



Integratori alimentari a base di probiotici: considerazioni generali ed aspetti microbiologici

***Alfonsina Fiore
DSPVSA
Istituto Superiore di Sanità***

***Corso
I CONTROLLI PER I NOVEL FOOD
3 ottobre 2013 IZSLER – sede di Milano***

INDICE

- Integratori alimentari a base di probiotici
- Caratteristiche dei probiotici
- Problematiche legate alla presenza dei probiotici negli integratori
- Metodi di analisi
- Monitoraggio integratori alimentari a base di probiotici

INTEGRATORI ALIMENTARI

Definiti “*prodotti alimentari*” dal DM n.169 del 21 maggio 2004

- Fonte di nutrienti
- **Alimenti funzionali** (migliorano il metabolismo e le funzioni fisiologiche dell'organismo, attraverso un insieme di effetti aggiuntivi alle normali funzioni nutrizionali).
- **Veicoli di contaminanti** (es. microbiologici, chimici)

INTEGRATORI ALIMENTARI

Come tutti gli alimenti è necessario:

- *garantirne la qualità e la sicurezza d'uso
(assenza di eventuali pericoli di natura
microbiologica)*



Microrganismi patogeni (foodborne pathogens): *agenti biologici contenuti in un alimento, potenzialmente in grado di causare effetti nocivi sulla salute*

INTEGRATORI ALIMENTARI

Come alimenti funzionali è necessario:

- il rispetto dei criteri di conformità a ben definite linee guida

(valutazione delle caratteristiche intrinseche degli ingredienti e della loro concentrazione)



- **Presenza di microrganismi probiotici:** microrganismi utili, introdotti deliberatamente a fini benefici, il cui utilizzo però è subordinato al rispetto dei qualified presumption of safety (QPS, EFSA) *in base ai quali un microrganismo o un suo componente può essere utilizzato negli alimenti, in quanto in possesso di una ben stabilita storia e status di sicurezza d'uso*

Microrganismi probiotici

- *Batteri lattici*
- *Fermenti Lattici*
- *Lactic acid bacteria*

“Microrganismi vivi e vitali, che se assunti in quantità adeguate come parte di un alimento o di un integratore, esercitano un effetto benefico sulla salute dell'ospite”

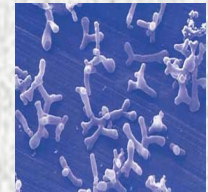
La maggior parte dei microrganismi probiotici utilizzati negli integratori sono specie appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*

- **Genere *Lactobacillus***



- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus rhamnosus*
- *Lactobacillus paracasei*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- *Lactobacillus salivarius*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus plantarum*

- **Genere *Bifidobacterium***



- *Bifidobacterium longum*
- *Bifidobacterium bifidum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium infantis*
- *Bifidobacterium animalis*
- *Bifidobacterium lactis*

- L'attributo probiotico è stato riconosciuto anche ai generi *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* ed *Enterococcus*.
- Sono state avanzate perplessità sui microrganismi probiotici appartenenti agli ultimi due generi, in particolare sul genere *Enterococcus*, per la presenza di specie patogene.
- Sono considerati probiotici anche taluni lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*.

Caratteristiche dei Probiotici

- Microrganismi assolutamente sicuri per l'impiego nell'uomo
- Attivi e vitali a livello intestinale
- Resistenti a valori bassi di pH, al succo gastrico, alla bile ed al succo pancreatico
- Persistono temporaneamente nell'intestino

Possibili meccanismi d'azione dei batteri probiotici

- Produzione di sostanze ad azione antimicrobica
- Modulazione del sistema immunitario
- Competizione per i nutrienti
- Esclusione competitiva per il legame di batteri patogeni

Gli integratori alimentari vengono commercializzati utilizzando forme tipicamente farmaceutiche e non substrati alimentari



È necessario adottare accorgimenti tecnologici di produzione tesi a conservare la vitalità delle specie utilizzate e la loro durabilità per un ampio periodo di tempo

I processi produttivi, come ad esempio l'essiccamento della coltura, possono provocare una riduzione della vitalità dei microrganismi per effetto di lesioni cellulari

In particolare,

soprattutto nel caso di preparazioni con colture miste, è necessario stabilire la vitalità, il numero e l'identità di ogni singola specie dichiarata

Metodi microbiologici tradizionali

- Utili per valutare il numero dei microrganismi presenti in un prodotto e dare indicazioni relative alla vitalità
- In genere, non permettono di discriminare le diverse specie microbiche presenti contemporaneamente in un prodotto

