

Gianluca Ianiro, Giusi Desirè Sciumè, Antonio Gasbarrini

Area Gastroenterologica e Oncologica,  
Fondazione Policlinico Universitario  
Agostino Gemelli IRCCS, Università Cattolica  
del Sacro Cuore, Roma, Italia

# Nuove acquisizioni sui probiotici: dalla ricerca alla pratica clinica

## INTRODUZIONE E GENERALITÀ

### Definizione

I probiotici sono definiti come microorganismi vivi che, ove somministrati in dosi adeguate, conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite.

Le formulazioni di probiotici più comunemente usate contengono lattobacilli, bifidobatteri e, meno frequentemente, *E. coli*, streptococchi, enterococchi, *Bacillus spp.*, lieviti es. *Saccharomyces boulardii*.

Altri possibili modulatori del microbiota intestinale sono i prebiotici e i simbiotici.

I prebiotici sono prodotti selettivamente fermentati, i quali determinano uno specifico cambiamento nella composizione e attività del microbiota intestinale, determinando un miglioramento dello stato di salute. I prebiotici più comunemente utilizzati in pratica clinica sono l'inulina, i fruttoligosaccaridi (FOS) e i galattoligosaccaridi (GOS).

I simbiotici sono prodotti contenenti sia probiotici che prebiotici.

### Meccanismi d'azione

Numerose evidenze hanno dimostrato che i probiotici agiscono tramite numerosi meccanismi benefici all'interno dell'organismo.

Essi includono:

- l'inibizione dell'adesione e della crescita dei patogeni;
- la modulazione del microbiota intestinale;

- il miglioramento della funzione della barriera intestinale;
- la differenziazione e stimolazione della risposta immunitaria sistemica o mucosale.

Sebbene alcuni di tali effetti possano essere legati all'utilizzo dei più comuni generi di probiotici, molti di essi sono specifici per specie o ceppo.

### Regolamentazione dei probiotici

Secondo le linee guida WHO/FAO (*World Health Organization/Food and Agriculture Organization*) ogni probiotico deve essere identificato in base al suo genere, specie, sottospecie (se presente) e da un codice alfanumerico che ne identifica il ceppo specifico.

Definire il preciso ceppo utilizzato come probiotico è fondamentale, in quanto ciascun ceppo ha specifici effetti benefici ad esso legati. Nonostante questa specificità, sta diventando sempre più evidente che alcuni meccanismi d'azione dei probiotici sono condivisi da più ceppi, specie o addirittura generi.

Inoltre, la *World Gastroenterology Organization* (WGO) suggerisce che ogni prodotto contenente probiotici debba indicare nel proprio foglietto illustrativo:

- il genere, la specie e il ceppo identificativo, con la corretta nomenclatura;
- il numero di ceppi vitali fino al termine della scadenza;
- il tipo di conservazione;
- indicazioni sulla sicurezza;

- dose raccomandata, la quale dovrebbe basarsi sull'induzione dell'effetto fisiologico;
- un'accurata descrizione degli effetti fisiologici, per quanto sia ammesso dalla legge;
- contatti per la farmacovigilanza.

## CARATTERISTICHE DEI PROBIOTICI

Le preparazioni di probiotici attualmente disponibili sul mercato per il consumo da parte dell'uomo sono commercializzate principalmente come prodotti medicinali o alimenti (integratori alimentari e cibi fermentati o nuovi alimenti), con una progressiva introduzione di nuove formulazioni nel mercato. I probiotici convenzionali contengono colture singole o multiple di microorganismi o spore batteriche e sono venduti come pillole, capsule, bustine, granulati o sospensioni. Il *Working Group for Probiotics and Prebiotics* dell'ESPGHAN (*European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) ha recentemente stabilito che le formulazioni di probiotici assunte per via orale devono contenere un numero sufficiente di microorganismi vivi fino alla loro scadenza, e che devono essere esenti da contaminazioni. I dati delle analisi sulla qualità dei probiotici in commercio in Europa, Sud Africa, Taiwan, India e Pakistan, e negli USA indicano spesso che il loro contenuto non corrisponde alle informazioni riportate sul foglietto illustrativo, in termini di specie, variabilità, numero di microorganismi e purezza.

