

Probiotici: *in vivo* vs *in vitro*

Lorenzo Morelli

Direttore DiSTAS - Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari, Facoltà di Scienze Agrarie, alimentari e ambientali, Università Cattolica del Sacro Cuore Piacenza-Cremona

Riassunto. Numerosi lavori scientifici riportano dati relativi alla validazione *in vitro* di microrganismi ad azione probiotica. Dal punto di vista microbiologico questi test necessitano di una validazione *in vivo*, altrimenti rimangono dei puri esercizi di laboratorio. A livello internazionale, i test *in vitro* sono accettati e utilizzati per determinare i meccanismi d'azione di batteri che abbiano già una forte caratterizzazione di efficacia nell'uomo.

Probiotico è un termine coniato negli anni '60, attraverso una strana mistura di latino ("pro": a favore) e greco ("biotico": della vita) per definire dapprima sostanze e poi microrganismi con azione di supporto alla crescita delle comunità microbiche ospitate in vari organi degli animali, compreso l'intestino umano¹. Talvolta già l'etimologia della parola pone problemi, perché numerosi testi definiscono di derivazione "greca" *tout court* la parola, con la divertente conseguenza di attribuire al termine il significato di "prima della vita" (se anche "pro" fosse mutuato dal greco e non dal latino). La doppia "identità" della parola si riflette anche nella duplicità dell'interesse scientifico, che ha aspetti clinici ma anche microbiologici.

L'attenzione verso i probiotici si è concretizzata negli ultimi anni in un elevatissimo numero di pubblicazioni (circa 12.000 secondo PubMed) con una forte presenza di trial clinici (poco meno di 2.000) a loro volta esaminati da circa 4.000 *reviews* e meta-analisi; proprio questo alto numero di articoli "descrittivi" (il doppio dei trial clinici) suggerisce come questo argomento sia esaminato da molti autori, con diversi punti di vista e opinioni. Sembra quindi d'interesse rivolgere una qualche attenzione agli alcuni aspetti microbiologici dei probiotici, visto che "gli ingredienti attivi" non solo altro che microrganismi.

I microrganismi nelle definizioni di probiotico

"Probiotico" si caratterizza quindi come parola antitetica ad "antibiotico", non solo etimologicamente ma anche come concet-

to: il supporto allo stato di salute si ottiene aumentando la presenza microbica e non diminuendola; a tale scopo è fondamentale che i microrganismi utilizzati siano in grado di sopravvivere all'acidità presente durante il transito gastrico e all'azione tensio-attiva dei sali di bile presenti nell'intestino tenue, per poi riprodursi nel colon.

Un'analisi delle definizioni riportate in Tabella I evidenzia come il termine abbia assunto significati diversi, a partire dalla definizione originaria, che oggi si identificherebbe più con le sostanze ad azione prebiotica che con i microrganismi benefici, cambiando poi radicalmente e ponendo l'accento sui "microrganismi" (sempre vivi e vitali) e introducendo la necessità di una "adeguata quantità" che, per altro, non ha mai raggiunto un vero *consensus* da parte del mondo scientifico, mentre le autorità regolatorie, incluse quelle Italiane, citano la quantità di 1 miliardo/giorno come quella minima per poter definire un probiotico.

Oggi la definizione FAO/OMS può essere considerata abbastanza stabilizzata¹ e, soprattutto, accettata non solo dal mondo scientifico ma anche dagli organismi regolatori di molti stati, incluso quello Italiano, con alcuni punti fermi:

- i probiotici sono microrganismi vivi e vitali al momento dell'uso;
- la loro efficacia è legata al consumo di un'adeguata quantità;
- il loro uso deve portare un beneficio per la salute o il benessere.

In tutte le definizioni comparse nel corso degli anni si pone l'accento sulla necessità che i microrganismi siano vivi e vitali al momento

del consumo (e quindi i microrganismi trattati a caldo, come i cosiddetti "tindalizzati", definizione per altro microbiologicamente non corretta, non corrispondono alla definizione di probiotico); questa necessità, a sua volta, ha spinto a sperimentare metodi *in vitro*, più o meno complessi, per valutare, prima dell'uso *in vivo*, la possibilità dei microrganismi in esame di sopravvivere alle condizioni acide durante il transito gastrico e all'azione tensio-attiva dei sali di bile.

I metodi pubblicati allo scopo sono numerosi, inclusi alcuni molto sofisticati che comprendono una pluralità di contenitori posti in serie a simulare i vari tratti dell'intestino².

