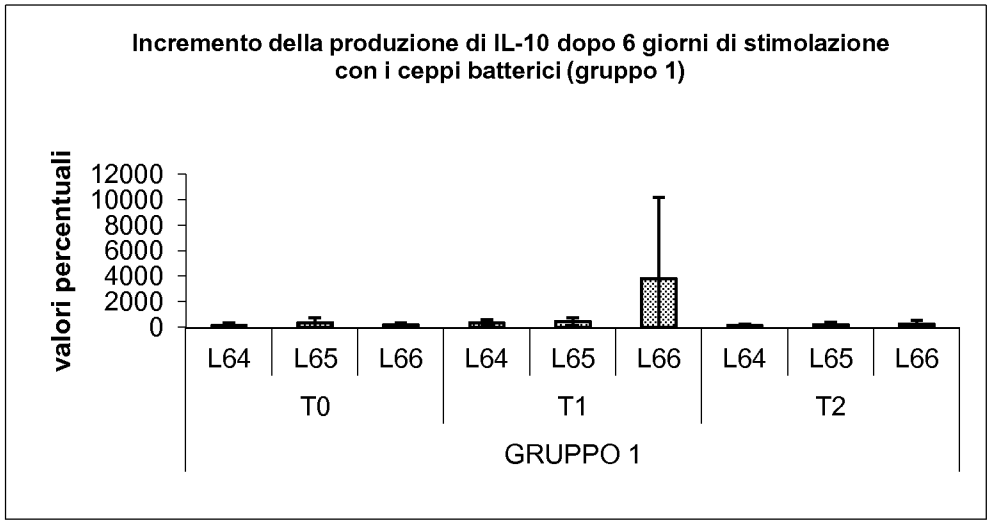


Fig. 19

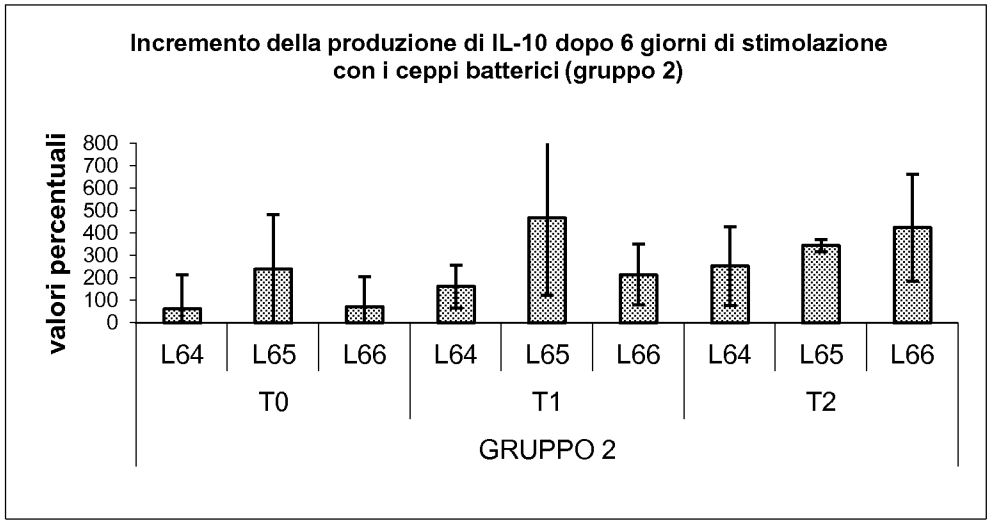


Fig. 20

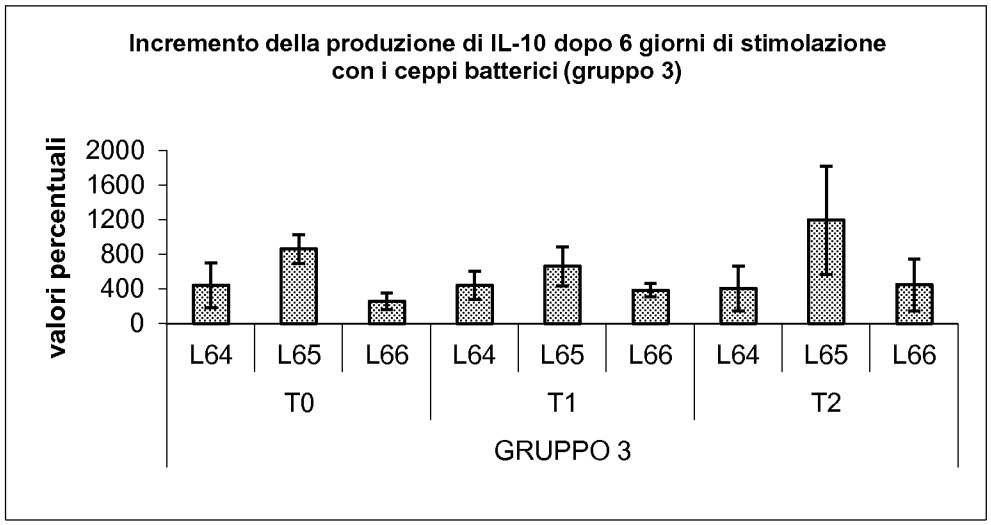


Fig. 21

