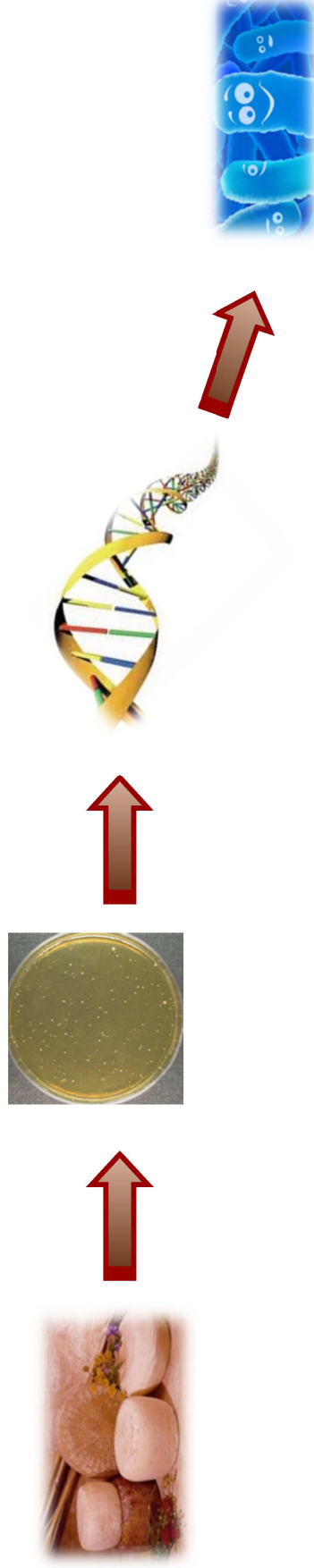


Roma, 5 aprile 2016

Attività sperimentale relativa al progetto LT08/10
“Valutazione delle caratteristiche di probioticità di ceppi di
batteri lattici isolati in prodotti alimentari tradizionali”



Dott.ssa Bianca Maria Varcasia
Laboratorio di Biotecnologie Applicate alla Sicurezza Alimentare
Direzione Operativa Controllo Alimenti - IZSLT



PROBIOTICI

La ricerca dei microrganismi probiotici

"Microrganismi che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità ($\sim 10^9$ ucf), di esercitare funzioni benefiche per l'organismo"



Figura 1. Probiotici (<http://www.precisionnutrition.com/all-about-probiotics>)

Guidelines on probiotics. Ministero della Salute, 2012
Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO-OMS, 2001



CARATTERISTICHE

Provenienza
intestinale

Possedere lo stato "QPS"
presunzione qualificata di
sicurezza (EFSA)

Sopravvivere attraverso il tratto
gastro-intestinale

Attivi e vitali alle condizioni ambientali
del tratto intestinale

Attività antagonista
nei confronti di
batteri patogeni



Stimolazione e modulazione
del sistema infiammatorio
intestinale (GALT)

Migliorare e stabilizzare la
funzione della barriera intestinale

Colonizzare l'intestino



PROBIOTICI: EFFETTI

- Neutralizzano sostanze tossiche o cancerogene (ad esempio nitriti e nitrati)
- Sintetizzano vitamine K, B2, B12, ac. pantotenico, ac. folico e biotina
- Sintetizzano gli acidi grassi a catena corta (SCFA: ac. acetico, propionico e butirrico)
- Riducono il riassorbimento degli ac. biliari con conseguente calo del colesterolo
- Effetto protettivo sulla mucosa intestinale 
- Stimolazione dell'immunità ~~umorale e cellulo-mediata~~ a livello intestinale
- Ostacolano l'attecchimento di specie patogene (altri batteri, funghi o virus) 
- Aumentano la digeribilità del lattosio nei soggetti intolleranti
- Aumentano la digeribilità dei lipidi (idrolisi dei trigliceridi alimentari in ac. grassi e glicerolo)
- Aumentano la digeribilità delle proteine (proteolisi delle proteine alimentari)
- Migliorano le malattie respiratorie di natura allergica e infettiva
- Migliorano le allergie alimentari in generale





SCOPO

Studiare la flora lattica presente nei prodotti tradizionali fermentati a base di latte crudo



Sviluppare un sistema di caratterizzazione dei batteri lattici, potenzialmente probiotici, presenti nelle flore lattiche isolate

FASI

- Studio e scelta dei prodotti tradizionali
- Campionamento dei prodotti
- Isolamento, caratterizzazione e purificazione dei ceppi di lattobatteri
- Esecuzione delle prove di probioticità *in vitro*
- Caratterizzazione molecolare dei ceppi mediante metodi molecolari
- Creazione della ceppoteca
- Esecuzione delle prove *in vivo*

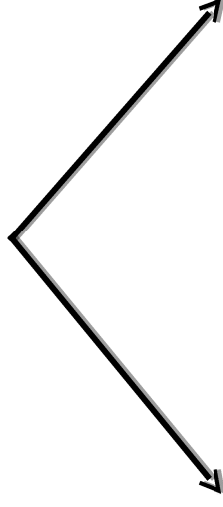


PERCHE' STUDIARE LE FLORE LATTICHE DEI PRODOTTI TRADIZIONALI

Può essere utile per definire strategie di tutela del prodotto nei requisiti di sicurezza alimentare imposti dalla normativa