Dal punto di vista clinico, la somministrazione di probiotici che non soddisfano i requisiti di qualità porta più facilmente a un'efficacia ridotta o addirittura assente, e rappresenta un potenziale rischio infettivo per il paziente se vi sono contaminazioni da parte di patogeni o patogeni opportunisti.

Esistono diverse caratteristiche che un probiotico commerciale dovrebbe imprescindibilmente possedere per poter essere attivo e vitale all'interno dell'intestino, e quindi poter essere definito di elevata qualità.

Esse comprendono:

- la stabilità, ovvero la capacità di mantenere un numero adeguato di CFU (*colony-forming units*, unità formanti colonie) fino alla data di scadenza del prodotto;
- la sopravvivenza nell'ambiente acido che incontreranno durante il transito gastrico;

- la sopravvivenza ai sali biliari e ai succhi pancreatici;
- la capacità di adesione alla mucosa intestinale.

Inoltre, un probiotico di qualità deve essere in grado di fornire un ottimo profilo di sicurezza.

Sono stati effettuati diversi studi in vitro per acquisire informazioni relative a tali caratteristiche delle formulazioni probiotiche. In particolare, esistono due principali modelli per testare tali proprietà, il sistema gastro-duodenale ed il sistema digerente artificiale. Il sistema gastro-duodenale misura la sopravvivenza dei microorganismi prima nell'ambiente gastrico (pH acido+ pepsina) e poi a livello duodenale (pH 6,9 + sali biliari + tripsina + pre-pancreatina).

Fra i sistemi digerenti artificiali, uno dei più performanti è il sistema digerente artificiale TIM-1. Questo sistema è composto da più comparti che simulano lo stomaco, il duodeno, il digiuno e l'ileo ed è continuamente controllato da un computer. In tal modo esso è in grado di riprodurre in condizioni il più possibile fisiologiche i movimenti peristaltici, la secrezione di enzimi digestivi il transito intestinale e l'assorbimento dei prodotti della digestione. L'uso di questo sistema consente di determinare i ceppi o le associazioni di ceppi in grado di sopravvivere durante il transito intestinale e di raggiungere il colon sotto forma vitale.

In generale, tali modelli hanno evidenziato un comportamento eterogeneo a seconda delle specie e dei ceppi analizzati. Sulla base di tali osservazioni, appare indispensabile acquisire delle conoscenze riguardo alle proprietà funzionali delle formulazioni di probiotici, per indirizzare la scelta dei clinici tra i diversi prodotti.

## Numero delle CFU e stabilità

I probiotici devono essere somministrati alla dose adeguata per espletare il proprio ruolo terapeutico, inoltre devono avere la capacità di rimanere vitali fino alla data di scadenza. Nel foglietto illustrativo vanno indicati il numero di CFU, la corretta nomenclatura specificando genere, specie e ceppo di tutti gli organismi nella formulazione.

La dose necessaria varia molto a seconda del prodotto e del suo utilizzo, per cui il dosaggio adeguato non può seguire un criterio generale ma deve basarsi su degli studi scientifici ed essere valutato in base al quadro clinico.

### Resistenza al pH gastrico

La resistenza al pH gastrico viene solitamente valutata tramite incubazione dei ceppi selezionati per 1-2 ore a 37°C in succo gastrico artificiale costituito da un ambiente a pH 1,4-1,5 con l'aggiunta di pepsina. Ciò viene effettuato per calcolare la percentuale di sopravvivenza all'acidità dei ceppi testati. Più alta è la percentuale di sopravvivenza, maggiore è la capacità dei ceppi selezionati di superare il passaggio gastrico.