Il valore dei test *in vitro*

È bene chiarire il significato che il documento FAO/OMS attribuisce ai metodi *in vitro* per stabilire le potenzialità probiotiche di un microrganismo.

La sezione 6 del documento del 2001 (*Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*) riporta che: "adeguati studi *in vitro* dovrebbero stabilire i potenziali benefici per la salute dei probiotici prima di intraprendere trial *in vivo*".

Quindi i metodi *in vitro* sono da considerarsi solo come preliminari ai trial *in vivo*, ma non possono sostituirli; avendo avuto l'onore di essere uno dei membri del *working group* che ha steso il documento FAO/OMS ricordo come la preoccupazione del gruppo fosse quella di non veder proliferare i trial nell'uomo senza una base preliminare di osservazioni.

TABELLA I.

Le definizioni di "probiotico".

Definizione	Autori	Referenza
Sostanze che prolungano la fase logaritmica di crescita in altre specie microbiche	Lilly & Stillwell 1965	<i>Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms</i> . Science 1965;147:747-8
Microorganismo vivente che esercita un effetto positivo sulla salute dell'ospite con il risultato di rafforzare l'ecosistema intestinale	Fuller 1989	<i>Probiotics in man and animals</i> . J Appl Bacteriol 1989;66:365-78
Organismi vivi che, consumati in quantità adeguata, conferiscono un beneficio all'ospite	Guarner & Schaafsma 1998	<i>Probiotics</i> . Int J Food Microbiol 1998;39:237-8
Organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite	FAO/OMS 2001	www.fao.org/ag/agn/agns/micro_probiotics_en.asp
Microorganismi vivi e vitali che conferiscono benefici alla salute dell'ospite quando consumati in adeguate quantità, come parte di un alimento o di un integratore	Ministero Salute 2005, 2013, 2018	www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf

Lo stesso documento riporta poi che: "studi randomizzati, in doppio cieco e con controllo a placebo, dovrebbero essere effettuati per determinare l'efficacia di un prodotto probiotico. Il gruppo di lavoro riconosce come ci sia la necessità di studi nell'uomo in cui un numero adeguato di soggetti sia arruolato per ottenere la significatività statistica.

Quindi l'efficacia di un probiotico deve essere stabilita mediante trial nell'uomo; l'argomento era così rilevante che un anno dopo lo stesso gruppo di lavoro ha pubblicato un secondo documento (*Guidelines for the evaluation of probiotics in food*, 2002) dove si dice: "si nota inoltre come i dati *in vitro* disponibili per alcuni specifici ceppi non siano sufficienti per definirli probiotici. I probiotici per uso nell'uomo richiedono la dimostrazione di efficacia mediante studi condotti nell'uomo".

Quindi un primo scopo dei test *in vitro* è quello di permettere una prima selezione di nuovi ceppi potenzialmente probiotici, le cui proprietà andranno però obbligatoriamente verificate *in vivo*.

Una seconda applicazione dei test *in vitro* è quella della determinazione dei meccanismi di azione dei probiotici, a volte difficili o impossibili da analizzare *in vivo*.

Classico è l'esempio della scoperta del meccanismo di adesione di *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG). Brevettato³ in base a diverse caratteristiche, tra cui quella di adesione alle cellule intestinali umane ottenute da ileostomia, la sua capacità di permanere vivo e vitale nell'intestino

umano è dimostrata in oltre 100 *clinical trials* ma rimaneva da capire il meccanismo attraverso cui questo ceppo riusciva ad aderire agli epitelii intestinali.

La determinazione della sequenza nucleotidica del suo cromosoma ha consentito di individuare un complesso di geni che codificano per delle strutture di superficie (i pili) coinvolti in fenomeni d'adesione; si pensava che questi pili fossero caratteristiche dei batteri Gram negativi e non fossero presenti nei lattobacilli.

La creazione di mutanti del ceppo LGG⁴ con il *knock out* dei geni per i pili ha portato alla perdita dell'adesione alle linee cellulari, costituendo così la prima dimostrazione disponibile al mondo del meccanismo di adesione dei batteri probiotici all'epitelio intestinale. Questi test, che utilizzano ceppi geneticamente modificati, possono evidentemente effettuarsi solo *in vitro*.

I test *in vitro*

Dopo aver inquadrato il significato dei test microbiologici *in vitro*, sembra opportuno delineare alcune caratteristiche tecniche.

I primi test *in vitro*, condotti alla fine degli anni '80 del secolo scorso, sono serviti a discriminare la capacità di resistere a condizioni acide di lattobacilli isolati da yogurt o da intestino.