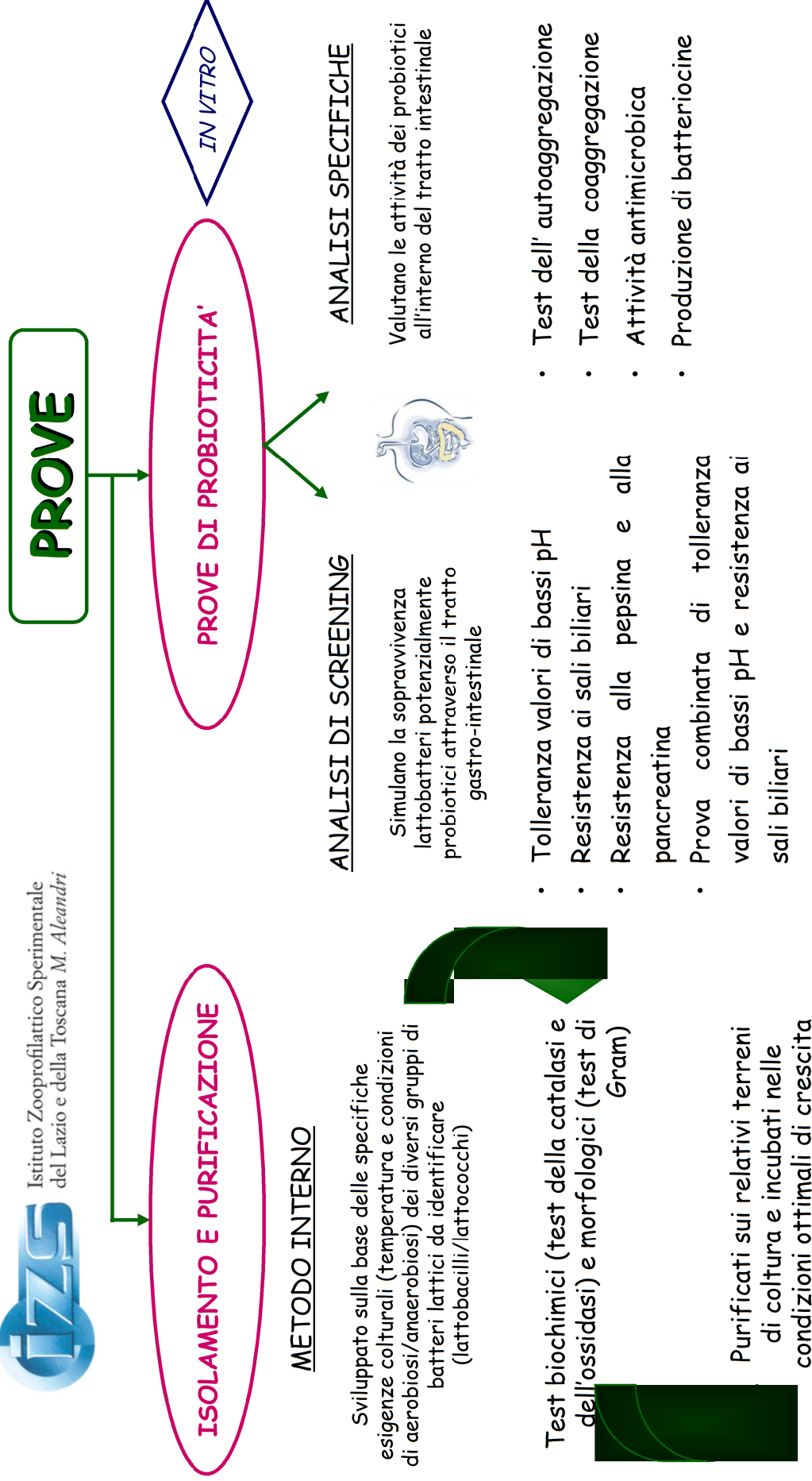
Se a questo si aggiunge la caratteristica di “probioticità” di tali specie, si potranno avere importanti ricadute sia sulle produzioni che sulla salute pubblica



Supporto alle terapie
mediche

Aumentare la sicurezza
degli alimenti dal punto di
vista microbiologico





TOLLERANZA AI BASSI pH

Verifica la capacità dei lattobatteri di sopravvivere alle condizioni di pH acido 2,5 dello stomaco

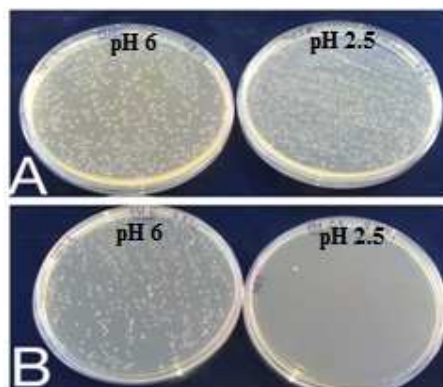


Figura 2. Prova di tolleranza a bassi valori di pH

RESISTENZA ALLA PEPSINA E ALLA PANCREATINA

Valuta la sopravvivenza dei lattobatteri all'azione degli enzimi proteolitici "pepsina e pancreatina" presenti nel tratto gastro-intestinale durante la digestione

ANALISI DI SCREENING

RESISTENZA AI SALI BILIARI

Valuta la resistenza dei lattobatteri ai sali biliari secreti nell'intestino durante la digestione

PROVA COMBINATA

Valuta la resistenza dei lattobatteri attraverso il tratto gastro-intestinale in presenza dei Sali biliari dopo la pre-esposizione ai bassi valori di pH 2.5

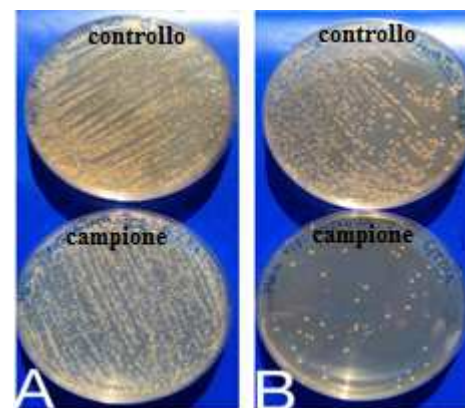


Figura 3. Prova di resistenza alla pepsina



Verifica se i lattobatteri
possiedono la capacità di
autoaggregarsi

TEST DI AUTOAGGREGAZIONE

TEST DI COAGGREGAZIONE

Valuta l'attività antimicrobica
dei lattobatteri nei confronti di
eventuali patogeni presenti nel
tratto gastro-intestinale
attraverso la formazione di
aggregati batterici

ANALISI SPECIFICHE

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA/ PRODUZIONE DI BATTERIOCINE *

Verifica l'attività
antibatterica dei
lattobatteri dovuta
alle batteriocine



* Agar spot test: tecnica che permette di valutare
l'attività antimicrobica grazie alla sola produzione di
batteriocine o sostanze batteriocine-like

Figura 4. Agar spot test





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PROVE

PROVE DI PROBIOTICITA'



