L'INTEGRATORE NUTRIZIONALE®

ISSN 1127-6320 Bimestrale. Poste Italiane s.p.a. - Spedizione in Abbonamento Postale
D.L. 353/2003 (convertito in Legge 27/02/2004 n° 46) art. 1, comma 1, LO/MI

4•2025
LUGLIO
AGOSTO

PROBIOTICS *prebiotics* AND POSTBIOTICS

CEC EDITORE

AUTORI
K. Gianesin, E. Caracciolo, P. Lucchese
Ricerca e Sviluppo, PRODECO PHARMA, Castelfranco Veneto
ketty.gianesin@prodecopharma.com

L. paracasei MCC1849 in associazione a estratti vegetali per il benessere delle vie urinarie

Uno studio in vitro

ABSTRACT

L. paracasei MCC1849 with botanical extracts for urinary tract health

An in vitro study

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common types of bacterial infections worldwide, representing a severe public health problem. UTIs are caused by both Gram+ and Gram- bacteria, among these Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) is the most common etiological agent, responsible for approximately 85% of all globally occurring UTIs.

Conventional therapeutic treatment involves the use of antimicrobial agents, but due to the dramatic increase in antimicrobial resistance, this strategy has partially lost its therapeutic efficacy. For this reason, the search for natural alternatives for UTIs treatment represents a current research topic. Many natural substances can be used to protect the urinary tract, support the immune system and relieve symptoms. This study investigated in vitro the antibacterial efficacy of an oral formulation containing botanical extracts in association with the postbiotic L. paracasei MCC1849, highlighting good inhibitory activity against uropathogenic bacterial strains. The combination of botanical extracts with probiotic ingredients could provide an interesting opportunity to improve the therapeutic efficacy of natural alternatives useful in promoting urinary tract health.*

PAROLE CHIAVE
Estratti vegetali
Postbiotici
Vie urinarie
Studio in vitro
Biofilm

RIASSUNTO

Le infezioni del tratto urinario (UTI) sono tra le infezioni batteriche più diffuse al mondo, rappresentando un grave problema di salute pubblica. Le UTI sono causate sia da batteri Gram+ che Gram-, fra questi l'*Escherichia coli* uropatogeno (UPEC) rappresenta il principale agente eziologico; esso è causa dell'85% delle cistiti a livello mondiale. Il trattamento terapeutico convenzionale prevede l'uso di agenti antimicrobici ma, a causa del drammatico aumento di antibiotico resistenza, questa strategia ha perso parzialmente la sua efficacia terapeutica. Per questo

motivo, la ricerca di alternative naturali per il trattamento delle infezioni delle vie urinarie rappresenta un argomento attuale.

Molte sostanze naturali possono essere utilizzate per proteggere le vie urinarie, sostenere le difese immunitarie o alleviare la sintomatologia.

Questo studio ha indagato in vitro l'efficacia antibatterica di una formulazione orale* contenente estratti vegetali in associazione al postbiotico *L. paracasei* MCC1849, evidenziando una buona attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici uropatogeni. La combinazione di estratti botanici con ingredienti che modulano il microbiota potrebbero costituire un'interessante opportunità per migliorare l'efficacia terapeutica di alternative naturali utili a favorire il benessere delle vie urinarie.

*GSE CYSTITIS RAPID+ Bustine, prodotto da PRODECO PHARMA (Castelfranco Veneto).

Introduzione

Le infezioni delle vie urinarie costituiscono le infezioni batteriche più diffuse al mondo. Si stima colpiscano annualmente 150 milioni di persone in tutto il mondo, costituendo un serio problema clinico oltre che economico (**1**).

