

EQUILIBRIO DELLA FLORA INTESTINALE

Nuove acquisizioni sul corretto uso dei probiotici: interesse e ripercussioni in campo veterinario

Lo scopo di questo lavoro è quello di evidenziare le principali caratteristiche che i microrganismi probiotici e i prodotti probiotici dovrebbero possedere per avere un impatto positivo sulla salute dell'ospite ed essere utilizzati come efficaci biomodulatori in campo medico e veterinario. A questo proposito, verranno suggerite alcune utili istruzioni per evitare di scegliere prodotti probiotici non idonei nelle fasi di somministrazione clinica. Nella preparazione dei prodotti probiotici vengono utilizzate centinaia di differenti popolazioni microbiche intestinali, quindi può risultare difficile scegliere il probiotico più adatto per supportare la terapia delle differenti patologie. La letteratura scientifica, in questo campo è ancora scarsa e incompleta. Ci si propone quindi di stilare una serie di semplici istruzioni per fornire un'immediata interpretazione e indirizzare la scelta del probiotico adeguato alle necessità in campo veterinario.

CONOSCERE LA CORRETTA DEFINIZIONE DI PROBIOTICO

La definizione ufficiale di probiotico data dal comitato FAO-WHO è: "microrganismi vivi che, quando utilizzati in adeguate dosi, conferiscono un effetto benefico all'ospite". I batteri che fanno parte dei generi Lattobacilli e i Bifidobatteri sono i maggiori microrganismi probiotici utilizzati in campo umano e, successivamente, veterinario per le loro proprietà e per i loro effetti benefici. Tuttavia anche microrganismi non batterici come il *Saccharomyces boulardii* e il *Saccharomyces cerevisiae* sono spesso utilizzati come probiotici per i noti effetti benefici a livello intestinale e sistemico. I probiotici non sono dei farmaci, ma sono dei biomodulatori, resistenti ai succhi ga-

**Giorgia Meineri,
Vittorio Saettoni**
Dipartimento di Scienze
Veterinarie, Università di Torino

stri e ai sali biliari, che devono quindi arrivare intatti nell'ambiente intestinale ed esercitare la loro attività benefica sull'organismo ospite.

IN SINTESI: i probiotici sono microrganismi vivi che agiscono come potenti biomodulatori, con un impatto positivo sulla salute umana. Infatti, per integratori con probiotici si intendono quei prodotti che contengono, in numero sufficientemente elevato, microrganismi probiotici vivi e attivi, in grado di raggiungere l'intestino, moltiplicarsi ed esercitare un'azione di equilibrio sulla microflora intestinale mediante colonizzazione diretta.

NON SONO PROBIOTICI I MICRORGANISMI LISATI, I BATTERI NON VIVENTI E LE SPORE NON COLONIZZANTI

Negli ultimi anni c'è stato un aumento di interesse per gli studi su alcune componenti microbiche, come le proteine, i lipidi, gli acidi nucleici e sui batteri non viventi, per il loro effetto benefico sulla salute dell'organismo. Questi studi evidenziano la capacità delle cellule batteriche non viventi, di alcune molecole microbiche e di alcuni metaboliti microbici di indurre una vasta gamma di effetti biologici positivi sull'ospite, aumentando, tra l'altro, la risposta antiinfiammatoria. Studi scientifici hanno dimostrato che la somministrazione di Bifidobatteri e Lattobacilli inattivati con il calore è in grado di determinare un aumento della produzione di citochine antiinfiammatorie e di modulare positivamente la sintomatologia allergica in animali affetti da dermatite atopica (foto 1). Di conseguenza, gli effetti immunostimolanti di questi batteri inattivati sembrano non dipendere dalla vitalità delle cellule, ma essere legati direttamente alla natura fisica e biologica di specifici com-

I probiotici sono microrganismi vivi che agiscono come potenti biomodulatori.