### Resistenza ai sali biliari

Per valutare la resistenza ai sali biliari, i ceppi candidati vengono testati in un ambiente che simuli le condizioni presenti in duodeno in presenza di sali biliari, pancreatina e pH alcalino (8,0). In vitro viene così studiata la capacità proliferativa del ceppo candidato, prima in condizioni basali e poi in presenza di bile, che è un forte tensioattivo. Tale misurazione viene solitamente eseguita mediante valutazione spettrofotometrica della torbidità nel tempo.

### Adesione all'epitelio intestinale

Una volta raggiunto il colon, il ceppo o i ceppi candidati devono aderire alle cellule intestinali epiteliali al fine di colonizzare la mucosa intestinale, condizione fondamentale per sviluppare le proprie specifiche attività. Sono state messe a punto nel corso degli anni delle metodiche atte a valutare lo stato di adesione dei singoli ceppi alle cellule intestinali; una di queste è caratterizzata dallo studio in vitro del grado di adesione dei ceppi candidati a linee cellulari LMH di pollo.

### Sicurezza

La maggior parte dei probiotici derivano da alimenti fermentati o da microrganismi commensali dei soggetti sani. Vengono utilizzati principalmente da soggetti in buono stato di salute, per cui l'utilizzo in persone con gravi comorbidità o alterazioni immunitarie dovrebbe essere valutato attentamente. Inoltre la produzione di questi prodotti dovrebbe garantire l'assenza di contaminazione del prodotto finale, per evitare l'assunzione di ceppi potenzialmente patogeni.

### Ruolo delle spore

Alcuni probiotici (es. *B. clausii*) sono disponibili sul mercato in forma di spore. Le spore sono delle forme resistenti alla degradazione acida e pancreaticata, per cui possono avere un ruolo nell'assicurare la sopravvivenza dei microrganismi durante il transito gastrointestinale. Questa caratteristica di resistenza è però diversa tra le varie specie. Le spore possiedono anche la capacità di replicarsi in presenza di condizioni favorevoli, per cui alcuni ceppi, come per esempio *B. clausii*, hanno un'attiva proliferazione a livello del colon, portando ad un aumento delle CFU.

### CARATTERISTICHE DEI PROBIOTICI DI QUALITÀ: NUOVE EVIDENZE

Un recente studio pubblicato da Vecchione e colleghi ha analizzato i dieci principali probiotici in commercio sul mercato italiano, valutandone la formulazione in termini di specie presenti, numero totale di microrganismi (CFU) e spore, nonché la loro resistenza al transito intestinale. Sono stati analizzati i seguenti prodotti: Enterogermina 2 miliardi; Enterolactis Plus; Lactoflorene Plus; Reuflor; Codex; Prolife; Dicoflor; Enterelle; Yovis; VSL#3.

### Metodi

#### Identificazione dei microbi e loro conta

Le preparazioni incapsulate e liofilizzate sono state dissolte in acqua sterile immediatamente prima delle analisi. Le formulazioni in cui si riportava la presenza di microrganismi formanti spore sono state divise in due aliquote. Un'aliquota è stata sottoposta a trattamento di calore a 80°C per 15 minuti prima di essere messa in piastra. Sia le sospensioni sottoposte a trattamento di calore che quelle non trattate sono state diluite serialmente in PBS e coltivate (100 µL per piastra) su agar soia triptico con 5% di sangue di cavallo (TSH, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Tutte le formulazioni sono state diluite serialmente in PBS e piastrate in differenti mezzi di coltura per differenziare selettivamente le specie contenute. Le aliquote dei prodotti diluiti sono state coltivate su TSH per l'isolamento di *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp., su agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Oxoid,