Le infezioni alle vie urinarie possono essere causate da vari patogeni, ma fra questi l'*Escherichia coli* uropatogeno (UPEC) rappresenta il principale agente eziologico; esso è causa dell'85% delle cistiti a livello mondiale. Il meccanismo principale alla base delle infezioni alle vie urinarie è la via ascendente, ovvero la risalita dei microrganismi, soprattutto di origine enterica, lungo l'uretra, fino alla vescica e ai reni. La patogenicità dei ceppi uropatogeni si deve a diversi fattori di virulenza, in primis fattori di adesione (es. adesine) che promuovono l'attaccamento dei batteri alle cellule uroteliali, oltre che alla capacità di formare biofilm, che li rendono più resistenti alla rimozione durante la minzione nonché meno attaccabili dalle difese immunitarie e dai trattamenti antibiotici (**2**). Oltre a *E. coli*, altri batteri quali *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus* spp. possono causare infezioni del tratto urinario, specialmente nei soggetti fragili (**1**).

Generalmente, le infezioni del tratto urinario sono più frequenti nelle donne che negli uomini. In media, quasi la metà delle donne soffre di infezioni del tratto urinario almeno una volta nella vita, con infezioni del tratto urinario ricorrenti nel 26-53% delle donne colpite (**3**).

Ad oggi, la terapia antibiotica costituisce il gold-standard per trattare i disturbi alle vie urinarie. Tuttavia, la somministrazione ripetuta di antibiotici costituisce fonte di forte preoccupazione a causa dell'insorgenza di ceppi resistenti. Il fenomeno della resistenza batterica, infatti, complica potenzialmente la gestione di ogni infezione, indipendentemente da quanto lieve possa essere al momento della prima presentazione; l'uso eccessivo di antibiotici non comporta infatti solo lo sviluppo di resistenza e un'aumentata predisposizione a recidive, ma anche lo sviluppo di candidosi orale e/o vaginale e disturbi gastrointestinali (**4**).

L'interesse di pazienti e medici verso opzioni terapeutiche alternative agli antibiotici è molto forte, soprattutto per la prevenzione e il trattamento delle cistiti non complicate in cui è possibile evitare l'assunzione di antibiotici. In questo contesto, gli estratti botanici, grazie alla presenza di molteplici fitocostituenti con diverse proprietà d'azione, potrebbero costituire una promettente alternativa. Anche la modulazione del microbiota intestinale sta emergendo come una strategia terapeutica incoraggiante: l'intestino può essere una vera e propria riserva di microbi che, traslocando verso le vie vaginali e urinarie, possono alterarne l'equilibrio (**5**).

In questo lavoro, è stata valutata l'attività antimicrobica di una innovativa formulazione con estratti vegetali in

associazione al postbiotico *L. paracasei* MCC1849. L'attività antimicrobica è stata messa a confronto con quella di una formulazione a base di D-mannosio e Cranberry, le due sostanze bioattive naturali più utilizzate per supportare la salute delle vie genitourinarie.

Materiali e Metodi

La formulazione

Oggetto dello studio è stata una formulazione a base di *L. paracasei* MCC1849 termicamente trattato in combinazione con estratti vegetali, commercialmente disponibile come integratore alimentare e notificata al Ministero della Salute Italiano (numero di notifica: 167240) (formulazione test).

Nello specifico, contiene il postbiotico *L. paracasei* MCC1849, ceppo probiotico termicamente trattato noto principalmente per le sue importanti proprietà immunomodulanti (**6**). Sostenere le difese immunitarie costituisce una strategia utile sia per ridurre il rischio di infezioni sia per allontanare situazioni recidivanti.

La formulazione contiene, inoltre, una miscela di erbe della tradizione fitoterapica le quali agiscono in maniera complementare nel favorire la funzionalità delle vie urinarie nonché nel dare sollievo in caso di discomfort.

L'Uva ursina, l'Ononide e la Pilosella godono infatti di proprietà diuretiche e favoriscono l'eliminazione di eventuali batteri presenti nelle vie urinarie grazie a un'azione di "lavaggio" (**7-9**). L'attività drenante è integrata da quella antisettica dell'Ibisco, le cui proantocianidine hanno dimostrato attività inibitoria nei confronti di ceppi di *Escherichia coli* (**10**), e dall'estratto di semi di Pompelmo, il cui fitocomplesso ricco in flavonoidi ha dimostrato un'interessante attività antibatterica sia su ceppi multiresistenti sia su biofilm batterici (**11**,**12**). I flavonoidi possiedono, inoltre, proprietà antiossidanti utili a proteggere l'epitelio uroteliale infiammato, azione coadiuvata anche dai polifenoli contenuti nell'estratto di Erica selvatica (**13**).