EQUILIBRIO DELLA FLORA INTESTINALE



Foto 1. La somministrazione di Bifidobatteri e Lattobacilli inattivati con il calore è in grado di determinare un aumento della produzione di citochine antiinfiammatorie e di modulare positivamente la sintomatologia allergica in animali affetti da dermatite atopica (foto Firm - shutterstock.com).

ponenti delle cellule microbiche. Il Dna, i lipopolisaccardi, i peptidi e i peptidoglicani, le cellule omogenate, i metaboliti e le frazioni cellulari dei microrganismi hanno infatti grandi azioni immunomodulanti agendo sulla risposta immunitaria innata. Tuttavia i microrganismi lisati, seppure abbiano un impatto benefico sulla salute dell'ospite, non possono essere considerati come probiotici: essi hanno un effetto sull'organismo solo se continuamente somministrati e non sono in grado di indurre risposte biologiche per un lungo periodo. Solo i microrganismi vivi possono essere in grado di colonizzare l'ambiente gastrointestinale e di persistere all'interno dell'organismo dell'ospite. Riguardo le spore microbiche, solo le spore che possono germinare nel tratto gastrointestinale, in presenza di nutrienti e condizioni favorevoli e colonizzare l'ambiente possono essere considerate come veri probiotici ed essere utilizzate nella formulazione dei prodotti probiotici.

IN SINTESI: seppure le componenti microbiche e i microrganismi inattivati abbiano un effetto benefico sul tratto gastrointestinale e sulle condizioni generali dell'ospite (ad esempio in campo dermatologico) esse non possono essere considerate come probiotici così come le spore non colonizzanti.

CONOSCERE LA COMPLETA IDENTIFICAZIONE DEL PROBIOTICO

Nell'ultimo decennio le avanzate tecniche di biologia molecolare e di microbiologia hanno permesso una corretta identificazione e caratterizzazione dei batteri, chiarendone esaustivamente l'identità. Quando un microrganismo è utilizzato per la formulazione di un supplemento nutrizionale o di un prodotto probiotico è di cruciale importanza la sua completa caratterizzazione e identificazione a livello genomico e fisiologico. In seguito al completo sequenziamento del genoma, i microrganismi probiotici

EQUILIBRIO DELLA FLORA INTESTINALE

vengono identificati, in accordo con la nomenclatura tassonomica riconosciuta dalla *International Union of Microbiological*. È inoltre raccomandato il deposito dei ceppi nelle Collezioni internazionali che posseggono lo status di IDA (collezioni internazionali di ceppi batterici).

Questo sistema permette l'identificazione di ogni singolo gene coinvolto nel metabolismo batterico e la sua funzione. Ciò permette la verifica della sicurezza dei prodotti probiotici prima della loro immissione sul mercato. Le linee guida in campo umano ad esempio richiedono:

- Concentrazioni di 10^9 unità formanti colonia (u.f.c.) di microrganismi da assumere giornalmente (a meno che l'utilizzo di un altro dosaggio sia dimostrato e supportato dalla letteratura scientifica).
- Identificazione del prodotto probiotico, integrando la caratterizzazione genotipica e fenotipica.
- Assenza di fattori patogeni.

Purtroppo, i prodotti probiotici correntemente immessi sul mercato spesso non sono correttamente definiti nella documentazione illustrativa allegata alla confezione e molti microrganismi sono presenti nei prodotti probiotici in quantità minore di quella dichiarata sulle confezioni. Nel 2002 Weese *et al.* riscontrarono inesattezze nei dati tabellari in numerosi prodotti probiotici canadesi, evidenziando che, nel 43% dei prodotti analizzati, i batteri contenuti non erano idoneamente identificati; inoltre trovarono che, nel 25% dei prodotti analizzati, il contenuto non era dichiarato correttamente. Drago e collaboratori nel 2011, in una ricerca sulla qualità dei probiotici disponibili sul mercato italiano, riscontrano risultati analoghi. In questo studio italiano gli autori osservarono che il 42% dei prodotti analizzati non conteneva la quantità di microrganismi dichiarati nei dati tabellari illustrativi allegati alle confezioni; oltre a ciò, fattore ancor più grave, nel 17% dei prodotti sono stati rilevati microrganismi non dichiarati, in grado di determinare potenzialmente dei problemi di salute all'organismo ospite. Questi dati scientifici sottolineano la necessità di una legislazione specifica che obblighi l'identificazione accurata, la natura e le funzioni dei microrganismi nei prodotti probiotici commerciali. I dosaggi dichiarati, la tipizzazione genetica e la tracciabilità sono caratteristiche fondamentali per i probiotici.