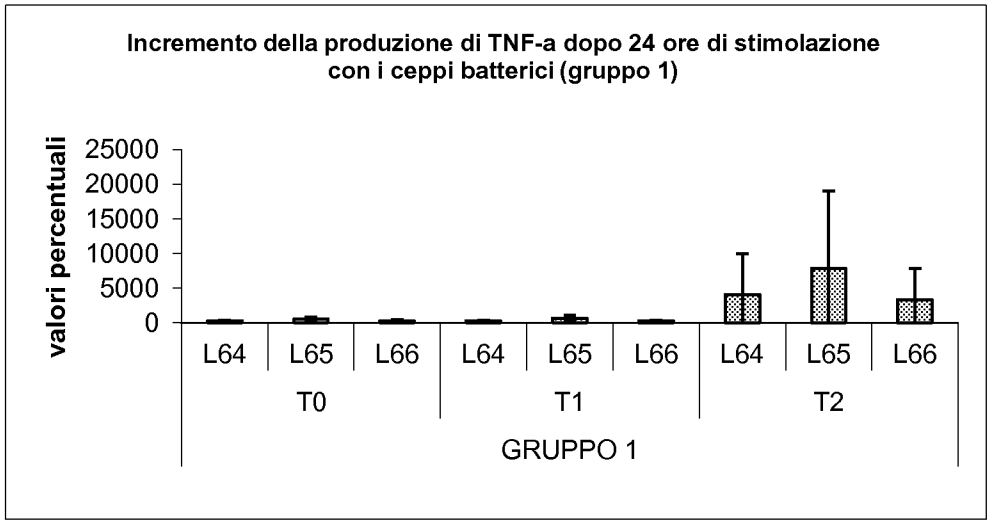


Fig. 22

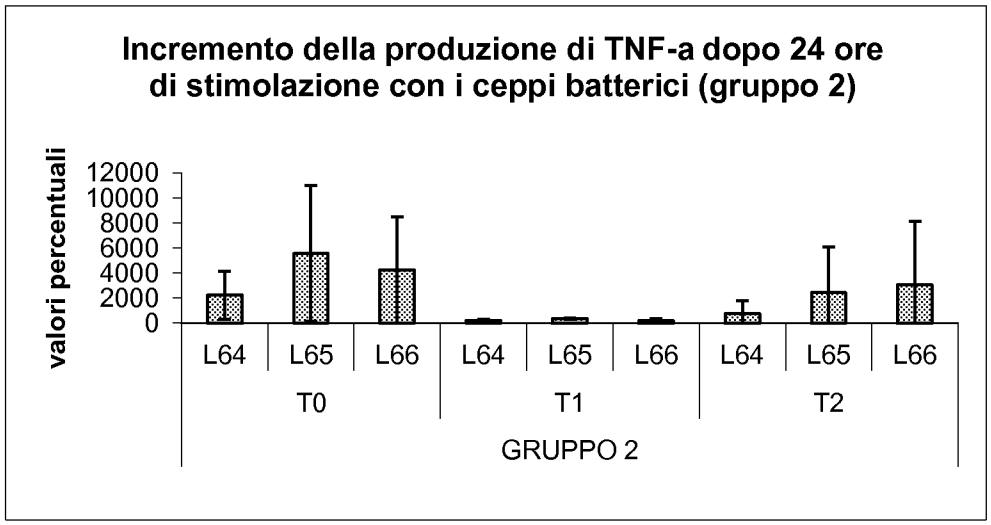


Fig. 23

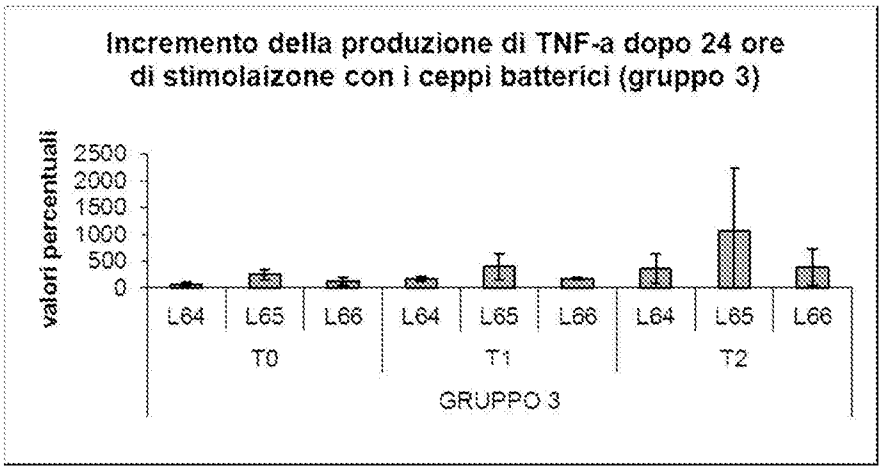


Fig. 24

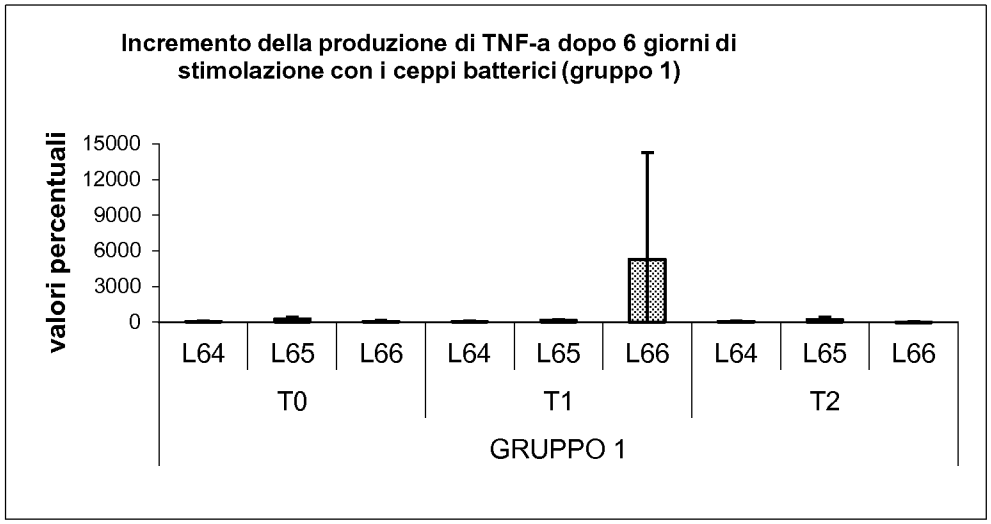