Il dosaggio di assunzione prevede 2 bustine al giorno, ciascuna da 3,4 g. Ogni bustina contiene 468,75 mg di Pompelmo semi estratto secco (e.s.), 250 mg di Uva ursina foglie e.s. tit. 20% in arbutina, 180 mg di Ononide radice e.s., 112,5 mg di Pilosella erba e.s. tit. 1% in vitexina, 100 mg Erica selvatica erba con fiori e.s. tit. 0,6% in iperoside, 100 mg Ibisco fiori e.s. e 10 mg di *L. paracasei* MCC1849 termicamente trattato.

L'attività antibatterica è stata messa a confronto con una formulazione di riferimento a base di Cranberry (Mirtillo rosso americano), il cui frutto ricco in proantocianidine di tipo-A (PAC-A) è in grado di limitare la proliferazione batterica impedendo l'adesione dei batteri alle pareti della vescica e D-mannosio, un monosaccaride che viene assorbito, metabolizzato ed escreto nelle urine e in grado anch'esso di ostacolare l'adesione di microrganismi patogeni, facilitandone l'eliminazione con le urine (**14**,**15**).

I quantitativi di Cranberry e D-mannosio sono stati scelti in base alla media di quanto fornito dai prodotti presenti sul mercato; e quindi rispettivamente 240 mg di Cranberry tit. 15% in PAC-A e 500 mg di D-mannosio (formulazione di riferimento).

Metodi

La valutazione dell'efficacia antibatterica è stata svolta su due ceppi batterici: *Escherichia coli* A297 (DSM 10802), un ceppo isolato in Svezia da un paziente con infezione alle vie urinarie, con sierotipo O18:K1 e producente emolisina (**16**) (tossina che favorisce l'esfoliazione dell'epitelio vescicale esponendo gli strati più interni dell'uroepitelio all'invasione di ulteriori microrganismi) e *Pseudomonas aeruginosa* BWKH18 (DSM 111026), un altro ceppo patogeno, isolato dal getto intermedio delle urine, in grado di formare biofilm (**17**).

Il test impiegato per la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) si è basato sul metodo standardizzato CLSI M07 – "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically" (**18**). Sono state preparate 12 concentrazioni tramite diluzioni seriali 1:2 di ciascuna formulazione (range 3,0 g/L-1,45 mg/L per formulazione test e range 2,2 g/L-1,07 mg/L per la formulazione di riferimento, rispettivamente) e dispensate in pozzetti di una multiwell da 96 pozzetti. Ciascuno è stato inoculato con una concentrazione standard di microrganismo pari a $1 \cdot 10^5$ UFC/mL. Successivamente le piastre così preparate sono state incubate a 37 °C per 24 ore. In seguito all'incubazione è stato determinato il valore

di MIC, discriminando in base alla torbidità i pozzetti in cui è avvenuta crescita da quelli privi di crescita, la concentrazione di MIC risulta essere la prima concentrazione in cui non si apprezza crescita. Selezionate concentrazioni sono state successivamente lette con spettrofotometro, tramite assorbanza (Optical density, O.D.) a 600 nm per valutare la diminuzione di crescita qualora non apprezzabile tramite valutazione visiva.

Per il test di inibizione del biofilm, sono state preparate 8 concentrazioni tramite diluzioni seriali 1:2 di ciascuna formulazione (range 3,0 g/L-0,023 g/L per formulazione test e range 2,2 g/L-0,017 g/L per la formulazione di riferimento, rispettivamente) e dispensate in pozzetti di una multiwell da 48 pozzetti. Ciascuno è stato inoculato con una concentrazione standard di microrganismo *E. coli* A297 pari a $1 \cdot 10^5$ CFU/mL.