In un pionieristico ma per certi versi insuperato lavoro, Conway et al.⁵ confrontarono due ceppi di fermenti lattici isolati da yogurt con due lattobacilli isolati da intestino. I

risultati dei test *in vitro*, che comprendevano fra l'altro l'uso di succo gastrico aspirato da volontari, vennero poi confermati da uno studio *in vivo*, dove da volontari che avevano in precedenza ricevuto i batteri via sondino naso-gastrico venivano prelevati campioni del contenuto gastrico dopo 20, 40, 60, 90, 120 e 140 minuti.

A mia conoscenza questo è l'unico articolo che riporti un simile approccio, per altro molto invasivo, per la validazione di un test *in vitro*.

Ebbene i due ceppi di origine intestinale non solo dimostrarono di sopravvivere ai test *in vitro* ma furono anche ritrovati vivi nello stomaco dei volontari, almeno fino a 60 minuti dopo l'ingestione; nel 1987 entrambi questi ceppi erano classificati come *Lactobacillus acidophilus* ma oggi, alla luce della nuova tassonomia a base molecolare, sono identificati uno come *Lactobacillus gasseri* ADH e l'altro come *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG).

L'importanza dell'articolo del 1987 è data dall'aver validato *in vivo* quanto si andava proponendo come sistema *in vitro* e dal costituire uno dei pochi lavori scientifici in cui è stata effettuata questa validazione: la mancanza di questa validazione ha portato a proporre diversi metodi che si sono poi rivelati inconsistenti.

In un lavoro che riassume i risultati di un progetto europeo (EU FLAIR Project AGRF-CT91-0053) Charteris et al.⁶ dimostravano la differenza fra quella da loro definita "resistenza intrinseca all'acidità", misurata in laboratorio mediante saggi *in vitro*, e la

TABELLA II.
In vitro vs *in vivo*: alcuni esempi.

Referenza	Ceppo/prodotto analizzato <i>in vitro</i>	Risultato del test <i>in vitro</i>	Risultato <i>in vivo</i> con identificazione del ceppo	Referenza test <i>in vivo</i>
Jacobsen et al. 1999	<i>L. johnsonii</i> La1	Bassa resistenza all'acido	Identificazione del ceppo in 6/10 soggetti trattati con 10 ⁹ UFC	Giannotti et al. 2010
Dunne et al. 2001	<i>L. casei</i> F19	Non sopravvive dopo 30' in succo gastrico umano	Identificazione del ceppo in n. 6/30 volontari e aumento generalizzato della popolazione di lattobacilli nei volontari trattati	Sullivan et al. 2002
Bove et al. 2013	<i>L. plantarum</i> WCFS	Bassa sopravvivenza a pH 2	Positiva colonizzazione in diversi <i>clinical trials</i>	Review di van den Nieuwboer et al. 2016
Vecchione et al. 2018	Dicoflor	Riduzione significativa dopo 30' sia in condizioni acide che in succo intestinale simulato	Identificazione del ceppo colonizzante le mucose intestinali mediante PCR	Pagnini et al. 2018

“resistenza al transito gastrico” dimostrata direttamente nell'uomo. In conclusione gli autori dimostravano come i saggi *in vivo* misurassero la resistenza *in vitro* a pH bassi, non sempre correlata alla resistenza al transito gastrico misurata *in vivo*.

Già nel 2000 ⁷ facevo notare che ceppi risultati sensibili *in vitro* all'acido si erano poi dimostrati eccellenti colonizzatori dell'intestino umano.

L'anno seguente Jacobsen et al. ⁸, esaminando 45 ceppi del genere *Lactobacillus*, dimostrarono come ceppi con una ben documentata capacità di sopravvivere e riprodursi nell'intestino umano non riuscissero a superare i test *in vitro* quando effettuati per 4 ore a pH 2,5.

Questa incapacità veniva poi smentita da validazione *in vivo* riporta nello stesso articolo.

Questi e altri dati consentivano di osservare, già 19 anni fa ⁷, in un lavoro di *review*, come, quando si paragonano i dati ottenuti *in vitro* con quelli *in vivo*, i lattobacilli del gruppo *casei* (*casei*, *paracasei*, *rhamnosus*) siano molto sensibili *in vitro* all'acido anche se queste sono le specie di lattobacilli che più vengono isolate dai campioni fecali umani, a dimostrazione dell'adattamento di queste specie all'ambiente intestinale.