IN VIVO

VALUTAZIONE DELLA COLONIZZAZIONE INTESTINALE (Pavan et al., 2003)

Somministrazione giornaliera del ceppo probiotico (10^9 ucf/ml) al gruppo target per 10 giorni e prelievo giornaliero delle feci, prima della somministrazione, per l'identificazione molecolare del ceppo

VALUTAZIONE DELLA STIMOLAZIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO (METODO INTERNO)

Valutazione dell'indice di stimolazione delle cellule della milza ad opera del mitogeno (concanavalina A), prelevate dal gruppo target

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Tecnica elettroforetica utilizzata per separare frammenti di DNA in base alle loro differenti proprietà di dissociazione o "melting" sfruttando un diverso gradiente di concentrazione del gel di acrilammide. Prima di effettuare l'elettroforesi, è necessario amplificare, mediante tecnica PCR end point, la regione V1 del 16S rRNA utilizzando oligonucleotidi primers specifici

SEQUENZIAMENTO

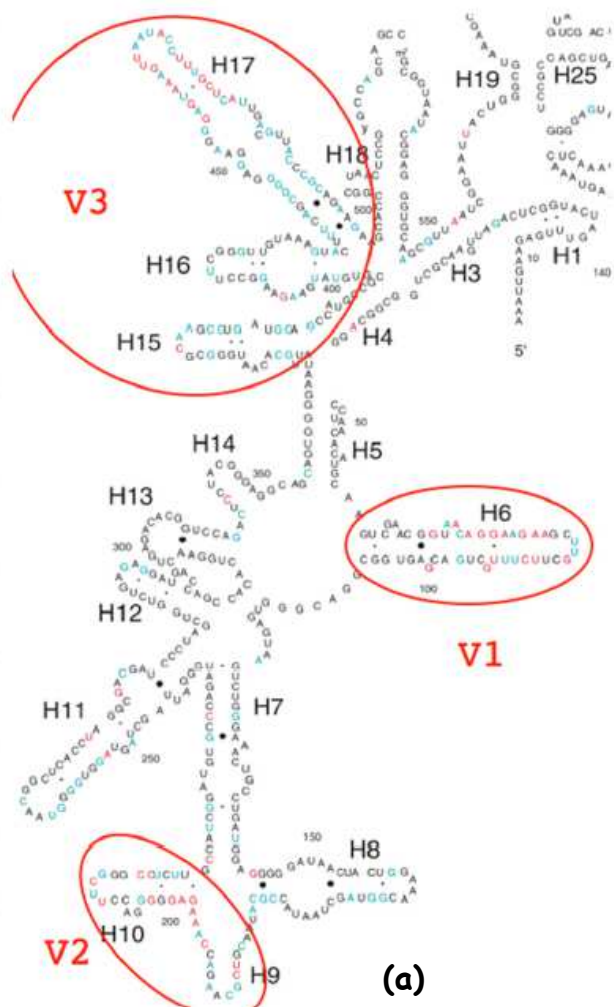
Tecnica che permette di ricostruire l'ordine delle basi azotate che si susseguono all'interno di un tratto di DNA relativo alla regione V1 del 16S rRNA. La sequenza ottenuta viene confrontata con quella presente nelle banche dati di riferimento; l'appartenenza ad una specie viene fatta sulla base della maggiore omologia genetica



PRINCIPIO DEI METODI

MOLECOLARI UTILIZZATI

Analisi delle regioni
ipervariabili V1-V3 del gene
per la molecola 16S RNA
ribosomiale (16S rRNA)



(a)



CONSERVED REGIONS: unspecific applications

VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

(b)

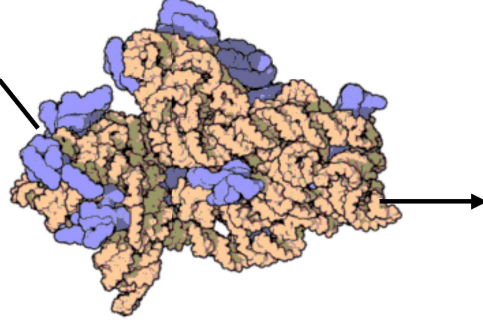
Figura 5. (a) Molecola 16S RNA ribosomiale (16S rRNA); (b) 9 regioni ipervariabili all'interno della sequenza genica del 16S rRNA



Molecola 16S rRNA

Elemento costitutivo, insieme alle proteine, dei ribosomi: organelli di circa 200Å, coinvolti nella sintesi proteica

PROTEINE



piccola subunità del ribosoma

Figura 6. Subunità del 16S rRNA

• Procarioti (70S) 2 subunità:

- 30S: una molecola 16S rRNA
- 50S: due molecole 5S e 23S rRNA

• Eucarioti (80S) 2 subunità:

- 40S: una molecola 18S rRNA.
- 60S: tre molecole 28S, 5.8S e 5S rRNA



- PRODOTTI TRADIZIONALI A BASE DI LATTE: N. 5 di cui 3 prodotti nella regione Toscana e 2 nella regione Lazio
- CRITERI DI SCELTA:
 - Formaggi a latte crudo di diverse specie (caprino, ovino e bufalino)
 - Assenza di starter industriali (al fine di studiare la flora autoctona del posto, selezionata naturalmente durante la produzione)
 - Forte peculiarità e rilevanza socio economico nel territorio di appartenenza
- N. 3 prelievi, ciascuno riferibile ad un lotto diverso di produzione del formaggio in esame, a fine stagionatura

PRODOTTO	PRODUTTORE
Pecorino di Picinisco	Caseificio di Pia Marcello - Settefrati (FR)
Caciotta di capra	Caseificio Valle di Mezzo Località Toppole Valle di Mezzo - Anghiari (AR)
Caprino di Scilla	Azienda Agricola Angela Saba - Massa Marittima (GR)
Pecorino della Montagna Pistoiese	Consorzio Montagne e Valli di Pistoia (PT)
Provolone di bufala	Caseificio Ventre Daniele - Latina (LT)

Tabella 1. Elenco dei prodotti e dei produttori oggetto dello studio



PRODOTTI TRADIZIONALI

PECORINO DI PICINISCO

Formaggio a latte crudo ovino di pecore Sopravvissana, Comisana, Massese e loro meticci, tipico della Valle di Comino (FR)



Figura 7. Pecorino di Picinisco (Caseificio di Pia Marcello)

CACIOTTA DI CAPRA

Formaggio a latte crudo caprino della specie Camosciata delle Alpi, originario delle vallate alpine, proveniente dalla località di Anghiari (AR)



Figura 8. Caciotta di capra (Caseificio ABCHEESE DI BRENT ZIMMERMAN & C.)

