

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità ***in vitro***

DEFINIZIONI ICCR

Definitions related to the microbiome in the context of cosmetics

Microbiota:

The microbiota is the assemblage of microorganisms, such as bacteria, fungi, archaea, microalgae & protists present in a defined environment. This can be the human body or individual body sites, like the skin or the digestive tract. Definition based on Berg et al., 2020

Microbioma:

Definition: The microbiome is a characteristic microbial community occupying a reasonably well-defined habitat which has distinct physio-chemical properties. The microbiome not only refers to the microorganisms involved but also encompasses their theatre of activity, which results in the formation of specific ecological niches. This includes their genetic material, and also structural molecules, like enzymes, membrane lipids or polysaccharides. Definition based on Berg et al., 2020

Skin Microbioma:

Definition: The skin microbiome is present on the whole skin surface, including oral cavity and mucosal surfaces of the external genital organs. The composition of the skin microbiome is dynamic, site-specific but also differs from individual to individual. Definition based on Byrd et al., 2018

RACCOLTA DEI CAMPIONI

32nd ECCMID EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

Lisbon, Portugal
23–26 April 2022

**Microbiome analysis from skin and buccal samples collected and
stored in an inactivation medium**

04. Diagnostic microbiology

4g. Microbiome studies (incl clinical and diagnostic studies, One Health aspects)

**Roberto Massimo Zambonin ¹, Simone Paghera ², Cristina Sorgato ¹,
Cristiano Sabelli ²**

¹Eurochem Ricerche SRL - Mestrino (Italy), ²Copan Italia SpA - Brescia (Italy)

RACCOLTA DEI CAMPIONI

32nd ECCMID EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

Lisbon, Portugal
23–26 April 2022

Microbiome analysis from skin and buccal samples collected and stored in an inactivation medium

..... Samples collected for microbiome analyses are typically stored into inactivating media at low temperatures to avoid post-collection changes in microbial composition. Here we evaluate the effectiveness of Copan eNAT® as nucleic acids (NA) storage medium, using Next Generation Sequencing (NGS) to analyse samples obtained from pure cultures and the microbiome from skin (scalp) and buccal swabs during preliminary tests performed for internal workflow standardization. eNAT® formula allows to lyse cells within 30 minutes for microbial viability inactivation and inactivate nucleases for NA preservation.

.....

Our findings suggest that skin and buccal microbial communities stored in eNAT® medium can be analysed using 16S rRNA amplification and NGS assays. Thanks to the rapid inactivation of microbial viability, eNAT® is a ready-to-use device able to provide high-quality results. Our data confirm good technical reproducibility of this preservation method after 3 weeks of samples storage at refrigerated temperatures.

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

SCOPO DELLO STUDIO

Alterazioni della mucosa gengivale con presenza di eritema, erosioni, lesioni leucoplastiche e sanguinamento possono essere dovute ad una alterazione del microbioma.

Lo scopo dello studio è quello di valutare se l'utilizzo di un prodotto cosmetico con probiotici può avere la funzione di migliorare la situazione di disagio con ribilanciamento del microbioma.

È stata effettuata una valutazione clinico-dermatologica dello stato delle gengive per valutare la presenza di eritema, sanguinamento gengivale, erosioni e lesioni leucoplastiche.

L'attività del trattamento viene valutata al termine dei 30 giorni durante i quali il prodotto è stato applicato da volontari secondo le indicazioni previste.

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

PROTOCOLLO *studio in vivo*



- Valutazione clinica-dermatologica delle gengive dei soggetti da parte del medico all'inizio dello studio e dopo 30 giorni (eritema, erosioni, lesioni leucoplastiche e sanguinamento) con un grado da 0: assente a 3: severo
- Campionamento del microbioma all'inizio dello studio e dopo 30 giorni sull'area gengivale superiore e inferiore
- Al termine dello studio, i volontari esprimono il loro giudizio sull'efficacia e la piacevolezza del trattamento attraverso un questionario di autovalutazione.