Thermo Fisher Scientific, UK) per *Lactobacillus* spp., e su *Bifidobacterium selective medium* (BSM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) per *Bifidobacterium* spp. (22). La piastratura è stata effettuata in triplicato, e gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte in giorni separati. Le piastre di TSH sono state incubate a 37°C in condizioni di aerobiosi per 48 ore, le piastre di MRS a 35% ad una concentrazione di CO<sub>2</sub> del 5% per 72 ore, e quelle di BSM in anaerobiosi fino a 72 ore. Il numero di CFU è stato determinato e le colonie rappresentative sono state identificate tramite analisi biochimica. Per l'analisi con spettrometria di massa MALDI-TOF (MS) con Flex Control TM 1.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) sono stati usati batteri da singole colonie, e gli spettri sono stati analizzati tramite MALDI Biotyper 3.0 (BDAL, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

#### **Analisi con spettrometro di massa MALDI-TOF MS**

I campioni isolati sono stati testati in duplicato. Ciascuna colonia è stata posizionata sulla piastra MALDI, trattata con  $\mu$ L di etanolo, 1  $\mu$ L di acido formico e 1  $\mu$ L di acetonitrile e quindi rivestita con 1  $\mu$ L di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico saturato, e asciugata. La piastra caricata è quindi stata collocata nello strumento seguendo le istruzioni del produttore. Gli spettri di massa sono stati acquisiti entro 10 minuti. Gli spettri sono stati importati nel software integrato MALDI Biotyper software (versione 3.0) e analizzati da un pattern di match standard, con un setting di default. Uno score  $\geq 2,00$  indicava l'identificazione a livello di specie, uno score da 1,99 a 1,70 indicava l'identificazione a un livello di genere, e qualsiasi score  $< 1,70$  indicava una somiglianza non significativa dello spettro ottenuto con ciascuno dei dati presenti nel database.

#### **Preparazione degli inoculi per i test di vitalità**

Gli inoculi sono stati preparati come segue. Le sospensioni di Enterogermina, Reuflor, and Dicoflor sono state usate immodificate. I microorganismi liofilizzati di Lactoflorene Plus and Prolife sono stati sospesi nel liquido contenuto nella fiala commerciale, come suggerito dalle istruzioni del produttore. La polvere contenuta in una capsula di Enterolactis Plus, Codex ed Enterelle

è stata dissolta in 10 mL di acqua sterile. La polvere contenuta nelle bustine di Yovis e VSL3 è stata dissolta in 50 mL di acqua sterile.

#### **Sopravvivenza nell'ambiente gastrico**

La sopravvivenza nell'ambiente gastrico dei microorganismi è stata valutata a tempo 0, 30, 60 e 120 minuti, utilizzando 2 modelli standard di succhi gastrici con pH 1,4-1,5 contenenti o meno pepsina.

#### **Sopravvivenza nell'ambiente intestinale (sali biliari e succhi pancreatici)**

La sopravvivenza nell'ambiente intestinale è stata testata in una soluzione di sali biliari + pancreaticina a pH 8,0. Le concentrazioni dei probiotici testati in tale ambiente sono state valutate a tempo 0, 30, 60, 120, 240 e 360 minuti.

## **RISULTATI**

La Tabella I riassume i principali risultati dello studio.

### **CFU e sicurezza**

Per quanto riguarda il numero totale di CFU, Enterogermina, Codex, Prolife e Dicoflor hanno mostrato una corrispondenza con quanto indicato nel bugiardino; Lactoflorene Plus ha mostrato un numero inferiore, mentre Enterolactis Plus, Reuflor, Enterelle, Yovis e VSL#3 possedevano un numero maggiore di CFU rispetto a quanto indicato. Il numero di spore presenti in Enterogermina, Lactoflorene Plus e Prolife era corrispondente a quanto indicato. In nessuno dei prodotti studiati è stata trovata traccia di contaminazione da parte di altri microorganismi.