PECORINO DELLA MONTAGNA PISTOIESE

Formaggio a latte crudo ovino pecora, solo razza Massese, prodotto nella zona dell'Appennino pistoiese (PT)



Figura 9. Pecorino della Montagna Pistoiese (Azienda Agricola La Buca)

CAPRINO DI SCILLA

Formaggio ottenuto dalla lavorazione del latte delle nostre capre, con aggiunta di caglio e sale e senza alcun utilizzo di fermenti e conservanti. Proveniente dalla località Massa Marittima (GR)



Figura 10. Caprino di Scilla (Azienda Agricola Saba)

PROVOLONE DI BUFALA

Formaggio a pasta filata prodotto in diverse forme (cilindrica, sferica o a pera), generalmente contenuto in reti di corda o di giunco. Il sapore può essere dolce o piccante in base al grado di stagionatura. L'area di produzione interessa la provincia di Latina



Figura 11. Provolone di bufala (Caseificio Ventre Daniele)



1. ISOLAMENTO

Dai 5 prodotti tradizionali delle regioni Lazio e Toscana analizzati, sono stati isolati complessivamente **n. 216 ceppi** di batteri lattici così ripartiti:

N. 43 ceppi dal Pecorino di Picinisco, di cui n. 26 lattococchi e n. 17 lattobacilli

N. 77 ceppi dal Pecorino della Montagna Pistoiese, di cui n. 47 lattococchi e n. 30 lattobacilli

N. 12 ceppi dalla Caciotta di capra, di cui n. 3 lattococchi e n. 9 lattobacilli

N. 54 ceppi dal Provolone bufala, di cui n. 36 lattococchi e n. 18 lattobacilli

N. 30 ceppi dal Caprino di Scilla, tutti lattobacilli

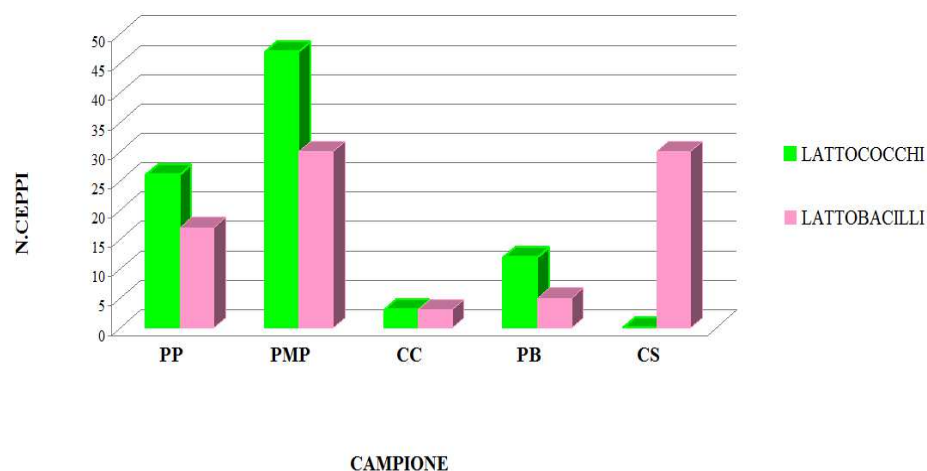


Grafico 1. Frequenza assoluta dei ceppi di lattococchi e lattobacilli isolati dai prodotti tradizionali analizzati



Tabella 2. Ceppi di batteri lattici analizzati isolati dal Pecorino di Picinisco (PP), dal Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP), dalla caciotta di capra (CC), dal caprino di Scilla (CS) e dal provolone di bufala (PB)

CAMPIONE	CEPPI			CEPPI VITALI	CEPPI NON VITALI
	LATTOCOCCHI	LATTOBACILLI	TOTALE		
Pecorino di Picinisco (PP)	26	17	43	43	-
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	47	30	77	77	-
Caciotta di Capra (CC)	3	9	12	6	6
Provolone di Bufala (PB)	36	18	54	17	37
Caprino di Scilla (CS)	-	30	30	30	-
TOTALE	112	104	216	173	43



2. ANALISI DI SCREENING

2.1 Prove di tolleranza a bassi pH

CRITERIO DI VALUTAZIONE RISULTATO: i ceppi che presentano una percentuale di sopravvivenza al termine del periodo di incubazione (T_2) $\geq 60\%^*$ rispetto al tempo iniziale (T_0) sono considerati "Tolleranti" a bassi pH (*limite minimo fissato arbitrariamente come discriminante)

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	43	10	33	30
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	77	37	40	37
Caciotta di Capra (CC)	6	0	6	5
Provolone di Bufala (PB)	17	4	13	12
Caprino di Scilla (CS)	30	12	18	16
TOTALE	173	63	110	100

Tabella 3. Risultati della prova di tolleranza a bassi pH

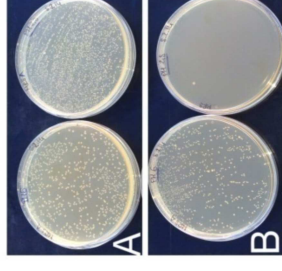


Figura 12. Prova di tolleranza a bassi pH: (A) campione tollerante e (B) non tollerante