- Gel orale con probiotici da utilizzare la sera, prima di coricarsi, dopo essersi lavati i denti con il dentifricio neutro consegnato. Il gel va rimosso alla mattina con lo spazzolino



- 20 volontari (uomini e donne) età media 43 anni. Tutti i volontari presentano problemi all'area gengivale

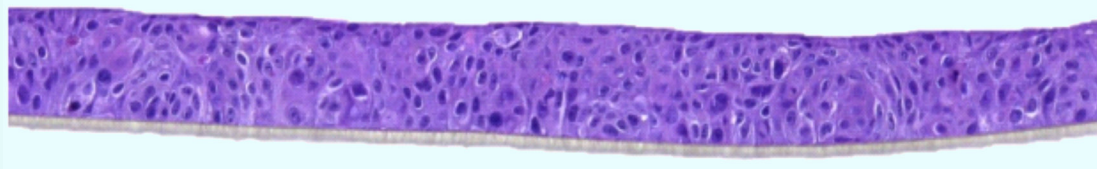
IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

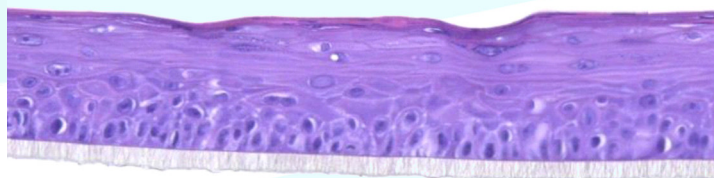
compatibilità *in vitro*. Valutazione del potenziale irritante

Il gel viene applicato localmente sul modello tridimensionale di epitelio orale (HOE) e gengivale (HGE) ricostruiti *in vitro*

Il **modello HOE** è realizzato dalla coltura di cellule epiteliali di derivazione umana provenienti da un carcinoma a cellule squamose della mucosa buccale in un terreno chimicamente definito. In coltura, queste cellule formano un modello di epitelio multistrato altamente differenziato, che comprende strati cellulari organizzati, analoghi a quelli presenti nella mucosa orale umana in vivo e, come questa, privi di strato corneo.



Il **modello HGE** è realizzato coltivando normali cellule gengivali umane su un filtro in policarbonato inerte all'interfaccia aria-liquido in un mezzo chimicamente definito. In coltura, queste cellule formano un modello epiteliale multistrato altamente differenziato, istologicamente simile agli strati cellulari esterni della gengiva umana.



IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

compatibilità *in vitro*. Valutazione del potenziale irritante

I due diversi supporti vengono trattati localmente con il prodotto al fine di valutare il potenziale irritativo. Il prodotti vengono applicati direttamente sugli inserti e il trattamento viene mantenuto per 4 ore. Questo test valuta se l'applicazione del campione in analisi può diminuire la vitalità cellulare negli inserti, dimostrando in questo modo un'attività irritativa.

La vitalità cellulare viene misurata considerando la conversione da parte degli enzimi cellulari del sale giallo di MTT in un composto blu insolubile in acqua chiamato formazano.

Epitelio orale HOE

MTT test – Vitalità cellulare ($\pm$ st.dev.)		
Controllo negativo (soluzione fisiologica)	100,0%	($\pm$ 2,7)
Controllo positivo (SDS 0,5%)	2,9%	($\pm$ 1,7)
Gel Orale	87,6%	($\pm$ 1,7)

I dati riportati nella tabella mostrano che il trattamento con il gel non ha portato ad una riduzione della vitalità cellulare al di sotto del 50%, che si pone come criterio di accettabilità per il controllo positivo.

Epitelio gengivale HGE

MTT test – Vitalità cellulare ($\pm$ st.dev.)		
Controllo negativo (soluzione fisiologica)	100,0%	($\pm$ 6,6)
Controllo positivo (SDS 0,5%)	1,9%	($\pm$ 0,1)
Gel Orale	113,9%	($\pm$ 8,5)

I dati riportati nella tabella mostrano che il trattamento con il gel non ha portato ad una riduzione della vitalità cellulare al di sotto del 50%, che si pone come criterio di accettabilità per il controllo positivo.