Fig. 25

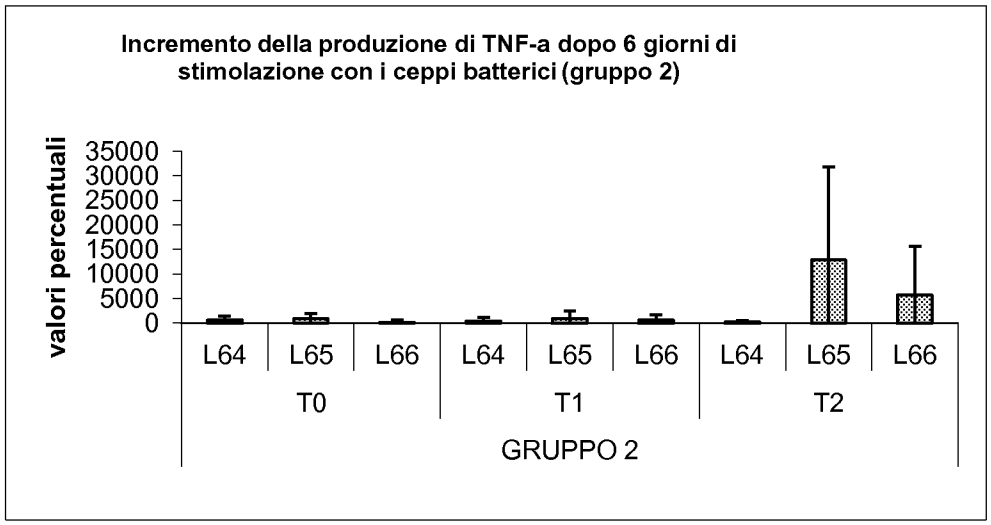


Fig. 26

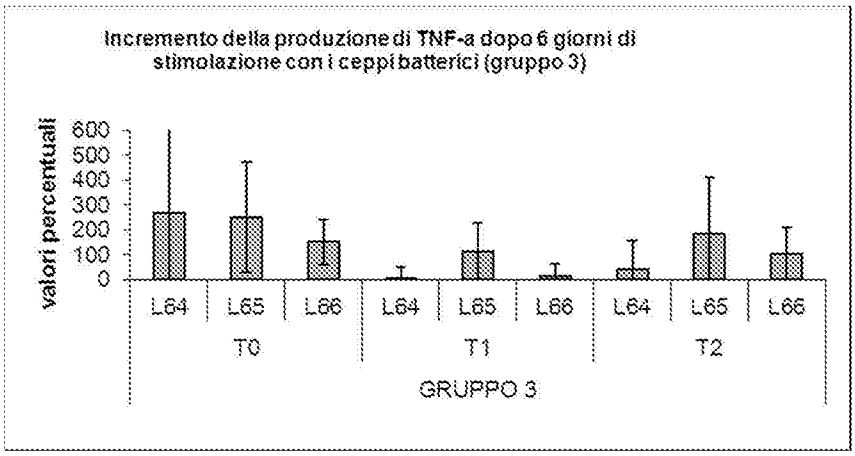


Fig. 27

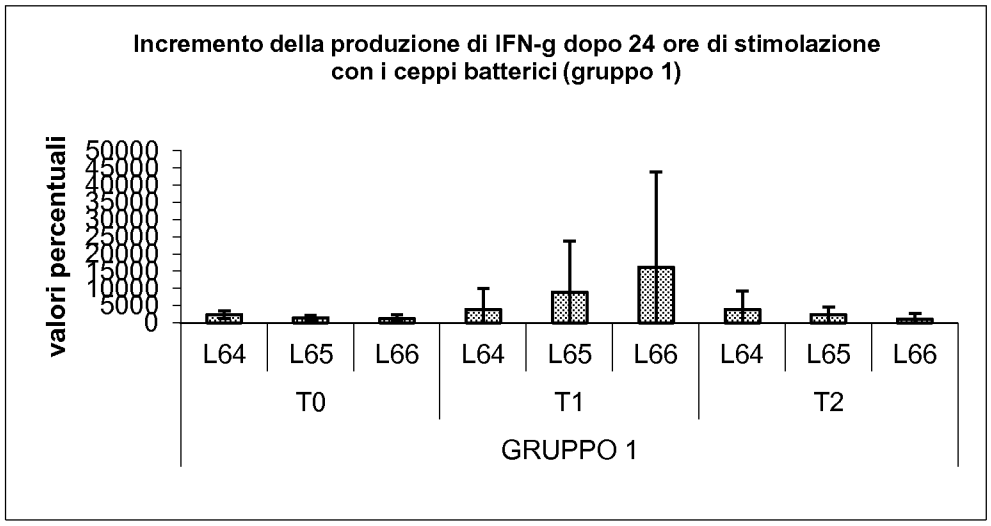

Incremento della produzione di IFN-g dopo 24 ore di stimolazione con i ceppi batterici (gruppo 1)
valori percentuali
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 1