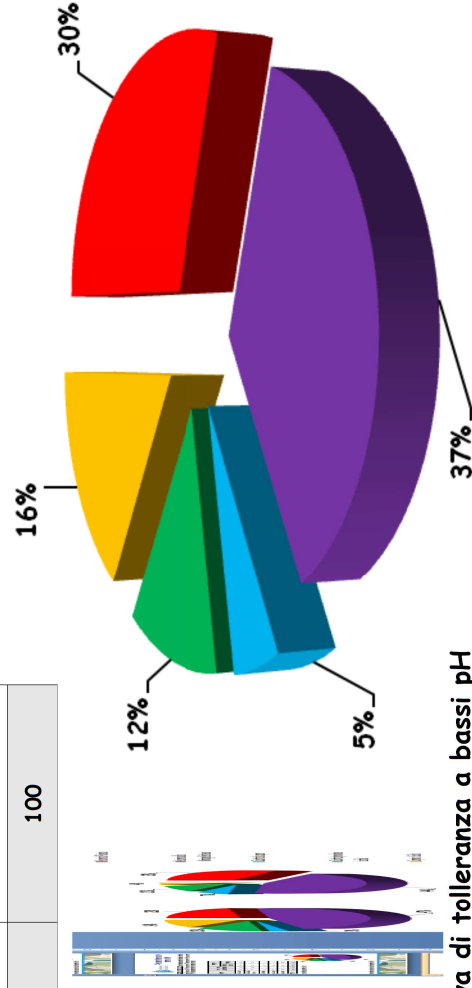


Grafico 2. Distribuzione percentuale dei ceppi di LAB positivi a prova di tolleranza a bassi pH





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

2.2 Resistenza ai sali biliari

CRITERIO DI VALUTAZIONE RISULTATO: i ceppi che presentano una percentuale di sopravvivenza al termine del periodo di incubazione $\geq 60\%^*$ rispetto al controllo sono considerati "Resistenti" ai sali biliari (*limite minimo fissato arbitrariamente come discriminante)

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	43	15	28	23
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	77	26	51	42
Caciotta di Capra (CC)	6	1	5	4
Provolone di Bufala (PB)	17	4	13	11
Caprino di Scilla (CS)	30	6	24	20
TOTALE	173	52	121	100

Tabella 4. Risultati della prova di resistenza ai sali biliari

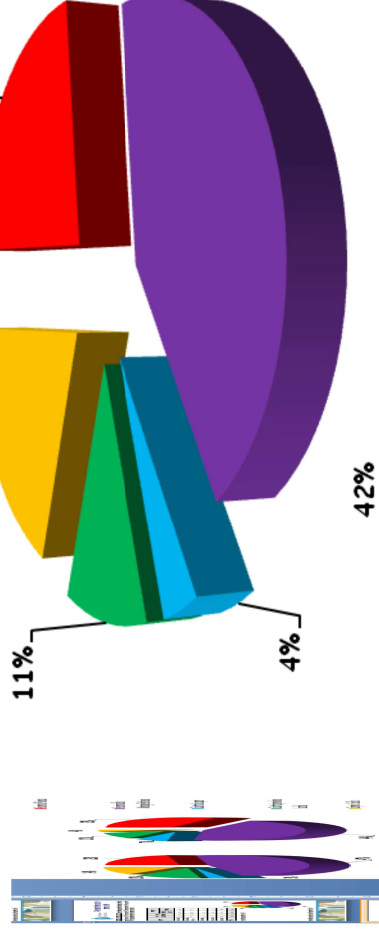


Grafico 3. Distribuzione percentuale dei ceppi di LAB positivi a prova resistenza ai sali biliari



2.3 Prova combinata di tolleranza a bassi pH e resistenza ai sali biliari

CRITERIO DI VALUTAZIONE RISULTATO: i ceppi che presentano una percentuale di sopravvivenza, al termine del periodo di incubazione, $\geq 60\%^*$ rispetto al tempo iniziale (T_0) nella piastra contenente i sali biliari, sono considerati "Positivi" alla prova combinata (*limite minimo fissato arbitrariamente come discriminante)

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	43	20	23	26
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	77	42	35	39
Caciotta di Capra (CC)	6	1	5	5
Provolone di Bufala (PB)	17	4	13	14
Caprino di Scilla (CS)	30	15	15	16
TOTALE	173	82	91	100

Tabella 4. Risultati della prova combinata

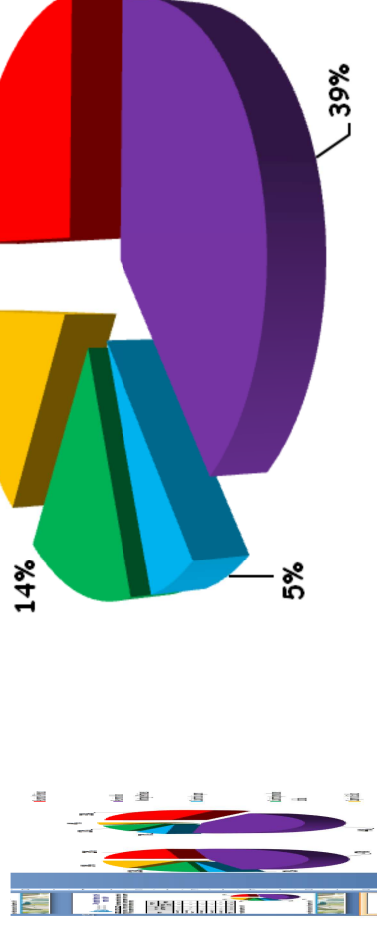


Grafico 3. Distribuzione percentuale dei ceppi di LAB positivi alla prova combinata



2.4 Prova di prova di resistenza alla pepsina

CRITERIO DI VALUTAZIONE RISULTATO: i ceppi che presentano una percentuale di sopravvivenza dopo essere stati a contatto con l'enzima per circa 1h (T_1) e 2h (T_2) è $\geq 60\%$ rispetto alla crescita senza contatto (T_0) sono considerati "Resistenti" alla pepsina (*limite minimo fissato arbitrariamente come discriminante)

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	43	20	23	33
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	77	47	30	44
Caciotta di Capra (CC)	6	1	5	7
Provolone di Bufala (PB)	17	9	8	12
Caprino di Scilla (CS)	30	27	3	4
TOTALE	173	107	69	100