Metodiche di identificazione genetica

- identificazione a livello di specie: PCR, ARDRA-PCR (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)
- identificazione a livello di ceppo: RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR) , PFGE (pulse field gel electrophoresis)

Metodica analitica “*ideale*”

Uso combinato di metodi microbiologici tradizionali e metodi
molecolari



Il DNA batterico rimane essenzialmente stabile e non è influenzato dalle condizioni di coltura, né suscettibile, almeno a breve termine, agli eventuali stress ambientali

PROTOCOLLO ANALITICO COMBINATO, SUDDIVISO IN 4 FASI SEQUENZIALI

- Nella **prima fase**, le analisi molecolari vengono effettuate direttamente sul DNA totale estratto dal campione, al fine di identificare i diversi gruppi tassonomici dichiarati in etichetta.

- Con la **seconda fase**, propriamente microbiologica, viene verificata la vitalità e il numero presuntivo delle specie microbiche mediante conta su terreni differenziali e selettivi.

- Nella **terza fase** le colture vengono sottoposte a conferma dell'identità e del numero.

- Nella **quarta fase** le colture vengono sottoposte a conferma del numero.

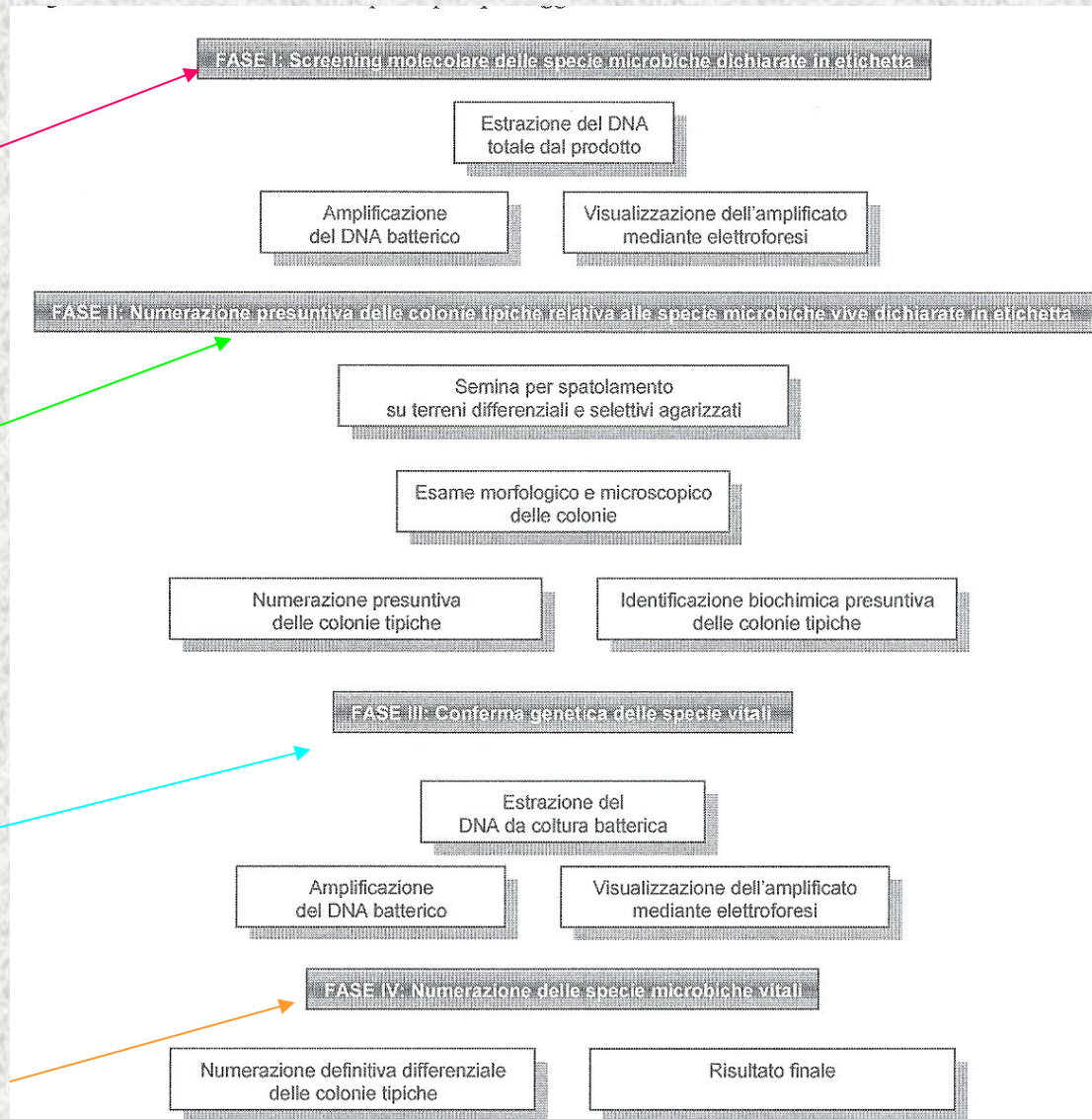


Figura 1. Schema riassuntivo delle principali fasi del protocollo analitico

FASE I: SCREENING MOLECOLARE DELLE SPECIE MICROBICHE DICHIARATE IN ETICHETTA

In questa fase, le analisi molecolari vengono effettuate direttamente sul DNA totale estratto dal campione, al fine di identificare i diversi gruppi tassonomici dichiarati in etichetta

1. Estrazione del DNA totale dal prodotto
2. Amplificazione del DNA batterico
3. Visualizzazione dell'amplificato mediante elettroforesi

FASE II NUMERAZIONE PRESUNTIVA DELLE COLONIE TIPICHE RELATIVA ALLE SPECIE MICROBICHE VIVE DICHIARATE IN ETICHETTA

Con la seconda fase, propriamente microbiologica, viene verificata la vitalità e il numero presuntivo delle specie microbiche mediante conta su terreni differenziali e selettivi

1. Semina per spatolamento su terreni differenziali e selettivi agarizzati
2. Numerazione presuntiva delle colonie tipiche