### **Sopravvivenza all'ambiente acido**

Già dopo 30 minuti quasi tutti i prodotti hanno mostrato una riduzione del numero delle CFU (Enterolactis Plus, Lactoflorene Plus, Reuflor, Codex, Prolife, Dicoflor, Enterelle). Al termine dell'incubazione non sono state ritrovate colonie di Enterolactis Plus, Lactoflorene Plus e Dicoflor. Enterelle, Reuflor, Codex e Profile hanno mostrato una riduzione della loro concentrazione, mentre Enterogermina, Yovis e VSL#3 non hanno mostrato alterazioni.

**TABELLA I.**

Sommaro dei principali risultati dello studio di Vecchione et al.

<b>Prodotto</b>	<b>CFU effettive rispetto alle dichiarate</b>	<b>Sopravvivenza dopo 120 min nel succo gastrico USP</b>	<b>Sopravvivenza dopo 120 min nel succo gastrico ASTM</b>	<b>Sopravvivenza nell'ambiente intestinale</b>
<b>Enterogermina 2 miliardi</b> <i>Bacillus clausii</i> spore	=	96%	100%	Aumento da 240 min
<b>Enterolactis Plus</b> <i>Lactobacillus paracasei</i> CNCM I-1572	+	0%	0%	Riduzione da 30 min
<b>Lactoflorene Plus</b> <i>L. acidophilus</i> LA-5® <i>L. paracasei</i> CRL 431® <i>Bifidobacterium</i> BB-12® <i>B. coagulans</i> BC513	-	0%	0%	Riduzione da 360 min
<b>Reuflor</b> <i>L. reuteri</i> DSM 17938	+	36%	69%	Riduzione da 30 min
<b>Codex</b> <i>Saccharomyces boulardii</i>	=	65%	78%	Riduzione da 30 min, uguale a 360 min
<b>Prolife</b> <i>B. coagulans</i> MTCC 5260 <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 <i>Streptococcus thermophilus</i> St-21 <i>L. acidophilus</i> La-14 <i>L. plantarum</i> Lp-115 <i>L. brevis</i> Lbr-35 <i>L. rhamnosus</i> HN001 <i>L. casei</i> R215 <i>L. gasseri</i> Lg-36 <i>L. helveticus</i> R0052	=	75%	62%	Riduzione da 30 min
<b>Dicoflor</b> <i>L. rhamnosus</i> GG	=	0%	0%	Riduzione da 30 min
<b>Enterelle</b> <i>S. cerevisiae subsp. boulardii</i> MTCC-5375 <i>Enterococcus faecium</i> UBEF-41 <i>L. acidophilus</i> LA 14	+	0%	24%	Invariata
<b>Yovis</b> <i>S. salivarius subsp. thermophilus</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>S. faecium</i>	+	97%	100%	Riduzione da 240 min
<b>VSL#3</b> <i>S. thermophilus</i> BTO1 <i>B. breve</i> BBO2 <i>B. longum</i> BLO3 <i>B. infantis</i> BIO4 <i>L. acidophilus</i> BAO5 <i>L. plantarum</i> BPO6 <i>L. paracasei</i> BPO7 <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> BDO8	+	99%	100%	Riduzione da 240 min

## Sopravvivenza ai sali biliari e succhi pancreatici

Si è notata una significativa riduzione di Enterolactis Plus, Reuflor, Prolife, e Dicoflor già dai primi 30 minuti, per Yovis e VSL#3 è iniziata dai 240 min, per Lactoflorene da 360 min. Enterelle non ha mostrato variazioni, mentre Enterogermina ha mostrato di replicarsi nei succhi biliari aumentando la sua concentrazione a partire da 240 min. d'incubazione. Infine, *S. cerevisiae* contenuta nel Codex ha mostrato un'iniziale riduzione per poi replicarsi e tornare alle concentrazioni iniziali a 360 min. La concentrazione di *B. clausii* tra l'ambiente acido dello stomaco e quello alcalino intestinale, ha mostrato un aumento di CFU di ben 1000 volte.