IN SINTESI: per la formulazione di prodotti probiotici dovrebbe essere eseguita un'ideale e completa caratterizzazione genica. I dosaggi dichiarati, la tipizzazione genica e la tracciabilità sono le più importanti caratteristiche specifiche da ricercare nei nuovi prodotti probiotici immessi sul mercato. Queste informazioni devono essere dichiarate correttamente nel foglietto illustrativo allegato alle confezioni.

EFFETTUARE LA SCELTA CORRETTA DEL PROBIOTICO

Ad oggi, sono disponibili sul mercato centinaia di prodotti probiotici sia in campo umano che veterinario. Questi prodotti differiscono per gli eccipienti, l'ammontare delle specie di microrganismi e il grado di attività nell'organismo ospite. Le maggiori differenze nelle formulazioni di probiotici sono dovute al numero delle specie di microrganismi presenti nello stesso prodotto. Numerosi studi scientifici hanno dimostrato l'effetto positivo e protettivo verso i patogeni intestinali dell'unione di più specie microbiche nello stesso prodotto probiotico rispetto alla presenza di un solo ceppo di microrganismi. L'ideale sarebbe ottenere un'attività sinergica di tutti i ceppi microbici, ovvero che ogni singolo batterio possa agire aumentando mutualmente l'attività degli altri ceppi presenti. Secondo alcuni studi scientifici, ad esempio, *Lactobacillus salivarius* e *Bifidobacterium breve* agiscono in sinergia, per cui la loro combinazione aumenta la risposta immunitaria e antiinfiammatoria migliorando la salute dell'ospite. Nei prodotti contenenti più microrganismi è quindi essenziale che essi non competano per i nutrienti, le fonti di energetiche e che non si inibiscano mutualmente. Come dimostrato nel 2003 da Vitali *et al.* i differenti microrganismi, utilizzati nella formulazione di prodotti probiotici, possono anche agire tra di loro come antagonisti inibendo reciprocamente la loro attività e rallentando la crescita microbica. Questi autori hanno valutato l'azione comune di 3 ceppi di *Bifidobacterium*: *infantis*, *brevis* e *longum* contenuti in un unico prodotto probiotico e hanno osservato una significativa inibizione della crescita indotta dal *Bifidobacterium longum* verso gli altri due microrganismi.

IN SINTESI: nei prodotti probiotici contenenti più microrganismi è fondamentale l'accertamento dell'attività sinergica simbiotica. L'aumento dell'attività di queste formulazioni giustifica quindi l'utilizzo di più microrganismi rispetto ai prodotti contenenti un solo ceppo di microrganismi

VERIFICARE CHE SIANO ESCLUSE CARATTERISTICHE DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEI MICRORGANISMI PROBIOTICI E NEI PRODOTTI PROBIOTICI

L'utilizzo di prodotti probiotici in associazione con antibiotici può determinare, con il tempo, un antibiotico-resistenza dei microrganismi probiotici. L'antibiotico resistenza può, per certi aspetti, essere considerata una caratteristica positiva per un probiotico, poiché in questo modo i microrganismi sono in grado di svolgere la loro azione di eubiosi senza essere influenzati da una concomitante terapia antibiotica. Tuttavia, l'antibiotico-resistenza può essere trasferita dai probiotici

