SAGGIO GRATUITO
FUORI CAMPO APPLICAZIONE IVA

Volume 30, Numero 4
Luglio/Agosto 2008
N. 167
ISSN 0391-5387

LA PEDIATRIA
MEDICA E CHIRURGICA

Medical and Surgical Pediatrics

SPEDIZIONE IN ABBONAMENTO POSTALE 45%
ART. 2 COMMA 20/b LEGGE 662/96 - P.T.VICENZA

TASSA RISCOSSA - TAXE PERÇUE - UFFICIO POSTALE VICENZA FERROVIA (ITALY)

Metchnikoff e il centenario dei probiotici. Dall'intuizione alla scienza

G. Caramia

Elia Metchnikoff (1845-1916) premio Nobel della Medicina per i suoi studi sulla fagocitosi, aveva constatato che il latte fermentato,ottenuto per fermentazione e coagulazione acida del latte dovuta a due microrganismi,il *Lactobacillus Bulgaricus* e lo *Streptococcus thermophilus*, era l'alimento base di alcune popolazioni di pastori molto longeve del Caucaso e della Bulgaria la cui vita media,in base ai rapporti dell'epoca, era di 87 anni contro i 48 degli statunitensi.Aveva pertanto ipotizzato che la loro forza e longevità era dovuta al latte fermentato e ai suoi germi, i batteri lattici attivi contro la putrefazione, e quindi che non tutti i microrganismi sono dannosi alla salute dell'uomo:alcuni batteri nell'intestino producono sostanze utili contro l'invecchiamento.

Per indagare gli eventuali benefici del latte fermentato sulla salute dell'uomo,dopo un periodo trascorso in Italia, a Messina, dove conduce gli studi sulla fagocitosi e l'immunità cellulo mediata che lo porteranno al Premio Nobel nel 1908, si trasferisce nel 1888 presso l'Istituto Pasteur di Parigi dove conduce le ricerche sui latti fermentati evidenziando l'azione positiva di questi prodotti sulla flora intestinale e sull'uomo in quanto,secondo la sua ipotesi,eliminavano i microrganismi produttori di tossine,normalmente presenti nel tratto intestinale.

Per tale motivo nel 1906 la società "Le Fermente" inizia a commercializzare un latte fermentato "Lactobacilline"prodotto con ceppi batterici selezionati dallo stesso Metchnikoff. Il prodotto ottenuto per fermentazione e coagulazione acida del latte dovuta ai due microrganismi,il *Lactobacillus Bulgaricus* e lo *Streptococcus thermophilus* utilizzati dai pastori del Caucaso e della Bulgaria,ottiene grande successo fra il pubblico dei consumatori.

Nel 1907 Metchnikoff nel suo libro "*The prolungation of life.Optimistic studies*" conferma che non tutti i microrganismi sono dannosi alla salute dell'uomo e ipotizza che "*The dependence of the intestinal microbes on the food makes it possible to adopt measures to modify the flora in our bodies and to replace the harmful microbes by useful microbes*"[1]. È nato così,cento anni fa nel 1907 per opera di Metchnikoff, il concetto di probiotico,dal greco "pro-bios"a favore della vita.

Alcuni anni dopo,nel 1925,il prodotto viene messo in vendita con il termine "yogurt"(youghourt),termine che entra nel dizionario "Petit Larousse",e si diffonde rapidamente in tutta Europa e nell'America del Nord. Non mancano però anche delle aspre critiche perché tali microrganismi non vengono riscontrati nelle feci dei consumatori di "yogurt"per cui non sarebbe dimostrata alcuna attività probiotica da parte di questi due batteri, contrariamente a quanto affermato e comunemente pensato. L'intuizione di Metchnikoff, basata su empirismo,osservazioni scientifiche e geniale intuizione,è stata quindi derisa dalla comunità scientifica del-