Tabella 5. Risultati della prova di resistenza alla pepsina

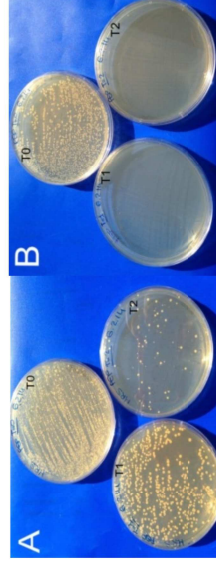


Figura 13. Ceppi di batteri LAB negativi alla prova di resistenza alla pepsina

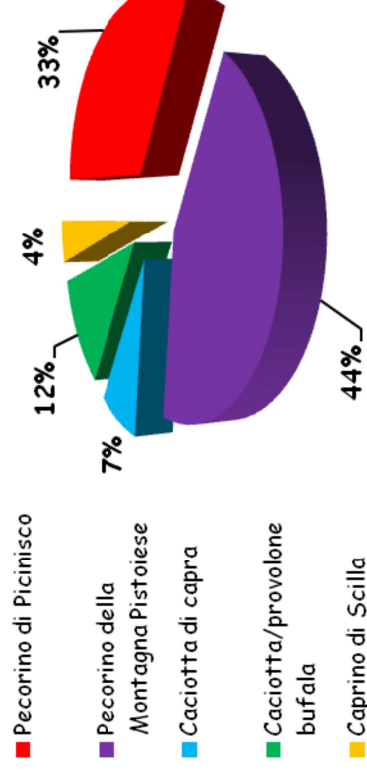


Grafico 4. Distribuzione percentuale dei ceppi di LAB positivi alla prova di resistenza alla pepsina



2.5 Prova resistenza alla pancreatina

CRITERIO DI VALUTAZIONE RISULTATO: i ceppi che presentano una percentuale di sopravvivenza dopo essere stati contatto con l'enzima per circa 4h (T_1) è $\geq 60\%$ rispetto alla crescita senza contatto (T_0) sono considerati "Resistenti" alla pancreatina (*limite minimo fissato arbitrariamente come discriminante)

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	43	16	27	23
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	77	21	56	47
Caciotta di Capra (CC)	6	2	4	3
Provolone di Bufala (PB)	17	1	16	13
Caprino di Scilla (CS)	30	13	17	14
TOTALE	173	53	120	100

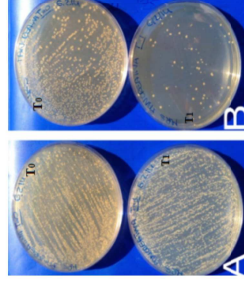


Figura 14. Ceppi di batteri LAB negativi alla prova di resistenza alla pancreatina

Tabella 6. Risultati della prova di resistenza alla pancreatina

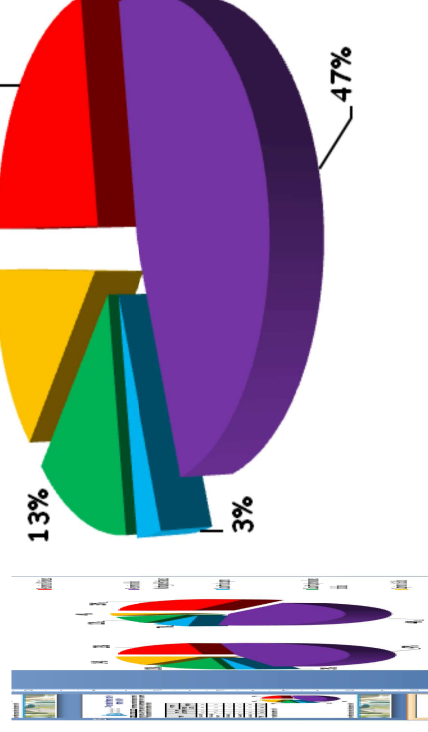


Grafico 5. Distribuzione percentuale dei ceppi di LAB positivi alla prova di resistenza alla pancreatina



I CEPPI CHE HANNO SUPERATO TUTTE LE ANALISI DI SCREENING SONO STATI SOTTOPOSTI ALLE ANALISI SPECIFICHE



PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	43	29	14	27
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	77	54	23	45
Caciotta di Capra (CC)	6	2	4	8
Provolone di Bufala (PB)	17	9	8	16
Caprino di Scilla (CS)	30	28	2	4
TOTALE	173	122	51	100

Tabella 7. Ceppi di LAB sottoposti alle analisi di screening

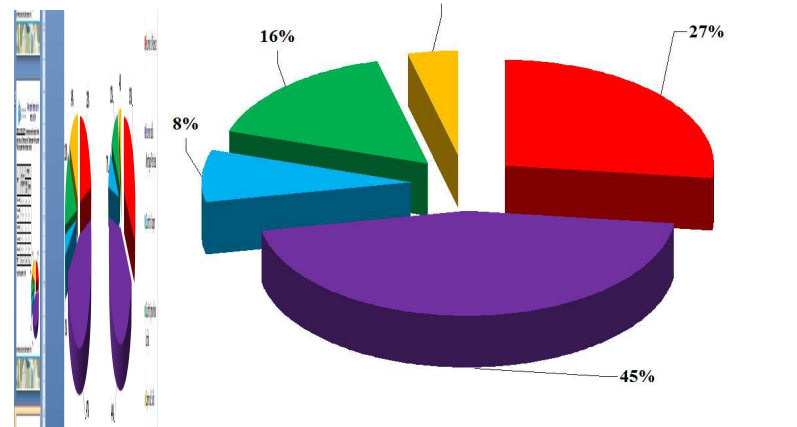


Grafico 6. Distribuzione percentuale dei ceppi di LAB positivi alle analisi di screening



3. ANALISI SPECIFICHE

3.1 Autoaggregazione

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI POSITIVI	CEPPI NEGATIVI
Pecorino di Picinisco (PP)	14	14	0
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	23	23	0
Caciotta di Capra (CC)	4	4	0
Provolone di Bufala (PB)	8	8	0
Caprino di Scilla (CS)	2	2	0
TOTALE	51	51	0

Tabella 8. Risultati della prova di autoaggregazione

3.2 Coaggregazione

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI POSITIVI	CEPPI NEGATIVI
Pecorino di Picinisco (PP)	14	14	0
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	23	23	0
Caciotta di Capra (CC)	4	4	0
Provolone di Bufala (PB)	8	8	0
Caprino di Scilla (CS)	2	1	1
TOTALE	51	50	1