3. Esame morfologico e microscopico delle colonie
4. Identificazione biochimica presuntiva delle colonie tipiche (profilo fermentativo dei carboidrati mediante sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica; studio dell'attività enzimatica)



Caratterizzazione fenotipica

FASE III CONFERMA DELLE SPECIE VITALI

In questa fase le colture vengono sottoposte a conferma dell'identità

1. Estrazione del DNA da coltura batterica
2. Amplificazione del DNA batterico mediante PCR
3. Visualizzazione dell'amplificato mediante elettroforesi su gel di agarosio



Caratterizzazione genetica

FASE IV: NUMERAZIONE DELLE SPECIE MICROBICHE VITALI

in questa fase le colture vengono sottoposte a conferma del numero

1. Numerazione definitiva delle colonie
2. Risultato finale

Caratterizzazione probiotica

- Resistenza ai sali biliari, a bassi valori di pH, produzione di batteriocine

E' necessario che i microrganismi probiotici dichiarati in etichetta siano:

- Vitali
- In quantità non inferiore alla concentrazione minima stabilita, per tutto il periodo di vita commerciale del prodotto
la quantità di cellule vive per porzione/posologia giornaliera deve essere di almeno di 10⁹ cellule vive
- Correttamente identificati in etichetta, a livello di specie
in accordo con nomenclature tassonomiche internazionalmente riconosciute
- Sicuri per l'impiego umano
soddisfacendo i requisiti di sicurezza (QPS) previsti dall'EFSA

ATTIVITA' DI MONITORAGGIO INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI PROBIOTICI *ITALIA 2005-2006*

- **29 Ditte produttrici** di integratori alimentari a base di probiotici (Nord, Centro, Sud Italia)
- **41 prodotti** prelevati negli stabilimenti di **produzione**
- **31 prodotti** prelevati nei luoghi di **distribuzione** (farmacie, erboristerie, supermercati)

SCOPO DEL MONITORAGGIO

- Monitorare la produzione nazionale per definire meglio la qualità di tali preparazioni.
- Seguire ogni prodotto in varie fasi della vita “*di scaffale*” per costruire una curva di decadimento del numero dei microrganismi in funzione del tempo di vita dell’integratore stesso.