Successivamente le piastre così preparate sono state incubate a 37 °C per 72 ore, al termine del quale è stato rimosso il surnatante presente insieme ai batteri in forma planctonica non adesi alla piastra.

Il biofilm è stato quindi lavato tre volte con acqua sterile deionizzata e successivamente, dopo fissazione a 60 °C per 2 ore, si è proceduto alla colorazione con Crystal violet. Il colorante (0,02%) sciolto in acqua deionizzata è stato dispensato in ciascun pozzetto, lasciato agire per 5 minuti a temperatura ambiente e infine lavato per tre volte con acqua sterile deionizzata. L'attività di inibizione del biofilm è stata visualizzata prima tramite osservazione microscopica e successivamente mediante spettrofotometro, estraendo la quantità di colorante fissato al biofilm con metanolo al 100% per 5 minuti a temperatura ambiente.

L'estratto metanolico è stato quantificato allo spettrofotometro, misurando l'assorbanza a 595 nm. Dato che l'intensità di colorazione della soluzione ottenuta è direttamente proporzionale al biofilm residuo, l'assorbanza rappresenta un parametro quantitativo per misurare la quantità di biofilm.

I dati sono stati espressi come media ± deviazione standard (SD). Le analisi statistiche sono state eseguite mediante test ANOVA a una via e test di correzione multipla di Dunnett: il valore $p < 0,05$ è stato considerato una differenza statisticamente significativa.

Risultati

La determinazione mediante microdiluizione in piastra da 96 pozzetti della MIC delle due formulazioni analizzate ha evidenziato che la formulazione test presenta un valore di MIC nei confronti di *Escherichia coli* A297 pari a 0,75 g/L, mentre la formulazione di riferimento ha mostrato un'attività antimicrobica più bassa, fornendo un valore di MIC pari 1,1 g/L.

Nello specifico, la formulazione di riferimento a base di Cranberry e D-mannosio ha mostrato un'attività inibitoria inferiore del 32%. Per quanto riguarda invece il ceppo *Pseudomonas aeruginosa* BWKH18, il test ha fornito per il prodotto un valore di MIC pari a 1,5 g/L mentre per la formulazione di riferimento non è stato possibile ottenere alcun valore di MIC per il range di concentrazioni testate (**Tabella 1**).

Per quanto riguarda la capacità di inibire la formazione del biofilm, il test è stato svolto nei confronti di *E. coli* A297, non avendo ottenuto dei valori di MIC per il prodotto di riferimento nei confronti del ceppo *P. aeruginosa* BWKH18.

Il test ha evidenziato che la formulazione oggetto di studio è in grado di inibire la formazione del biofilm del microorganismo *E. coli* A297 ($p < 0,05$ vs NT) (**Figura 1A**).

Per quanto riguarda la formulazione di riferimento invece, si evince un trend di inibizione nella formazione di biofilm, che però non risulta essere statisticamente significativa per nessuna delle concentrazioni testate (**Figura 1B**).

Si riportano inoltre, per ciascun gruppo sperimentale, un'immagine catturata al microscopio dei microorganismi sottoposti a colorazione con Crystal violet, a seguito del test di inibizione del biofilm. Per ciascuna formulazione e concentrazione testata, si riporta un pozzetto rappresentativo (**Figura 2**).

Tabella 1 • Valori di MIC ottenuti per le due formulazioni testate

	Formulazione test	Formulazione di riferimento
E. coli A297	0,75 g/L	1,1 g/L
P. aeruginosa BWKH18	1,5 g/L	-