Tabella 9. Risultati della prova di coaggregazione

CRITERIO DI VALUTAZIONE RISULTATO: la prova viene considerata positiva se, visivamente, sono presenti aggregati formati da batteri lattici e patogeni, con evidente variazione di densità ottica rilevata mediante spettrofotometro. In caso di mancanza di aggregati batterici e variazione di densità ottica, la prova è considerata negativa



3.3 Attività antibatterica/produzione di batteriocine (*Spot on the lawn*)

CRITERIO DI VALUTAZIONE RISULTATO: la prova è considerata positiva quando, sulla piastra seminata con un patogeno si forma un alone di inibizione intorno alle colonie dei batteri lattici da testare di circa 0,5 mm di diametro. Nel caso in cui l'alone è <0,5 mm o non è presente, la prova è considerata negativa

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	14	10	4	13
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	23	3	20	64
Caciotta di Capra (CC)	4	0	4	13
Provolone di Bufala (PB)	8	5	3	10
Caprino di Scilla (CS)	1	1	0	0
TOTALE	50	19	31	100

Tabella 10. Ceppi di LAB sottoposti alla prova di *Spot on the law*



Grafico 6. Distribuzione percentuale dei ceppi di LAB allo *Spot on the law*



PROVE DI PROBIOTICITA': conclusioni

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	14	10	4	13
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	23	3	20	65
Caciotta di Capra (CC)	4	0	4	13
Provolone di Bufala (PB)	8	5	3	9
Caprino di Scilla (CS)	1	1	0	0
TOTALE	50	19	31	100

Tabella 11. Ceppi di LAB sottoposti alle prove di probioticità

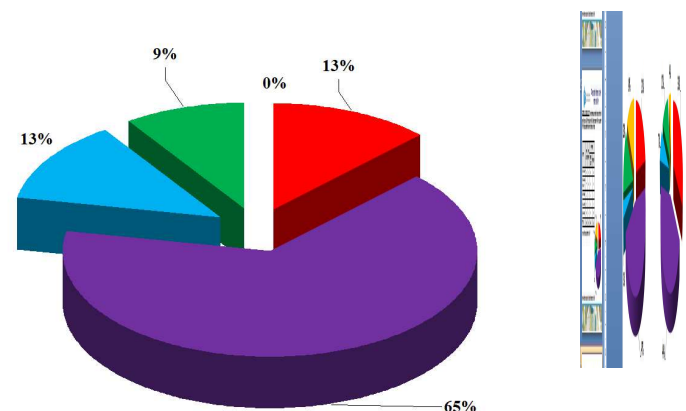


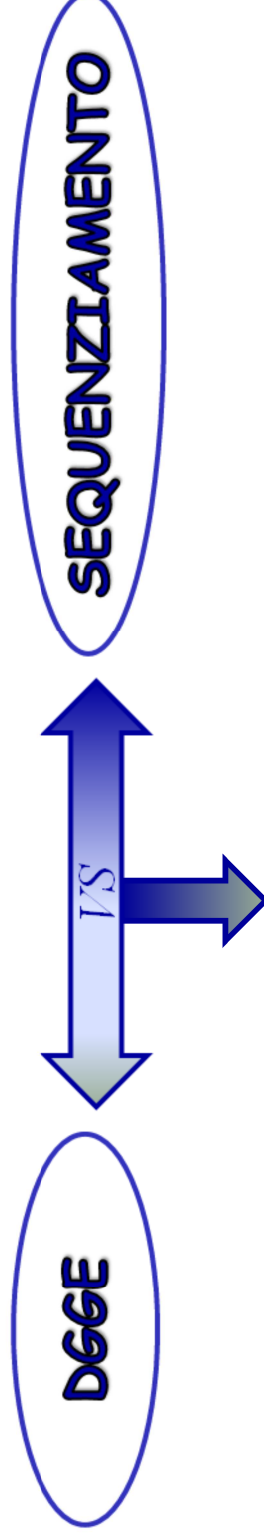
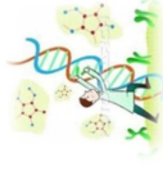
Grafico 6. Distribuzione percentuale dei ceppi di LAB positivi alle prove di probioticità



I CEPPI CHE HANNO SUPERATO TUTTE LE PROVE DI PROBIOTICITA' SONO DEFINITI «POTENZIALMENTE PROBIOTICI»



4. IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE



PRODOTTO	N. CEPPI	SPECIE	N. CEPPI
PECORINO DI PICINISCO	4	<i>Lactococcus lactis</i> sub. <i>lactis</i>	2
		<i>Staphylococcus</i> spp.	1
		<i>Lactobacillus casei</i>	1
PECORINO DELLA MONTAGNA PISTOIESE	20	<i>Lactobacillus casei</i>	15
		<i>Lactobacillus paracasei</i>	1
		N.D.	4
CACIOTTA DI CAPRA	4	<i>Lactobacillus casei</i>	2
		<i>Enterococcus</i> spp.	1
		N.D.	1
PROVOLONE DI BUFALA	3	<i>Lactobacillus casei</i>	2
		<i>Enterococcus</i> spp.	1

