



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

Alfonsina Fiore

***Istituto Superiore di Sanità
DSPVSA***

Corso

I CONTROLLI PER I NOVEL FOOD

11 e 12 aprile 2013

Ministero della Salute – Viale Giorgio Ribotta 5, Roma

INTEGRATORI ALIMENTARI

- 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

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

Come tutti gli alimenti è necessario:

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

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)*

PERICOLO MICROBIOLOGICO

- agente biologico contenuto in un alimento, potenzialmente in grado di causare effetti nocivi sulla salute
- Microrganismi patogeni (foodborne pathogens)
- 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

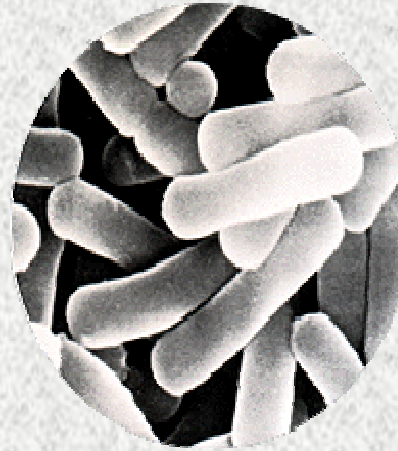
- *Batteri lattici*
 - *Fermenti Lattici*
 - *Lactic acid bacteria*
-
- *“Microrganismi vivi e vitali, che se assunti in quantità adeguate come parte di un alimento o di un integratore, esercitano un effetto benefico sulla salute dell'ospite”*

Integratori a base di probiotici

- La maggior parte dei microrganismi probiotici utilizzati negli integratori sono specie, appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.
- l'attributo probiotico è stato riconosciuto anche a microrganismi dei generi *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* ed *Enterococcus*.
- sono state avanzate tuttavia 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*.

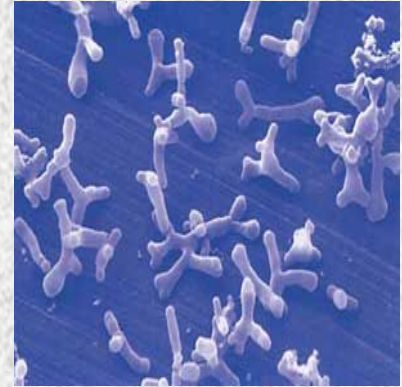
Genere *Lactobacillus*

- *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*



Caratteristiche dei Probiotici

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

Possibili meccanismi d'azione di 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
- I processi produttivi, come ad esempio l'essiccamento della coltura, possono comportare una riduzione della vitalità dei microrganismi per effetto di lesioni cellulari
- È necessario adottare accorgimenti tecnologici tesi a conservare la vitalità delle specie utilizzate e la loro durabilità per un ampio periodo di tempo.

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 10^9 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

- 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.

- 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)