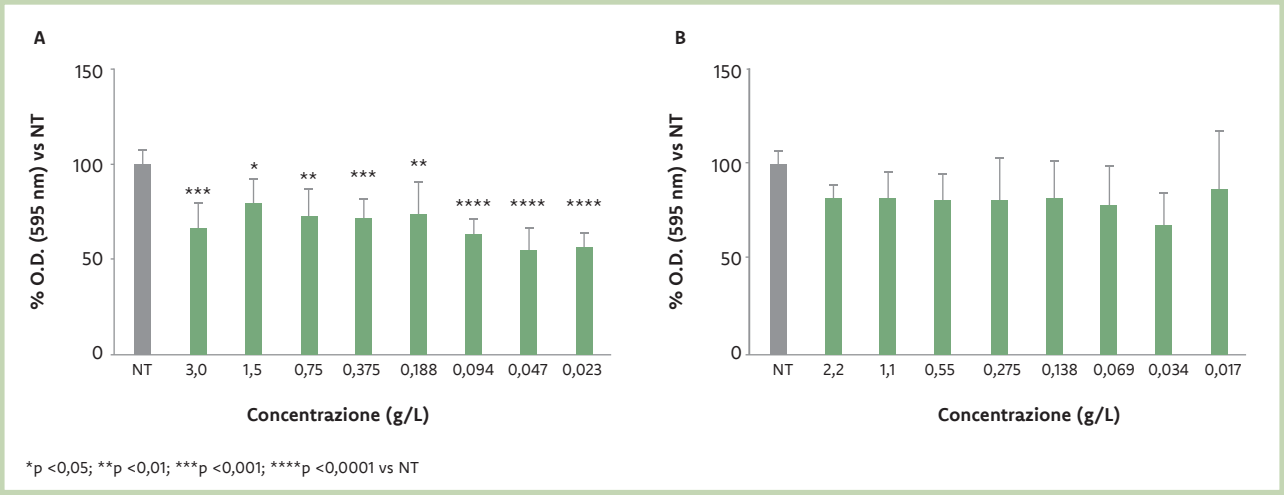

Figura 1 • Quantificazione del biofilm mediante spettrofotometria in seguito a test di inibizione con la formulazione test (**A**) e la formulazione di riferimento (**B**). I dati di assorbanza (O.D.) a 595 nm riportati sono espressi come media ± DS di cinque replicati di due esperimenti indipendenti normalizzati come % rispetto al controllo (NT).

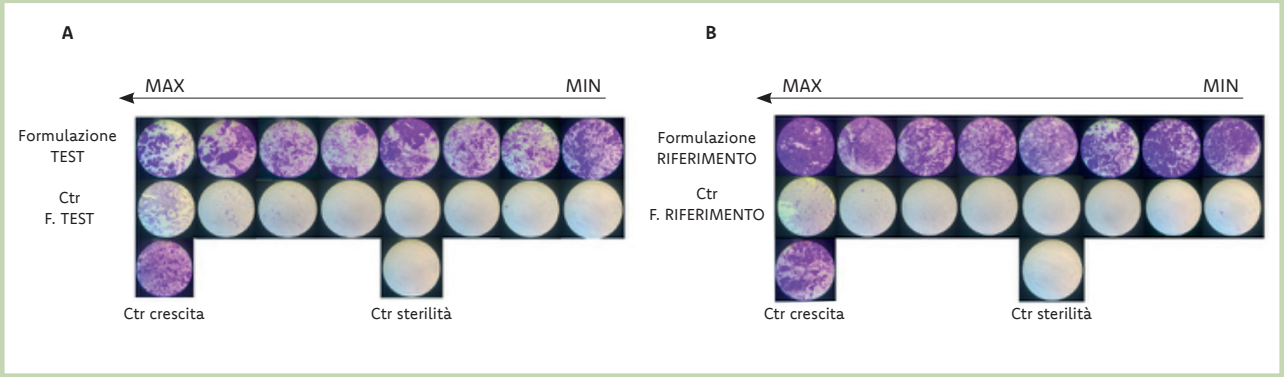

Figura 2 • Immagini al microscopio dei microrganismi sottoposti a colazione con Crystal violet, a seguito del test di inibizione del biofilm con la formulazione test (**A**) e di riferimento (**B**). Per ciascuna concentrazione testata, si riporta un pozzetto rappresentativo.