Tabella 12. Ceppi di LAB identificati mediante DGE e sequenziamento



5. PROVE IN VIVO



Lactococcus lactis sub. lactis

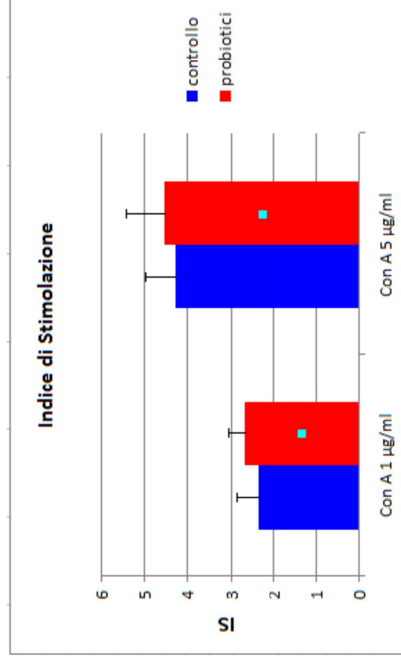
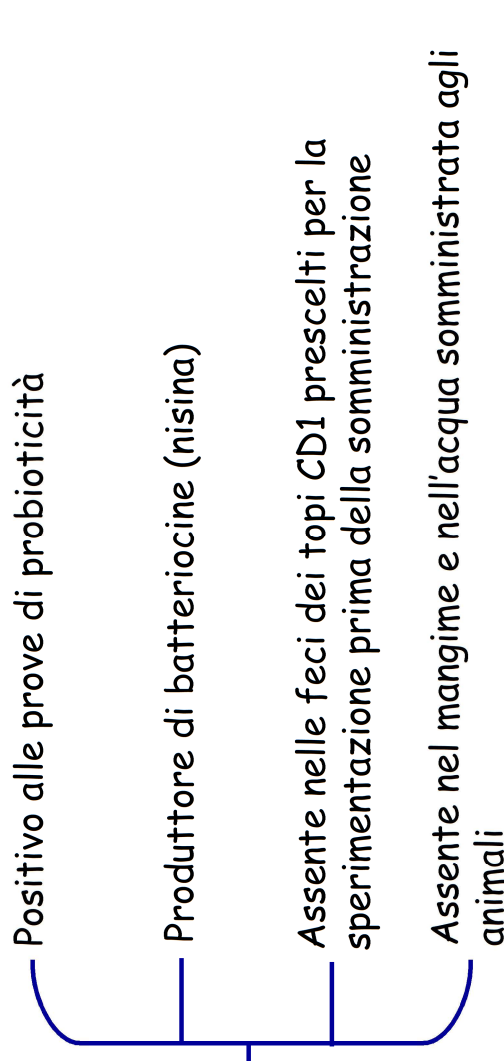


Grafico 7. Indici di immunostimolazione con ConA su 2 gruppi di topi (trattato e non trattato)

RISULTATI

- Non è stato possibile re-isolare lo stesso dalle feci
- Le prove di immunostimolazione eseguite a fine somministrazione non hanno fornito risultati statisticamente significativi (T di Student) tra i gruppi di animali trattati e quelli di controllo ($p < 0.05$)



CONCLUSIONI

- LAB candidati probiotici sul totale dei ceppi isolati è risultato relativamente basso, anche se con notevoli differenze da prodotto a prodotto [Pecorino della Montagna Pistoiese (65%), Caciotta di capra (13%), Pecorino di Picinisco (12%) e Provolone di bufala (9%)]
- Di 173 ceppi LAB di partenza, solo 31 sono stati considerati "potenzialmente probiotici". Questa selezione era in ogni modo attesa e concorda con i dati già riportati dalla letteratura scientifica (Aureli, 2013), infatti è noto che non tutti i ceppi di batteri lattici riescono a sopravvivere lungo il tratto gastrointestinale e a colonizzare l'intestino (Fioravanti et al., 2003)
- La caratterizzazione molecolare dei ceppi, effettuata esclusivamente sui ceppi portatori di caratteristiche di probioticità promettenti, ha portato all'individuazione di 6 specie di batteri lattici con l'identificazione di 2 ceppi di *Lactococcus lactis* sub. *lactis*, 20 ceppi di *Lactobacillus casei*, 1 ceppo di *Lactobacillus paracasei*, 1 ceppi di *Staphylococcus* spp. e 2 ceppi di *Enterococcus* spp.



CONCLUSIONI

- Tutti i ceppi sottoposti al test *Spot on the lawn* sono risultati produttori di batteriocine. Per i 2 ceppi di *Lactococcus lactis* sub. *lactis*, è stata confermata la presenza di nisina, mediante saggi PCR (Rapporti ISTISAN 12/54; Lakshminarayanan et al., 2013)
- Il non isolamento del ceppo di *Lactococcus lactis* sub. *lactis* dai topi CD1, è probabilmente dovuto alla difficoltà di colonizzazione del medesimo nell'intestino che potrebbe dipendere:
 - Dalla non idonea quantità di batteri somministrata ai topi, nonostante il protocollo utilizzato si sia basato su dati della letteratura (Kimono et al., 2003)
 - Dalle caratteristiche intrinseche del ceppo prescelto

Tuttavia si deve sottolineare che la quantità ottimale di batteri probiotici vivi da somministrare non è in realtà di facile determinazione in quanto è ceppo-dipendente (Vinderola et al., 2000) e, probabilmente, è anche funzione del tipo di beneficio che si intende ottenere





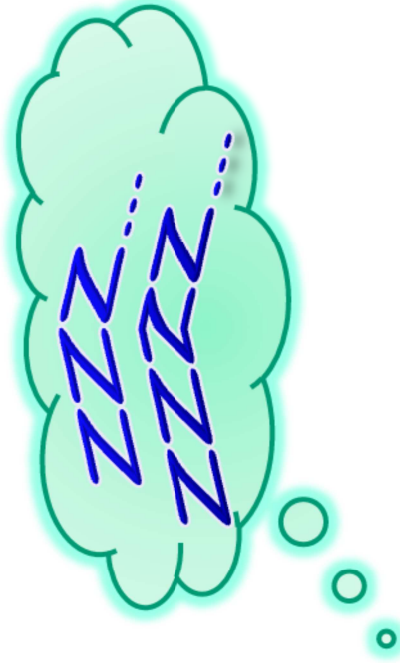
CONCLUSIONI

- La mancata stimolazione del sistema immunitario in risposta all'attività mitogena della Concanavalina A (ConA) ha vanificato la valutazione del profilo delle citochine pro-infiammatorie.
- Tuttavia il ritrovamento nei prodotti tradizionali di LAB con caratteristiche di probioticità, riflette la presenza, negli ambienti di produzione, di una flora lattica che merita sicuramente ulteriori approfondimenti scientifici anche per quanto riguarda l'oramai ben nota attività antagonista dei LAB nei confronti delle flore patogene





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Grazie per l'attenzione ...