EQUILIBRIO DELLA FLORA INTESTINALE

ai batteri patogeni presenti nell'intestino e ciò costituisce un serio rischio per la salute dell'ospite. I patogeni possono infatti diventare resistenti e rendere nulle le future terapie antibiotiche. I batteri probiotici quindi, così come altri microrganismi, possono sviluppare antibiotico resistenza e possono trasformarsi in batteri mutanti (resistenti) se sottoposti a pressione selettiva antibiotica. L'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) raccomanda che siano impiegati prodotti probiotici commerciali in cui sia escluso il trasferimento di antibiotico resistenza. Molti geni antibiotico-resistenti sono stati osservati ad esempio tra alcuni ceppi di Lattobacilli probiotici, essi possono costituire una riserva di geni resistenti e potenzialmente possono trasferire questa caratteristica a microrganismi presenti nell'ambiente intestinale. Lo sviluppo di antibiotico resistenza tra i patogeni come *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae* determinano severi problemi di salute. Di conseguenza è fondamentale ridurre il dosaggio di antibiotici per prevenire la selezione di sottopopolazioni batteriche resistenti ed è anche essenziale evitare prodotti probiotici contenenti microrganismi che possono trasferire i geni di antibiotico resistenza ai patogeni. Uno dei maggiori rischi che esiste nei prodotti probiotici è la presenza di numerosi microrganismi utilizzati nelle formulazioni che non aderiscono, per questo aspetto, alle linee guida EFSA. Nel 2013 Drago *et al.* Hanno constatato che il 24% dei microrganismi isolati da probiotici erano resistenti all'eritromicina, il 67% erano resistenti alla gentamicina e il 9,5% erano resistenti alle tetracicline. Il reale problema non è l'antibiotico-resistenza rilevata in questi microrganismi probiotici, ma è che essi possano trasferire questa caratteristica; occorre prestare attenzione all'indice di suscettibilità antibiotica per abolire i rischi di potenziali trasferimenti genici di antibiotico resistenza tra i microrganismi probiotici e i microrganismi intestinali e l'ospite.

IN SINTESI: la sicurezza di prodotti commerciali probiotici dovrebbe essere assicurata prima della loro immissione sul mercato; in particolare dovrebbe essere accertato che non contengano fattori patogeni e che non siano in grado di trasferire elementi genici di antibiotico resistenza.

È
fondamentale
ridurre il
dosaggio di
antibiotici per
prevenire la
selezione di
sottopopolazioni
batteriche
resistenti.

SCEGLIERE I PRODOTTI PROBIOTICI RESISTENTI ALL'AMBIENTE GASTRO INTESTINALE

Il basso valore di *pH* (*power of Hydrogen*) dello stomaco e la secrezione di acidi biliari del duodeno rendono il tratto gastro intestinale un ambiente ostile per la crescita microbica. Sui prodotti probiotici è necessario effettuare dei test per valutarne la sopravvivenza a condizioni di pH acido e la loro resistenza ai sali biliari (attività idrolasica). L'attività idrolasica verso i sali biliari è specie e prodotto specifica.

IN SINTESI: devono essere utilizzati solo i prodotti probiotici contenenti microrganismi in grado di resistere alle condizioni dell'ambiente gastrico e intestinale.

SCEGLIERE PRODOTTI PROBIOTICI CONTENENTI MICRORGANISMI IN GRADO DI COLONIZZARE L'INTESTINO

I probiotici inibiscono la crescita di batteri patogeni attraverso la produzione di composti inibitori come le batteriocine e gli acidi organici o attraverso l'adesione competitiva all'epitelio intestinale. I probiotici infatti possono competere con i microrganismi patogeni intestinali per gli stessi recettori determinando un'aumentata produzione di mucina che ne inibisce l'adesione. La produzione di biofilm è un altro importante meccanismo di azione dei probiotici: essa è infatti considerata una delle maggiori strategie di sopravvivenza dei batteri per l'accesso ai nutrienti, il mantenimento dell'attività degli enzimi extracellulari e di protezione verso i microrganismi patogeni. In uno studio scientifico, dopo 3 settimane di somministrazione di un prodotto probiotico contenente *Lactobacillus ramosus* e *Lactobacillus reuteri* è stata ritrovata nelle feci dei pazienti umani un'elevata quantità di questi 2 microrganismi; ciò suggerisce una loro spiccata attività colonizzatrice intestinale. Al contrario, altri autori non hanno trovato riscontri fecali di *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* somministrati giornalmente a individui sani. Gli autori hanno concluso che i diversi microrganismi hanno specifiche proprietà di colonizzare l'intestino e che occorre effettuare la scelta di microrga-

EQUILIBRIO DELLA FLORA INTESTINALE

nismi probiotici in base alle capacità e al grado di colonizzazione del tratto gastrointestinale.