In lavori più recenti Del Piano et al. ^{9,10} hanno dimostrato che il tasso di sopravvivenze di lattobacilli e bifidobatteri trattati con succo gastrico ricostruito in laboratorio era inferiore al 20% mentre gli stessi ceppi,

trattati con succo gastrico aspirato dallo stomaco di volontari, era fra il 15 e il 45%, con andamento ceppo-specifico.

Per quanto riguarda i test di resistenza all'acidità si può quindi concludere che la mancanza di una validazione *in vivo* ne riduce grandemente il valore, che l'uso di acidi o anche di succo gastrico simulato e l'uso di pH inferiori a 2,5 porta a risultati non correlabili con il comportamento *in vivo*.

Un secondo parametro frequentemente controllato mediante test *in vitro* è quello della resistenza alla bile; uno dei primi lavori ad adottare questo tipo di saggio ¹¹ dimostrò come la resistenza ai sali di bile fosse ceppo e non specie-specifica.

Da notare che la preparazione commerciale usata da questi autori era l'oxgall, a base di bile bovina; in effetti lo scopo degli autori era di selezionare dei batteri probiotici da utilizzare nei vitelli, ma l'uso di oxgall si è poi diffuso anche per saggiare ceppi probiotici da usare nell'uomo, in cui però la

composizione dei sali biliari è molto diversa da quella dei bovini.

In alcuni lavori, comunque, è stata utilizzata la bile umana e i risultati confermano una migliore sopravvivenza rispetto all'uso di preparazioni commerciali ¹¹.

Anche in questo caso si può concludere che i test *in vitro* devono essere utilizzati solo a fronte di una validazione *in vivo* e devono inoltre essere interpretati alla luce di tutte le conoscenze disponibili sui singoli probiotici analizzati.

Conclusioni

I test *in vitro* sono utili alle aziende che vogliono immettere sul mercato un nuovo ceppo probiotico per un primo screening che però, come abbiamo visto, potrebbe escludere ceppi in effetti capaci di colonizzare (Tab. II). Questo tipo di test è invece insostituibile per determinare i meccanismi di azione di vari ceppi probiotici.

Trarre conclusioni sulla capacità di soprav-

Messaggi chiave

1. I test *in vitro* di sopravvivenza alle condizioni acide e ai sali di bile hanno significato per uno screening iniziale, utile per le aziende produttrici ma di nessun significato clinico.
2. I test *in vitro* di sopravvivenza alle condizioni acide e ai sali di bile devono comunque essere validati *in vivo*, pena la perdita di significatività.
3. I test *in vitro* possono essere utili per capire i meccanismi d'azione dei probiotici, ma non per valutare la loro capacità di colonizzazione dell'intestino.

vivere alle condizioni gastrointestinali sulla base di analisi *in vitro* espone al rischio di errore; solo la validazione nell'uomo può fornire adeguate risposte.

Conflitto di interessi

L'Autore dichiara di aver ricevuto finanziamenti o ha in atto contratti o altre forme di finanziamento con: Unione Europea, MIUR, Regione Lombardia, Regione Emilia Romagna, Fondazione Cariplo, Fondazione Invernizzi, Soremartec, Sanofi India, Coree Ltd Hong Kong, Prodotti Gianni srl, Bauli Spa, Lactalis.

Bibliografia

- ¹ 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.
- ² Venema K, van den Abbeele P. *Experimental models of the gut microbiome*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2013;27:115-26.
- ³ Gorbach SL, Goldin BR. *L. acidophilus strains*. July 1991. US patent 5,032,399.
- ⁴ Segers ME, Lebeer S. *Towards a better understanding of Lactobacillus rhamnosus GG - host interactions*. Microb Cell Fact 2014;13(Suppl 1):S7.
- ⁵ Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. *Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells*. J Dairy Sci 1987;70:1-12.
- ⁶ Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, et al. *Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract*. J Appl Microbiol 1998;84:759-68.
- ⁷ Morelli L. *In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal*. Curr Issues Intest Microbiol 2000;1:59-67.
- ⁸ Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, et al. *Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans*. Appl Environ Microbiol 1999;65:4949-56.
- ⁹ Del Piano M, Ballarè M, Anderloni A, et al. *In vitro sensitivity of probiotics to human gastric juice*. Dig Liver Dis 2006;38:134.
- ¹⁰ Del Piano M, Carmagnola S, Ballarè M, et al. *Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics*. Gut Microbes 2011;2:120-3.
- ¹¹ Del Piano M, Strozzi P, Barba M, et al. *In vitro sensitivity of probiotics to human pancreatic juice*. J Clin Gastroenterol 2008;42(Suppl 3):S170-3.