## CONCLUSIONI

In generale, i probiotici valutati in questo studio hanno dimostrato adeguata qualità dei preparati esaminati, ma con un diverso comportamento in presenza di acido e bile. In particolare, la quantità di microrganismi contenuti in Enterogermina, Yovis e VSL3 è rimasta stabile in queste condizioni fino ad un massimo di 2 ore. Inoltre, il *B. clausii* (Enterogermina 2 miliardi) è stato l'unico in grado di moltiplicarsi significativamente sopra il numero iniziale, e *S. boulardii* (Codex) di replicarsi fino all'importo iniziale dopo un declino iniziale nel modello artificiale intestinale.

L'integrazione di questi studi in vitro artificiali con indagini funzionali e immunologiche appare essenziale per selezionare probiotici di qualità.

## MESSAGGI CHIAVE

- La scelta del probiotico non può essere casuale, ma a seconda della patologia del paziente deve essere usato il ceppo e la specie che hanno dimostrato maggiore efficacia negli studi clinici.
- I probiotici vanno somministrati nelle quantità adeguate sulla base dei migliori dati scientifici basati sull'evidenza.
- Bisogna accertarsi che i probiotici utilizzati siano stati sottoposti a degli studi di sopravvivenza per assicurarsi che giungano al colon nelle concentrazioni adeguate.

## Bibliografia di riferimento

- Hill C, Guarner F, Reid G, et al. *Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2014;11:506-14. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
- Horvath A, Dziechciarz P, Szajewska H. *Meta-analysis: Lactobacillus rhamnosus GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood*. Aliment Pharmacol Ther 2011;33:1302-10.
- Ianiro G, Rizzatti G, Plomer M, et al. *Bacillus clausii for the treatment of acute diarrhea in children: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Nutrients 2018;10(8). pii: E1074.
- Indrio F, Di Mauro A, Riezzo G, et al. *Prophylactic use of a probiotic in the prevention of colic, regurgitation, and functional constipation: a randomized clinical trial*. JAMA Pediatr 2014;168:228-33.
- Cox LM, Blaser M. *Antibiotics in early life and obesity*. Nat Rev Endocrinol 2015;11:182-90.
- Llewellyn A, Foey A. *Probiotic modulation of innate cell pathogen sensing and signaling events*. Nutrients 2017;9:1156.
- Ministero della Salute, Commissione unica per la nutrizione e la dietetica. *Guidelines on probiotics and prebiotics. Ministero della Salute (2013)*. Available from: [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1016\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf).
- Nébot-Vivinus M, Harkat C, Bziouche H, et al. *Multispecies probiotic protects gut barrier function in experimental models*. World J Gastroenterol 2014;20:6832-43.
- Probiotic products: a call for improved quality control. A position paper by the ESPGHAN Working Group for probiotics and prebiotics*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2017;65:117-24.
- Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, et al. *Safety assessment of probiotics for human use*. Gut Microbes 2010;1:164-85.
- Szajewska H, Guarino A, Hojsak I, et al. *Use of probiotics for management of acute gastroenteritis: a position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2014;58:531-9.
- Szajewska H, Kołodziej M. *Systematic review with meta-analysis: Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea*. Aliment Pharmacol Ther 2015;42:793-801.
- Szajewska H, Skórka A, Ruszczyński M, et al. *Meta-analysis: Lactobacillus GG for treating acute gastroenteritis in children—updated analysis of randomised controlled trials*. Aliment Pharmacol Ther 2013;38:467-76.
- Urbanśka M, Szajewska H. *The efficacy of Lactobacillus reuteri DSM 17938 in infants and children: a review of the current evidence*. Eur J Pediatr 2014;173:1327-37.
- WGO *Global Guideline Probiotics and prebiotics 13 - World Gastroenterology Organisation 2017*.