IN SINTESI: *microrganismi con una forte azione probiotica in vitro, ma incapaci di aderire alla parete intestinale e colonizzare l'intestino, non sono dei buoni candidati come prodotti probiotici.*

PREFERIRE I PRODOTTI PROBIOTICI CHE SONO IN GRADO DI INTERAGIRE POSITIVAMENTE CON LA MICROFLORA INTESTINALE

Sono attualmente disponibili scarsi dati riguardanti la capacità dei probiotici di modulare la composizione microbica intestinale. Una recente revisione della letteratura scientifica sottolinea infatti la mancanza di studi che dimostrino il reale impatto dei microrganismi probiotici sulla composizione del microbiota intestinale in termini di diversità e di ricchezza della composizione dei batteri intestinali. Numerosi fattori possono influenzare i risultati dei differenti studi sul microbiota intestinale: l'utilizzo di differenti ceppi probiotici da soli oppure in associazione, la durata della somministrazione dei probiotici, l'affidabilità dei metodi utilizzati per studiare la composizione del microbiota intestinale, la quantità di campioni analizzati, il potere statistico e la possibile variazione individuale nella risposta verso l'utilizzo dei ceppi probiotici utilizzati. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato che la somministrazione del ceppo probiotico *Lactobacillus salivarius* in soggetti affetti da dermatite atopica (AD) è in grado di migliorare i sintomi classici della patologia, così come determinare una diminuzione del numero degli stafilococchi intestinali. Questi risultati sottolineano la capacità di questi probiotici di influenzare direttamente la composizione del microbiota intestinale. L'impatto dei probiotici sul microbiota intestinale, non coinvolge solo la composizione batterica, ma anche il metabolismo dei batteri. Infatti, in uno studio su volontari sani la somministrazione di *Lactobacillus acidophilus* ha indotto una significativa diminuzione di Beta-Glucosidasi, Nitroriduttasi e Azoreduttasi batteriche. Tutti questi enzimi sono strettamente associati ai batteri intestinali e non sono prodotti dall'organismo ospite. Anche il ceppo *Lactobacillus casei* ha avuto lo stesso effetto sul metabolismo del microbiota intestinale, riducendo la Beta-Glucuronidasi nell'ospite. Dovrebbero essere effettuati ulteriori studi in medicina veterinaria per chiarire l'impatto e le interazioni dei probiotici con il microbiota intestinale.

IN SINTESI: *anche se ci sono pochi e discordanti dati sull'impatto dei probiotici sulla composizione del microbiota intestinale, solo i prodotti probiotici che possiedono una forte attività intestinale*

dovrebbero essere presi in considerazione e utilizzati per migliorare la salute dell'organismo.

VERIFICARE LA SICUREZZA DEL CEPPO PROBIOTICO E VALUTARE LO STATO DI SALUTE DEL SOGGETTO PRIMA DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN PROBIOTICO

La sicurezza dei probiotici è un altro importante aspetto che deve essere considerato nella scelta dei microrganismi probiotici che possono essere utilizzati. Generalmente, sono effettuati degli studi in vitro per escludere la presenza di microrganismi patogeni all'interno dei probiotici. Tuttavia nelle prove in vitro i fattori virulenti possono essere sottostimati. È necessario un accurato screening del genoma microbico per verificare la presenza di fattori patogeni e per evitare rischi legati alla sicurezza. Anche se la somministrazione orale di probiotici è generalmente sicura e non vi sono effetti collaterali dovuti al loro consumo, sono stati descritti casi di batteriemia in pazienti con gravi problemi intestinali. In caso di compromissione delle condizioni dell'organismo, alcuni ceppi di lactobacilli possono raggiungere il sistema circolatorio, attraversando l'epitelio intestinale, e agire come i patogeni, difatti bisogna ricordare che sono state descritte delle batteriemie da *Lactobacillus* in pazienti immunodepressi. È importante quindi considerare lo stato di salute e la severità delle patologie e i fattori di rischio prima della somministrazione di probiotici, soprattutto nelle condizioni in cui la barriera fisica e immunologica intestinale è severamente compromessa, questo per minimizzare possibili effetti collaterali e conseguenze pericolose per l'organismo.