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

VALUTAZIONE CLINICO-DERMATOLOGICA

Tutte le valutazioni sono state eseguite all'inizio (T0) e alla fine del trattamento (Tf)

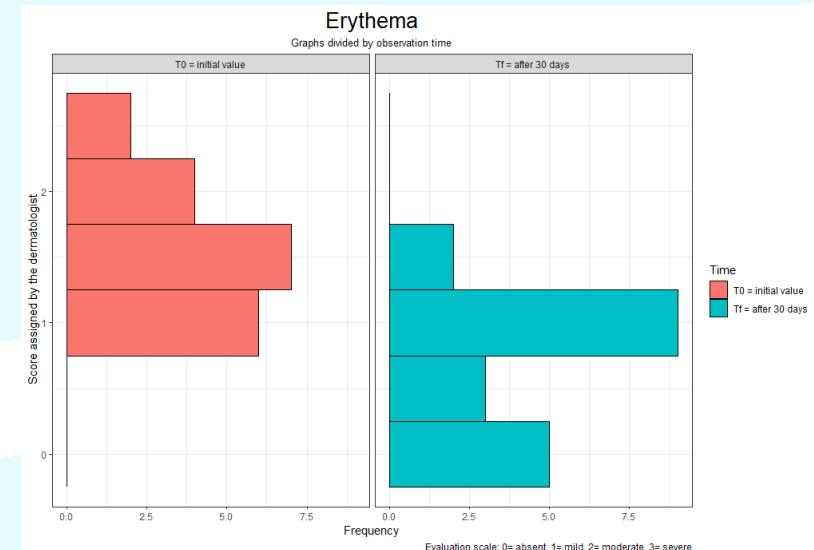
I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente utilizzando il programma statistico R-studio. Per le analisi di significatività, è stato applicato il Wilcoxon signed rank test per dati accoppiati con un livello di significatività di valore $p < 0,05$

PRESENZA DI ERITEMA

Confronto dei dati prima dell'applicazione del prodotto (T0 = valore iniziale) con quelli dopo 30 giorni di trattamento con il prodotto (Tf):

T0 (Rating)	Tf = after 30 days (Rating)	Variation T0-Tf (Rating)	T0 vs Tf p-value
mean 1.6 std.dev. 0.5	mean 0.7 std.dev. 0.5	-0.8	$p < 0.0001$

Il 100% dei soggetti ha mostrato un miglioramento significativo nella valutazione dell'eritema (diminuzione) dopo 30 giorni di trattamento.



IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

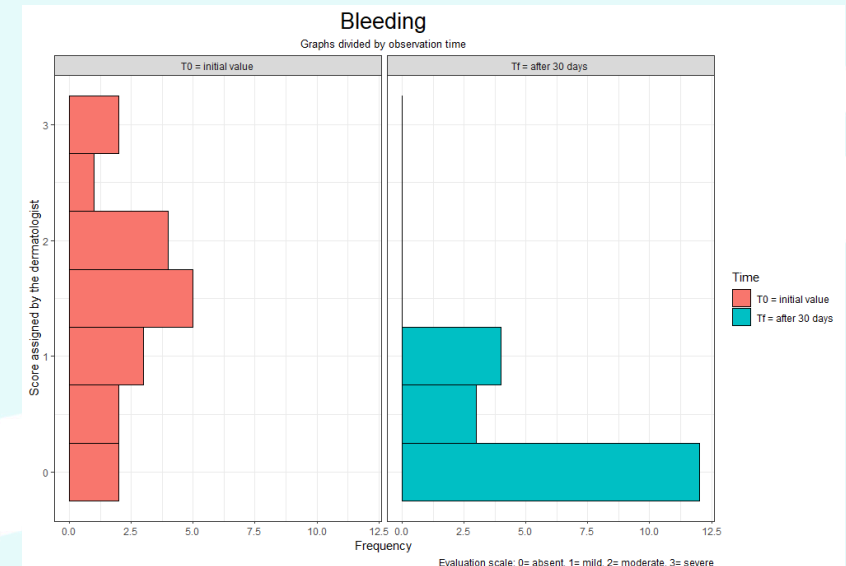
VALUTAZIONE CLINICO-DERMATOLOGICA

PRESENZA SANGUINAMENTO GENGIVALE

Confronto dei dati prima dell'applicazione del prodotto (T0 = valore iniziale) con quelli dopo 30 giorni di trattamento con il prodotto (Tf):

T0 (Rating)	Tf = after 30 days (Rating)	Variation T0-Tf (Rating)	T0 vs Tf p-value
mean 1.5 std.dev. 0.9	mean 0.3 std.dev. 0.4	-1.2	p < 0.0003

Il 90% dei soggetti ha mostrato un miglioramento significativo nella valutazione del sanguinamento gengivale (diminuzione) dopo 30 giorni di trattamento.



IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

VALUTAZIONE CLINICO-DERMATOLOGICA

PRESENZA DI EROSIONI

Confronto dei dati prima dell'applicazione del prodotto (T0 = valore iniziale) con quelli dopo 30 giorni di trattamento con il prodotto (Tf):

T0 (Rating)	Tf = after 30 days (Rating)	T0 vs Tf p-value
mean 0.1 std.dev. 0.3	mean 0.0 std.dev. 0.0	p = 0.35

Il trattamento dimostra di non causare erosioni durante il suo utilizzo.

Il 100% dei soggetti ha mostrato di mantenere o migliorare il proprio rating in presenza di valutazione delle erosioni dopo 30 giorni di trattamento.

PRESENZA DI LESIONI LEUCOPLASTICHE

Confronto dei dati prima dell'applicazione del prodotto (T0 = valore iniziale) con quelli dopo 30 giorni di trattamento con il prodotto (Tf):

T0 (Rating)	Tf = after 30 days (Rating)	T0 vs Tf p-value
mean 0.2 std.dev. 0.5	mean 0.0 std.dev. 0.0	p = 0.37

Il trattamento dimostra di non causare lesioni leucoplastiche durante il suo utilizzo.

Il 100% dei soggetti ha mostrato di mantenere o migliorare il proprio rating in presenza di valutazione delle lesioni leucoplastiche dopo 30 giorni di trattamento.

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

ANALISI DEL MICROBIOMA

CAMPIONAMENTO TAMPONI

I tamponi vengono eseguiti a domicilio da ciascun soggetto a T0 e Tf seguendo le istruzioni dell'azienda fornitrice. L'area della cavità orale coinvolta nel test è l'area gengivale superiore e inferiore.

Astenersi da qualsiasi manovra di igiene orale nelle 24 ore precedenti il tampone.
Eseguire l'ultima applicazione di Gel orale 36 ore prima del tampone

I tamponi conservati a 4°C vengono consegnati al laboratorio per la rilevazione degli acidi nucleici

Scopo

Estrazione del DNA, amplificazione del DNA, preparazione della libreria e sequenziamento degli ampliconi V3-V4 16S su tamponi orali delle gengive. Strategia 300PE su piattaforma MiSeq. Analisi bioinformatica avanzata.

DIVERSITY ANALYSIS

1. *Alpha diversity*
2. *Beta diversity*
3. *Microbial differential abundance*

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

ANALISI DEL MICROBIOMA

Alpha Diversity

I quattro indici (observed features, pielou's evenness, shannon entropy and Faith PD) utilizzati per valutare la diversità alfa dei campioni non hanno mostrato differenze significative tra i due punti temporali.

Beta Diversity

Per valutare le differenze microbiche tra i due punti temporali, sono state utilizzate quattro diverse metriche di beta diversity (Bray Curtis, Jaccard, unweighted and weighted Unifrac). Nessuno di questi ha mostrato differenze significative. Questa è una chiara prova della stabilità microbica nel tempo, che è confermata anche dall'analisi del PCoA unifrac non ponderato.

Beta Diversity Metric	pseudo-F	p-value	q-value
Bray Curtis	0.474872	0.994	0.994
Jaccard	0.257155	1	1
Unweighted Unifrac	0.244741	0.998	0.998
Weighted Unifrac	0.932687	0.457	0.457

Beta diversity group significance. Pseudo-F, p-value and q-value derived by applying Permanova test with 999 permutations on beta diversity metrics for comparing the two time points.

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

ANALISI DEL MICROBIOMA

Microbial differential abundance

L'analisi dei dati di composizione dei campioni di microbiota è stata effettuata utilizzando **ANCOM**. In questo modo abbiamo valutato se alcuni taxa, a vari livelli (caratteristica, specie, genere, famiglia, phylum), fossero significativamente diversi tra i due punti temporali. Confermando i risultati precedenti, nessun taxon è stato trovato per cambiare significativamente la sua abbondanza, anche se alcune differenze sono visibili analizzando grafici a barre raggruppati a livello di famiglia e genere. Queste differenze derivano probabilmente da modifiche più ampie nella composizione del microbiota di particolari campioni (es. S16, S17 e S20), che tuttavia non sono diffuse in tutti i campioni.