Discussione e Conclusioni

Gli integratori alimentari contenenti ingredienti naturali hanno trovato nell'ultimo decennio una notevole diffusione e accettazione da parte del consumatore, non solo perché molte delle sostanze nutraceutiche oggi utilizzate per scopi di prevenzione, salute e benessere, erano già conosciute ed utilizzate fin dall'antichità, ma anche perché l'ottenimento dal mondo naturale è considerato sinonimo di sicurezza d'uso, requisito indispensabile. Tuttavia, molti di questi rimedi, sebbene siano molto diffusi e consolidati nella pratica clinica tradizionale, non sempre sono supportati da prove scientifiche.

Questo studio ha testato l'efficacia di una formulazione innovativa per il benessere delle vie urinarie che associa estratti vegetali della tradizione con *L. paracasei* MCC1849 termicamente trattato. La formulazione, unica nel suo genere, ha dimostrato una buona efficacia antibatterica nei confronti di ceppi patogeni specifici del tratto urogenitale. Tale attività può essere attribuita a diversi componenti degli estratti contenuti nella formulazione: per esempio, i semi di Pompelmo contengono limonoidi e flavonoidi ampiamente noti per le loro proprietà antibatteriche e antiadesive (**11,12,19,20**), così come l'Ibisco, ricco in antocianine e glicosidi in grado di contrastare la colonizzazione di *E. coli* alle cellule delle vie urinarie (**10,21**). Tuttavia, merita di essere sottolineato anche il potenziale ruolo di *L. paracasei* MCC1849 termicamente trattato.

Sebbene i ceppi probiotici termicamente trattati svolgano un'attività prevalentemente immunomodulante, grazie alla capacità delle cellule del sistema immunitario di riconoscere specifici componenti strutturali della

parete delle cellule batteriche (indipendentemente dalla loro vitalità), come il peptidoglicano e il lipopolisaccaride, e di innescare così una risposta immunitaria, son possibili anche altri meccanismi (**22**,**23**).

Dopo il trattamento termico, le cellule batteriche inattivate possono rilasciare non solo componenti con effetti immunomodulanti ma anche con proprietà antagonizzanti nei confronti di agenti patogeni.

Si è ipotizzato che diversi componenti batterici siano coinvolti in queste proprietà; per esempio, l'acido lipoteicoico, ottenuto da ceppi diversi di lattobacilli, ha dimostrato capacità antibiofilm nei confronti di ceppi orali ed enterici (**24**-**26**). Lo studio condotto evidenzia, inoltre, l'importanza della qualità di una formulazione in termini di tipologia di estratti e dosaggio nel garantire l'effetto salutistico vantato; D-mannosio e Cranberry, le due sostanze più conosciute e utilizzate per il benessere dell'apparato urinario, possono mancare di efficacia se non vengono apportate nelle giuste quantità. Il D-mannosio, per esempio, mostra efficacia a un dosaggio di 2 g/die, ben più alto rispetto a quello fornito in media dalla maggior parte dei prodotti in commercio. Discorso analogo per il Cranberry: le proantocianidine, e in particolare le PAC-A, che sono ritenute essere le molecole bioattive nel Cranberry, se non apportate in un dosaggio sufficiente non garantiscono l'effetto salutistico desiderato. Va sottolineato, infine, quanto emerso da una recente pubblicazione in cui si è dimostrato che le proantocianidine del Cranberry hanno fornito un effetto discordante su ceppi diversi di *E. coli*, suggerendo che l'associazione di più sostanze bioattive possa costituire una strategia maggiormente efficace (**27**).

Sebbene questi dati rappresentino dei risultati preliminari, sono molto incoraggianti e meritano di essere approfonditi con ulteriori esperimenti nonché da indagini cliniche. L'emergenza della resistenza microbica a livello globale ha reso prioritario lo sviluppo di strategie alternative. Esplorare e approfondire è necessario.