Fig. 28

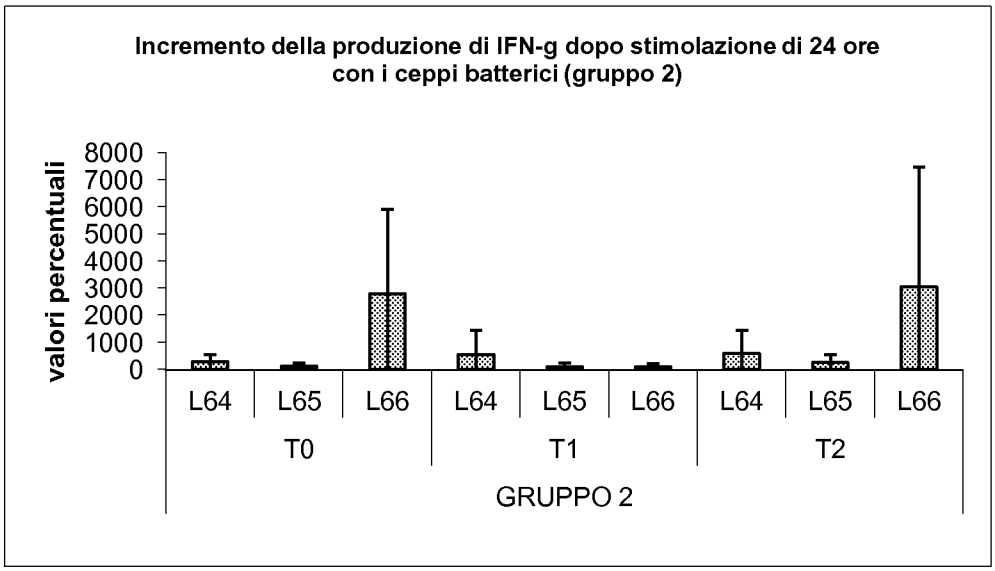

Incremento della produzione di IFN-g dopo stimolazione di 24 ore con i ceppi batterici (gruppo 2)
valori percentuali
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 2

Fig. 29

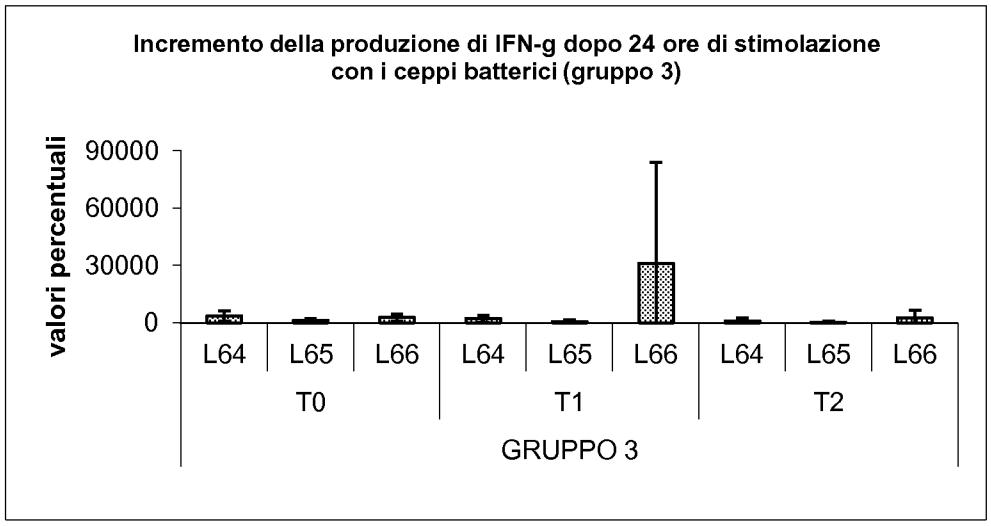

Incremento della produzione di IFN-g dopo 24 ore di stimolazione con i ceppi batterici (gruppo 3)
valori percentuali
90000
60000
30000
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 3