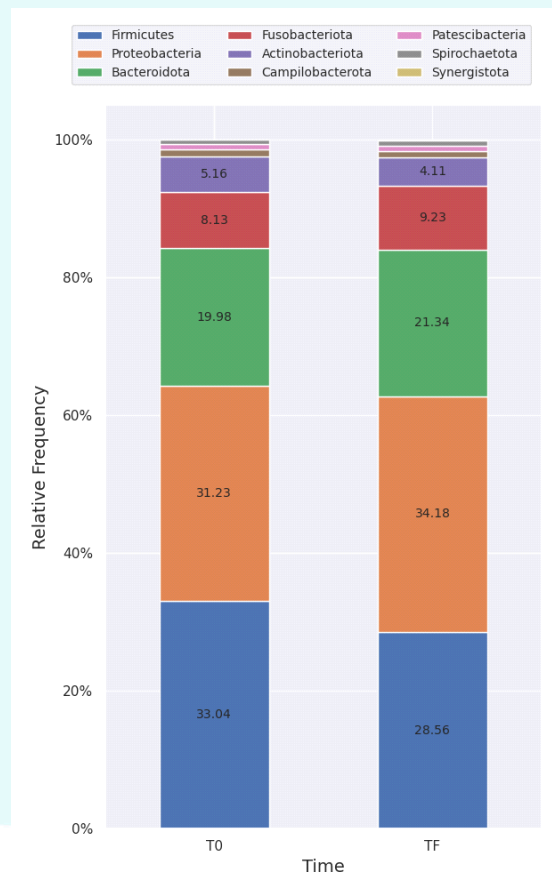


IL MICROBIOMA

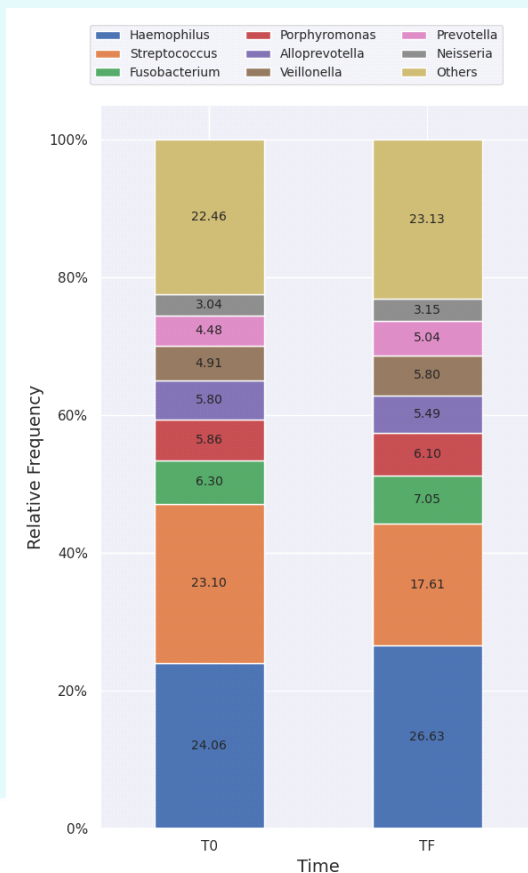
Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

ANALISI DEL MICROBIOMA

Microbial differential abundance



1. Phylum level



2. Genus Level

Grouped bar plots. Bar plots grouped on Time showing the relative abundance of the most abundant taxa at phylum (1) and genus (2) level. Relative abundance of each taxon is also shown.