PRELIEVI

Produzione

Distribuzione

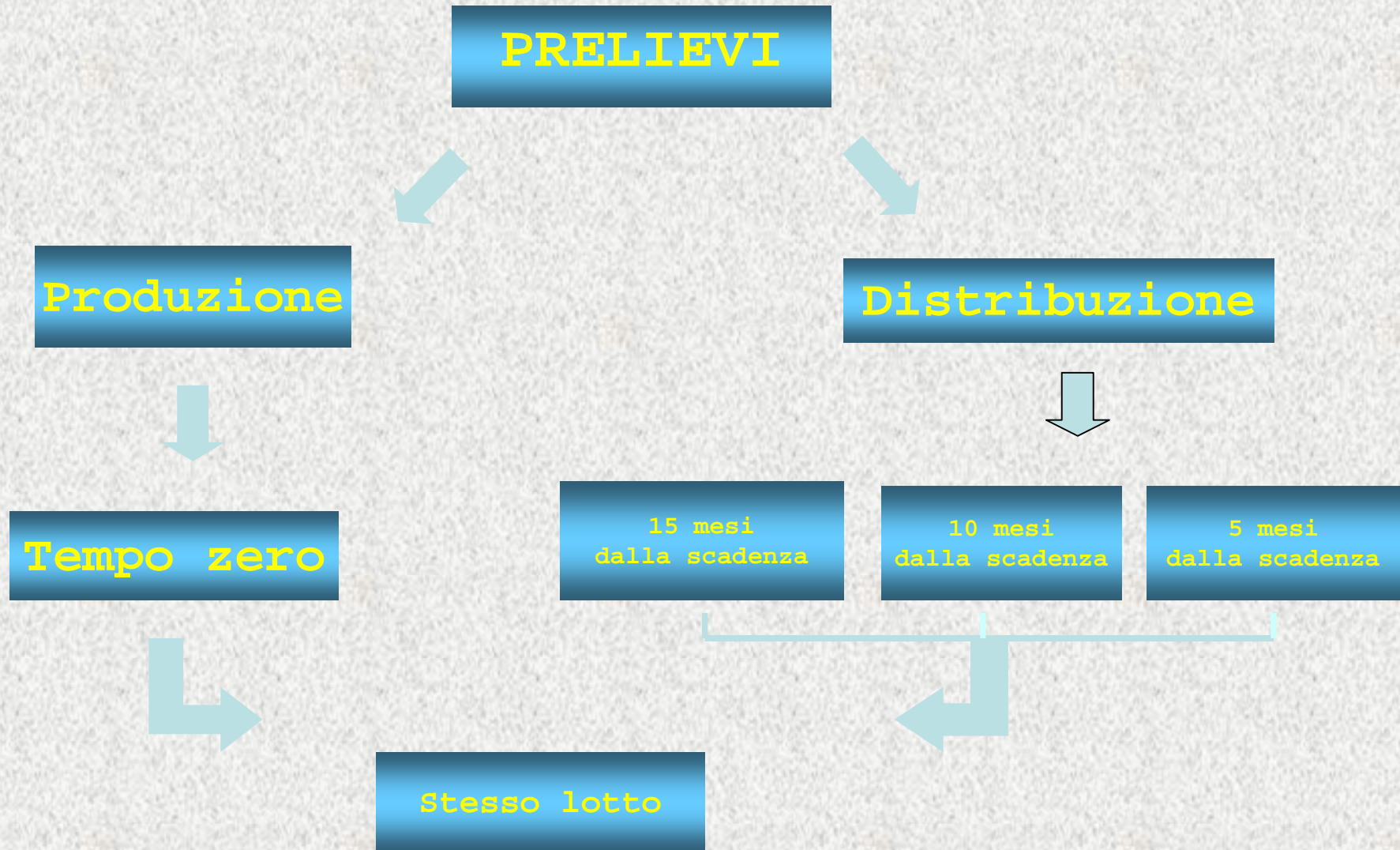
Tempo zero

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%)	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
3 (7,3%)	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%)	Numero di microrganismi e specie in accordo con i risultati della produzione
30(96,8%)	Riduzione del numero di microrganismi, “ <i>scomparsa</i> ” di una o più specie dichiarate in etichetta

Metodi di analisi

Parallelamente all' utilizzo dei tradizionali metodi microbiologici, il ricorso ai metodi molecolari appare una scelta obbligata, in quanto permettono di fugare ogni dubbio sulla reale presenza di tutte le specie previste



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

Identificazione 1

- *Caratterizzazione fenotipica*: profilo fermentativo dei carboidrati (sistemi miniaturizzati), attività enzimatica

Identificazione 2

- *Caratterizzazione genetica:*
 - a livello di specie: PCR, ARDRA-PCR
 - a livello di ceppo: RAPD-PCR, PFGE

Identificazione 3

- Caratterizzazione probiotica: resistenza ai sali biliari, a bassi valori di pH, produzione di batteriocine

PROTOCOLLO ANALITICO 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.
- Nelle fasi successive le colture vengono sottoposte a conferma dell'identità e del numero.

- **FASE I: SCREENING MOLECOLARE DELLE SPECIE MICROBICHE DICHIARATE 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**

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

- **FASE III CONFERMA GENETICA DELLE SPECIE VITALI**

1. Estrazione del DNA da coltura batterica
2. Amplificazione del DNA batterico
3. Visualizzazione dell'amplificato mediante elettroforesi

- **FASE IV: NUMERAZIONE DELLE SPECIE MICROBICHE VITALI**

1. Numerazione definitiva delle colonie
2. Risultato finale

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
- Linee guida del Ministero della Salute 2005
- 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.