Fig. 30

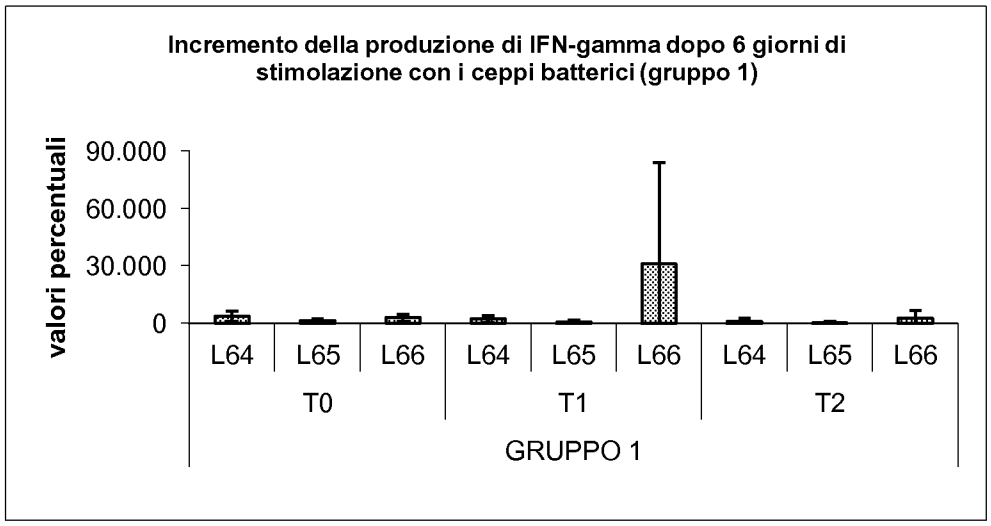

Incremento della produzione di IFN-gamma dopo 6 giorni di stimolazione con i ceppi batterici (gruppo 1)
valori percentuali
90.000
60.000
30.000
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 1

Fig. 31

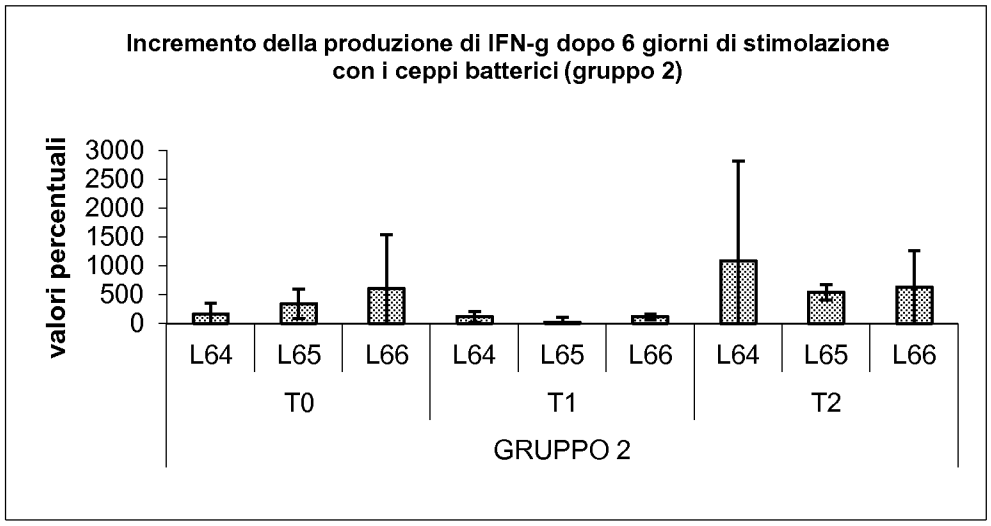

Incremento della produzione di IFN-g dopo 6 giorni di stimolazione con i ceppi batterici (gruppo 2)
valori percentuali
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 2

Fig. 32

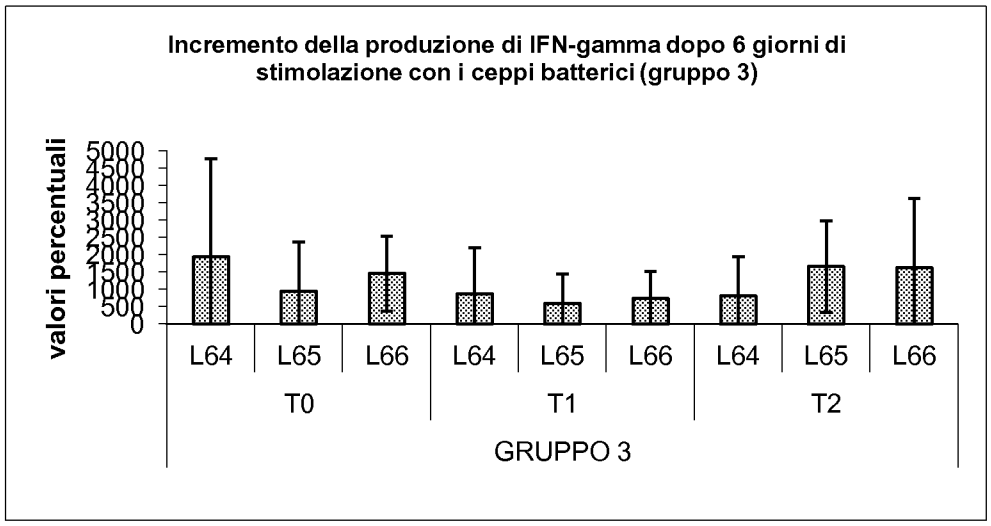

Incremento della produzione di IFN-gamma dopo 6 giorni di stimolazione con i ceppi batterici (gruppo 3)
valori percentuali
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
L64
L65
L66
L64
L65
L66
L64
L65
L66
T0
T1
T2
GRUPPO 3