Bibliografia

1. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015;13(5):269-284.
2. Zhou Y, Zhou Z, Zheng L et al. Urinary tract infections caused by uropathogenic Escherichia coli: mechanisms of infection and treatment options. Int J Mol Sci. 2023;24(13):10537.
3. Aydin A, Ahmed K, Zaman I et al. Recurrent urinary tract infections in women. Int Urogynecol J. 2015;26(6):795-804.
4. Al-Badr A, Al-Shaikh G. Recurrent urinary tract infections management in women: a review. Sultan Qaboos Univ Med J. 2013;13(3):359-367.
5. Sihra N, Goodman A, Zakri R et al. Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. Nat Rev Urol. 2018;15(12):750-776.
6. Maehata H, Arai S, Iwabuchi N, Abe F. Immuno-modulation by heat-killed Lacticaseibacillus paracasei MCC1849 and its application to food products. Int J Immunopathol Pharmacol. 2021;35:20587384211008291.
7. EMA European Medicines Agency. Assessment report on Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng., folium. 2018.
8. EMA European Medicines Agency. Assessment report on Ononis spinosa L., radix. 2014.
9. EMA European Medicines Agency. Assessment report on Hieracium pilosella L., herba. 2014.
10. Alshami I, Alharbi AE. Antimicrobial activity of Hibiscus sabdariffa extract against uropathogenic strains isolated from recurrent urinary tract infections. Asian Pac J Trop Dis. 2014;4(4):317-322.
11. Han HW, Kwak JH, Jang TS et al. Grapefruit seed extract as a natural derived antibacterial substance against multidrug-resistant bacteria. Antibiotics. 2021;10(1):85.
12. Song YJ, Yu HH, Kim YJ et al . Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. J Microbiol Biotechnol. 2019;29(8):1177-1183.
13. Rodrigues F, Moreira T, Pinto D et al. The phytochemical and bioactivity profiles of wild Calluna vulgaris L. flowers. Food Res Int. 2018;111:724-731.
14. Pérez-López FR, Haya J, Chedraui P. Vaccinium macrocarpon: an interesting option for women with recurrent urinary tract infections and other health benefits. J Obstet Gynaecol Res. 2009;35(4):630-639.
15. Ala-Jaakkola R, Laitila A, Ouwehand AC, Lehtoranta L. Role of D-mannose in urinary tract infections - a narrative review. Nutr J. 2022;21(1):18.
16. doi:10.13145/bacdive4750.20250331.9.3 (version 9.3).
17. doi: 10.13145/bacdive159024.20241212.9.2 (version 9.2).

18. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 12th ed. CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.
19. Barawi S, Hamzah H, Hamasalih R et al. Antibacterial mode of action of grapefruit seed extract against local isolates of beta-lactamases-resistant Klebsiella pneumoniae and its potential application. Int J Agric Biol. 2021;26(4):499-508.
20. Osungunna MO, Onawunmi GO. Anti-adhesion and antibiotic modulatory evaluation of grapefruit (Citrus paradisi) juice and seed extract on bacteria isolated from urine and catheter. J Pharm Pharmacogn Res. 2016;4(1):25-38.
21. Mounnissamy VM, Kavimaini S, Gunasegaran R. Antibacterial activity of gossypetin isolated from Hibiscus sabdariffa. Antiseptic. 2022;99(3):82-82.
22. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). Genes Nutr. 2011;6(3):261-274.
23. Mantziari A, Salminen S, Szajewska H, Malagón-Rojas JN. Postbiotics against pathogens commonly involved in pediatric infectious diseases. Microorganisms. 2020;8(10):1510.
24. Jung S, Park OJ, Kim AR et al. Lipoteichoic acids of lactobacilli inhibit Enterococcus faecalis biofilm formation and disrupt the preformed biofilm. J Microbiol. 2019;57(4):310-315.
25. Kim AR, Ahn KB, Yun CH et al. Lactobacillus plantarum lipoteichoic acid inhibits oral multispecies biofilm. J Endod. 2019;45(3):310-315.
26. Ahn KB, Baik JE, Park OJ et al. Lactobacillus plantarum lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of Streptococcus mutans. PLoS One. 2018;13(2):e0192694.
27. Ranfaing J, Dunyach-Remy C, Lavigne JP, Sotto A. Propolis potentiates the effect of cranberry (Vaccinium macrocarpon) in reducing the motility and the biofilm formation of uropathogenic Escherichia coli. PLoS One. 2018;13(8):e0202609.