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

ANALISI DEL MICROBIOMA

Conclusioni

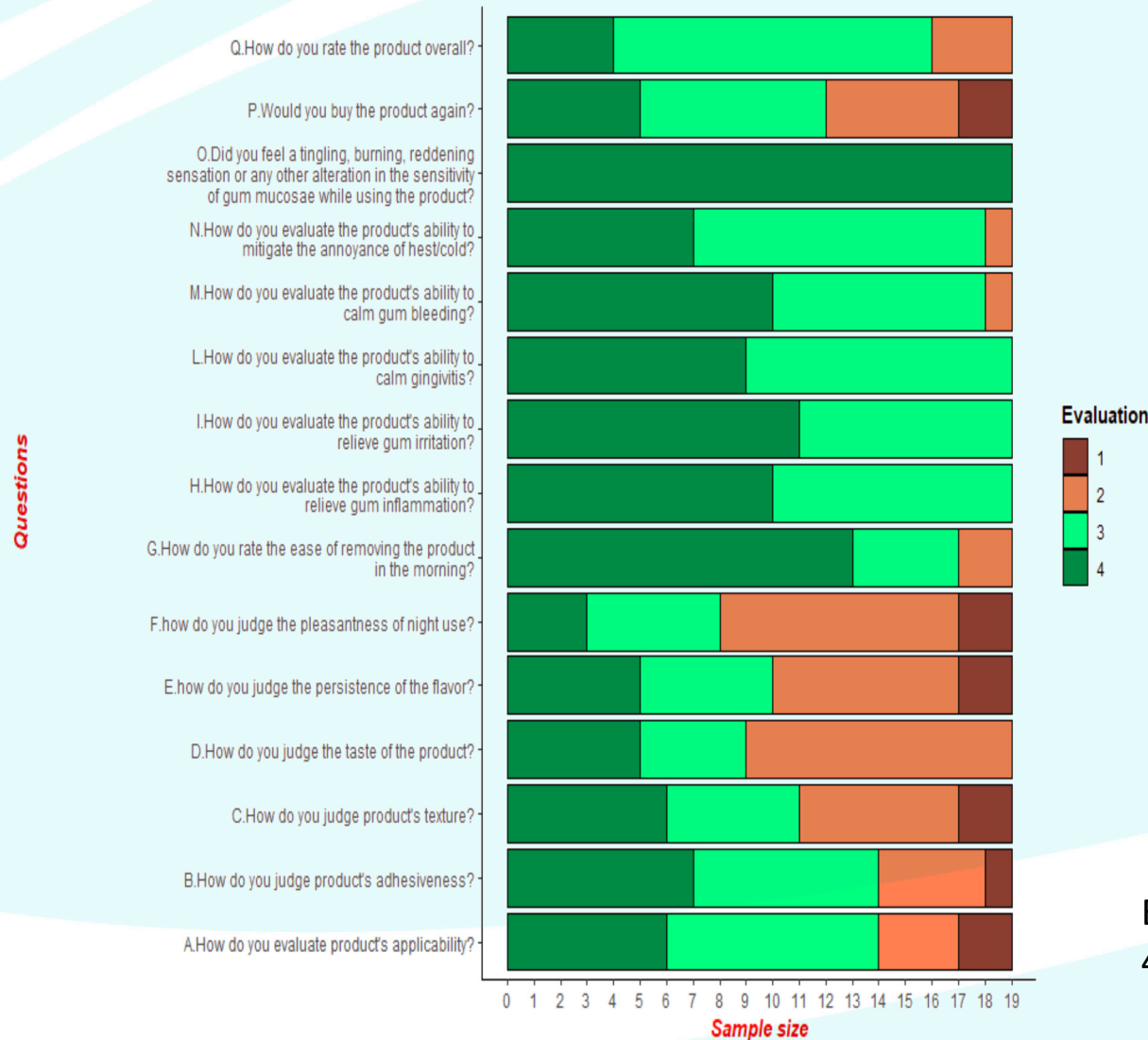
Lo studio è stato condotto per valutare i cambiamenti del microbiota tra due punti temporali (T0 e TF). Nel complesso, le indagini hanno mostrato una stabilità della composizione microbica nel tempo, poiché le analisi della diversità alfa e beta e la valutazione delle abbondanze differenziali dei taxa non hanno evidenziato differenze significative, ad eccezione dell'uniformità di Shannon e Pielou, che è leggermente aumentata a TF, considerando i campioni accoppiati. Inoltre, alcuni campioni, in particolare S16, S17 e S20, hanno mostrato un tasso più elevato di modificazione microbica. Tuttavia, in conclusione, possiamo affermare che la composizione microbica del campione non ha subito modifiche significative tra i due punti temporali.

La non variabilità del microbiota dopo il trattamento, può essere vista come un risultato positivo perché, se il disagio gengivale non fosse di origine microbiologica, il trattamento eliminerebbe/minimizzerebbe la causa del problema, senza modificare significativamente la composizione fisiologica del microbiota. Altrimenti (problema di origine microbiologica), la mancanza di significatività non è totale e quindi la riduzione dei problemi gengivali nei pazienti può derivare in parte dal miglioramento degli indici di diversità alfa (uniformità e shannon) che sono significativi analizzando i campioni in modo accoppiato.

IL MICROBIOMA

Studio clinico del suo andamento nell'applicazione di un prodotto cosmetico (**Gel orale**) e compatibilità *in vitro*

Self-evaluation questionnaire



Evaluation: 1=insufficient, 2=sufficient, 3=good, 4=excellent.

GRAZIE

PER L'ATTENZIONE