Fig. 33

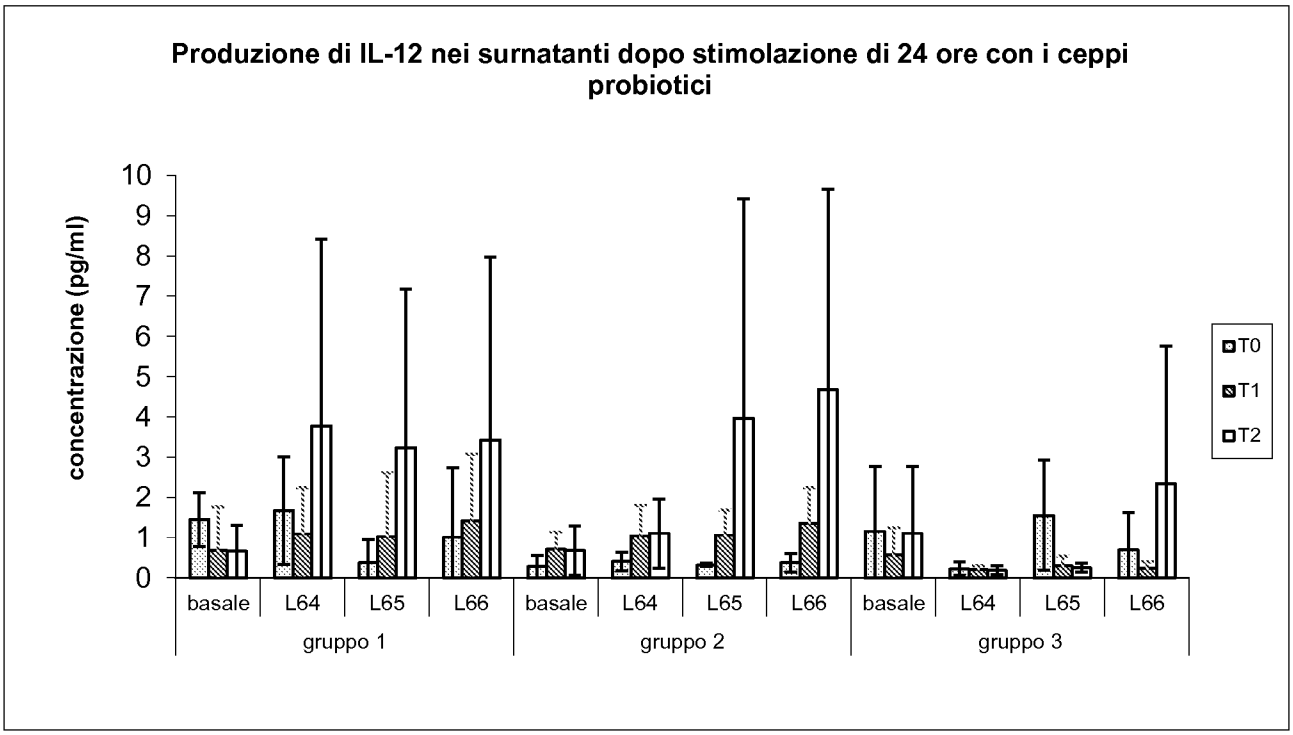

Produzione di IL-12 nei surnatanti dopo stimolazione di 24 ore con i ceppi probiotici
concentrazione (pg/ml)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
basale
L64
L65
L66
gruppo 1
gruppo 2
gruppo 3
T0
T1
T2