IN SINTESI: *il rischio nell'utilizzo di prodotti probiotici è principalmente dovuto ad uno stato di salute compromesso dell'organismo piuttosto che al ceppo microbico utilizzato nel prodotto probiotico.*

PREFERIRE L'UTILIZZO DI PROBIOTICI CHE PRESENTANO UN'EFFICACIA CLINICA DIMOSTRATA

Tutte le caratteristiche dei probiotici analizzate nelle precedenti sezioni di questo articolo sono riferite a microrganismi che esercitano un ruolo benefico sull'organismo, diminuiscono la concentrazione di batteri patogeni nel tratto gastrointestinale e migliorano lo stato di salute dell'ospite. Tuttavia, è estremamente importante valutare l'efficacia dei ceppi probiotici nel prevenire le malattie e soprattutto nel migliorare i sintomi. Una recente meta-analisi sui probiotici ha sottolineato quanto i microrganismi possono positivamente contribuire all'integrità della mucosa intestinale e migliorare il metabolismo del

EQUILIBRIO DELLA FLORA INTESTINALE

glucosio nei pazienti con diabete mellito di tipo 2. Un'altra recente meta-analisi ha dimostrato che la somministrazione di probiotici può determinare una significativa riduzione dell'insulino-resistenza. Altresì, un recente studio ha sottolineato l'effetto clinico positivo dei probiotici, in particolare *Lactobacillus salivarius*, in soggetti affetti da dermatite atopica. L'efficacia dei probiotici è strettamente specie e ceppo specifica, per questa ragione differenti specie di probiotici possono avere differenti attività e di conseguenza non essere ugualmente efficaci per contrastare le stesse patologie. Per esempio *Lactobacillus acidophilus* ha avuto un effetto benefico nella prevenzione e nel trattamento di alcune malattie gastrointestinali, nella diarrea associata agli antibiotici e nelle infezioni da *Helicobacter pylori*, mentre *Lactobacillus plantarum* e *Bifidus bacterius infantis* non hanno dimostrato la stessa efficacia verso queste patologie.

IN SINTESI: nella scelta delle migliori specie o ceppi probiotici da utilizzare in presenza di patologie, una

grande attenzione dovrebbe essere posta verso i microrganismi la cui efficacia clinica è stata scientificamente dimostrata.

CONCLUSIONI

L'effetto "fisiologico" di un prodotto probiotico, volto a favorire l'equilibrio della flora intestinale, è sempre stato considerato utile per la salute e vincolato alla capacità dei microrganismi di colonizzare l'intestino, grazie all'apporto di un numero sufficiente di cellule vive assunte alle quantità indicate. Il Ministero della Salute, in campo umano, ha redatto delle indicazioni per l'uso dei probiotici (batteri e/o lieviti) tradizionalmente utilizzati per l'equilibrio della flora batterica intestinale. In questo lavoro abbiamo cercato di puntualizzare questi concetti. Tali indicazioni possono dimostrarsi valide in campo veterinario per la scelta dei probiotici utili alla salute animale.

La bibliografia è disponibile presso gli Autori.

RIASSUNTO

I prodotti probiotici, che favoriscono l'equilibrio della flora intestinale, sono sempre stati considerati utili per la salute e vincolati alla capacità dei microrganismi di colonizzare l'intestino, grazie all'apporto di un numero sufficiente di cellule vive assunte alle quantità indicate. Il Ministero della Salute, in campo umano, ha redatto delle indicazioni per l'uso dei probiotici (batteri e/o lieviti) In questo lavoro gli Autori hanno cercato di puntualizzare questi concetti. Tali indicazioni possono dimostrarsi valide in campo veterinario per la scelta dei probiotici utili alla salute animale.

Parole chiave: probiotici, flora intestinale, salute animale.

SUMMARY

New acquisitions on the correct use of probiotics: interest and repercussions in veterinary science

Probiotics promoting a balance of intestinal flora have always been considered useful for health and connected to the ability of microorganisms to colonize the intestine, thanks to the contribution of a sufficient number of live cells taken at a given quantity. The Italian Ministry of Health, in the human field, has drawn up indications for the use of probiotics (bacteria and/or yeasts). In this work the Authors have tried to point out these concepts. Such indications may prove to be valid in the veterinary field for the selection of probiotics useful for animal health.

Keywords: probiotics, intestinal flora, animal health.