PRELIEVI

Produzione

Distribuzione

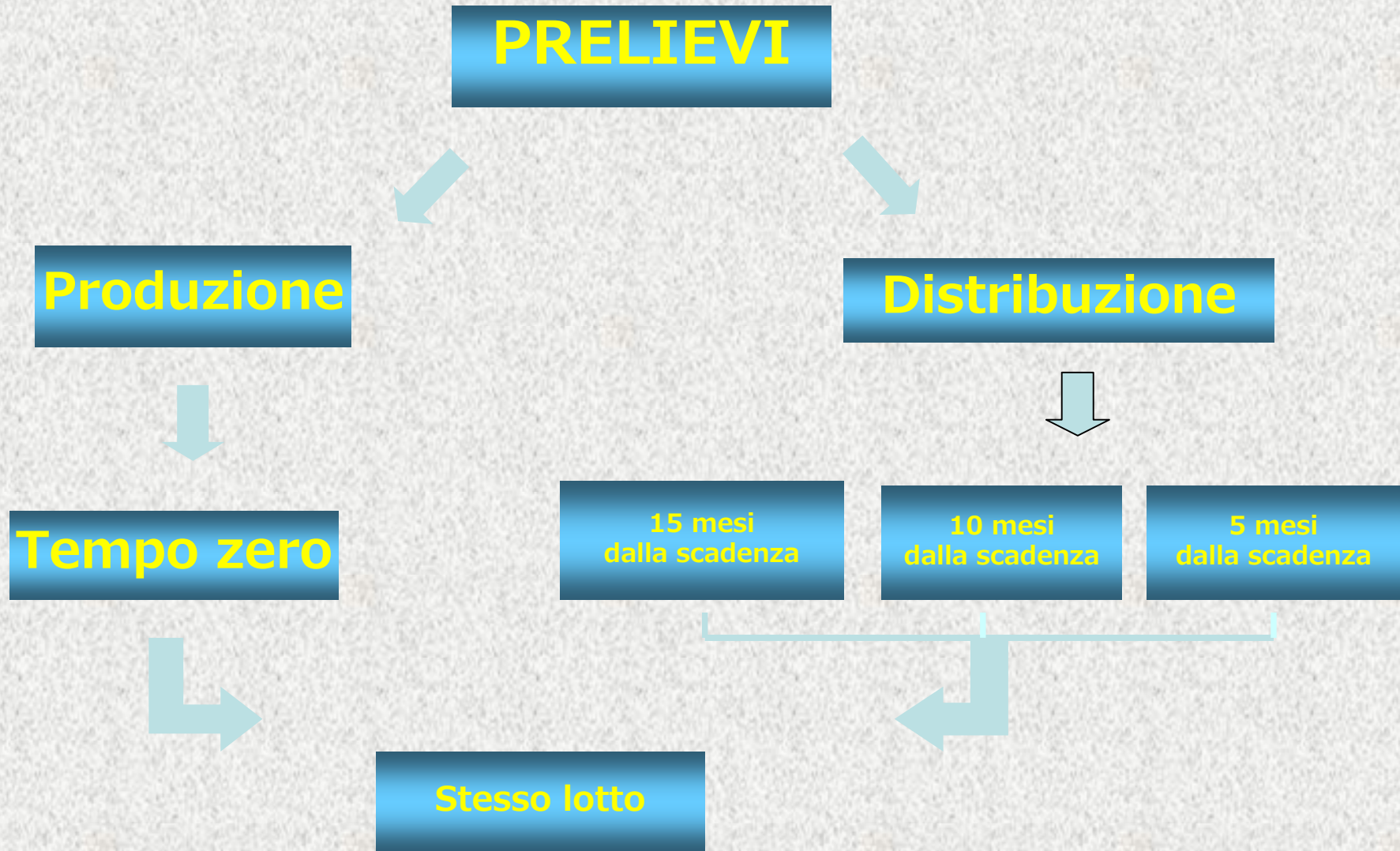
Tempo zero

**15 mesi
dalla scadenza**

**10 mesi
dalla scadenza**

**5 mesi
dalla scadenza**

Stesso lotto



Risultati

relativi ai 41 campioni prelevati alla

PRODUZIONE

Numero di campioni (Percentuale)	Note
38 (92,7%)	<ul style="list-style-type: none">• Assenza di una o più specie dichiarate in etichetta• Denominazione incorretta della specie, presenze di specie diverse da quelle dichiarate• Numero di microrganismi in quantità inferiore a quanto dichiarato• Presenza di specie patogene
3 (7,3%)	<ul style="list-style-type: none">• Numero di microrganismi e specie in accordo a quanto dichiarato in etichetta

Risultati relativi ai 31 campioni prelevati alla **DISTRIBUZIONE**

Numero di campioni (Percentuale)	Note
1 (3,2%)	<ul style="list-style-type: none">•Numero di microrganismi e specie in accordo con i risultati della produzione
30(96,8%)	<ul style="list-style-type: none">•Riduzione del numero di microrganismi,•“<i>Scomparsa</i>” di una o più specie dichiarate in etichetta

Riferimenti bibliografici

- **Report of a Joint FAO/WHO** Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria - Cordoba, Argentina 1-4 October 2001
- **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.** Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food – London, Ontario, Canada 30 April - 1 May 2002
- **Rapporto Istisan 08/36.** Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano. Istituto Superiore di Sanità.
- P. Aureli , A. Fiore, C. Scalfaro, M. Casale, G. Franciosa. **National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy.** Int J of Food Microb; 2010 (137), 265–273
- **Linee Guida del Ministero della Salute,** Revisione maggio 2013