Fig. 34

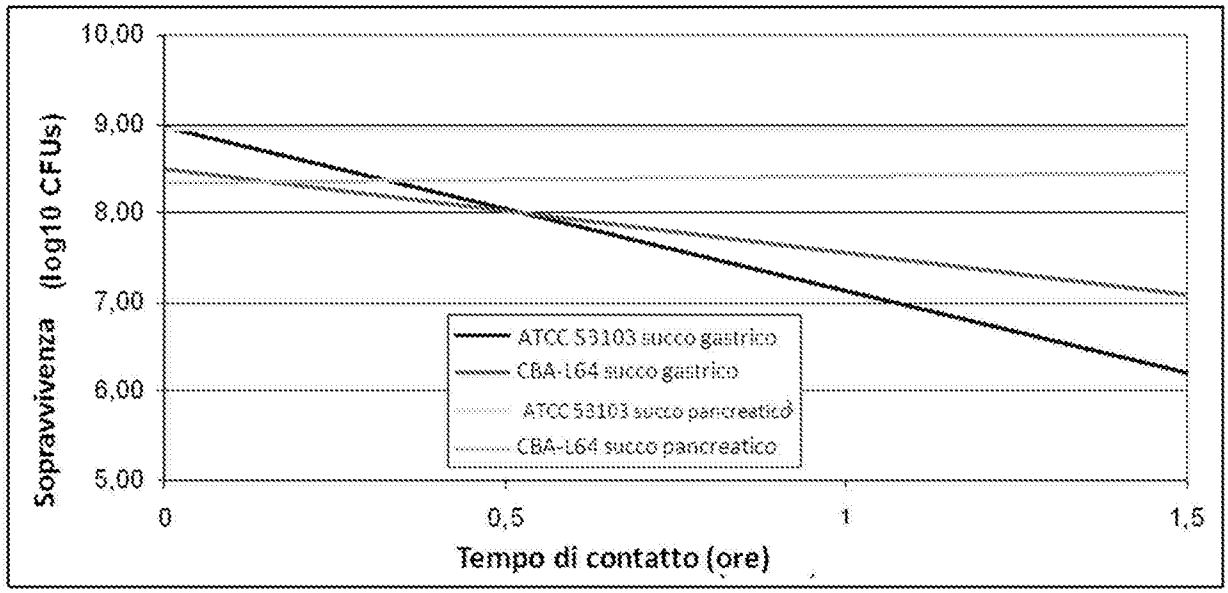

10,00
9,00
8,00
7,00
6,00
5,00
Sopravvivenza (log10 CFUs)
0
0,5
1
1,5
Tempo di contatto (ore)
ATCC 53103 succo gastrico
CBA-L64 succo gastrico
ATCC 53103 succo pancreatico
CBA-L64 succo pancreatico

Fig. 35

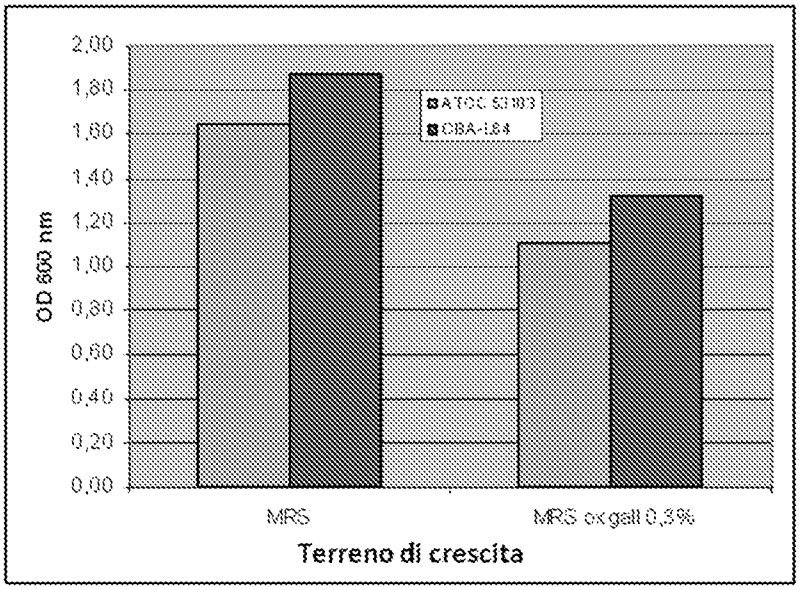

2,00
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
OD 600 nm
ATCC 53103
CBA-L64
MRS
MRS ox gall 0,3%
Terreno di crescita

Fig. 36