Primario Emerito di Neonatologia e Pediatria - Azienda Ospedaliera Specializzata Materno Infantile "G. Salesi" - Ancona

l'epoca ma i vantaggi arrecati dallo yogurt sono rimasti nell'immaginario collettivo per cui il suo uso si è sempre più diffuso.
Sempre negli anni Venti Minoru Shirota,microbiologo dell'Università Giapponese di Kyoto,scopre che alcuni batteri della flora intestinale contribuiscono alla difesa dell'organismo contro i batteri patogeni.Gli studi che seguono portano ad isolare e coltivare il *Lattobacillus casei* (Lc),denominato poi Lc Shirota,e nel 1935 inizia in Giappone la produzione di una bevanda contenente tale microrganismo e denominata Yakult che, nel corso degli anni si è diffusa in tutto il mondo.
Un importante contributo alla teoria di Metchnikoff è venuta nel 1936,da due veterinari,Zobell e Andersen, che hanno prospettato l'esistenza a livello del grosso intestino,di una "pellicola microbica",fatta dalla popolazione di microrganismi dell'intestino aderenti alla mucosa intestinale, che rappresenta un "complesso ecosistema sede di intense attività metaboliche".
L'origine del termine "probiotico" (da distinguere da fermento lattico riservato a batteri che non sono di derivazione umana e che producono acido lattico) andrebbe attribuito al ricercatore tedesco Ferdinand Vergin che nel 1954 proponeva di usare il termine "Probiotika"per le "*active substances that are essential for a healthy development of life*"[2]. Però in un articolo pubblicato su "Science"nel 1962,due veterinari Lilly and Stillwell, molto verosimilmente all'insaputa di quanto proposto da Vergin, chiamavano "probiotics" i cosiddetti "fermenti lattici",cioè "*batteri anaerobi in grado di produrre acido lattico, a partire da differenti substrati dietetici, e di stimolare la crescita di altri microrganismi*"[3]. Quest'ultimo termine, adottato anche in contrapposizione a quello di antibiotico (contro la vita) che in quegli anni era al suo massimo splendore per la scoperta e messa a punto di nuovi importanti farmaci ad azione antibatterica, entra così nell'uso corrente,non solo in ambito medico.
Con il progredire delle conoscenze sul ruolo fisiologico e terapeutico dei probiotici, le definizioni di probiotico sono divenute sempre più elaborate ed esaurienti.Così Parker nel 1974 è stato il primo ad usare il termine per identificare gli integratori per l'alimentazione zootecnica a base di microrganismi,definendoli: "*organisms and substances which contribute to intestinal microbial balance*". Questo nuovo concetto ha avuto successo,sopratutto grazie ai lavori di un microbiologo inglese,Roy Fuller, specializzato nello studio dei batteri lattici, che nel 1989 ha eliminato dalla definizione le "sostanze"attribuendo ai soli microrganismi le capacità probiotiche: "*a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance*"[4].
Qualche anno dopo, due ricercatori olandesi, Havenaar R e Huis in't Veld JH, hanno esteso la definizione, includendo nell'azione benefica dei microrganismi probiotici anche le microflore dell'apparato uro-genitale e delle prime vie respiratorie.I probiotici diventano quindi: "*mono- or mixed culture of live microorganisms which applied to animal or man, affects beneficially the host by improving the properties of the indigenous microflora*"[5].
Il meccanismo d'azione proposto rimane quello del riequilibrio della microflora e,l'evoluzione delle conoscenze scientifiche,dà origine al concetto di probiosi cioè a quell'insieme di effetti benefici,determinati,in particolare a livello intestinale, da colture batteriche vive e vitali, generalmente appartenenti ai generi *Lactobacillus* (batteri gram-positivi,anaerobi aerotolleranti,con metabolismo fermentativo e produzione di acido lattico,CO2 e/o etanolo) e *Bifidobacterium* (batteri gram-positivi,anaerobi,con morfologia a forcella e metabolismo glucidico) ingerite in quantità sufficiente a superare la barriera gastrica e ad insediarsi nel tratto intestinale.
Gli effetti benefici di tali microrganismi nel mantenimento della salute,sono dovuti alle loro attività metaboliche protettive che ostacolano la colonizzazione di microrganismi patogeni,attraverso la produzione di sostanze antimicrobiche,l'alterazione dell'ambiente e la sottrazione di nutrienti essenziali.Inoltre danno luogo a produzione di acido lattico,di acido acetico,di acqua ossigenata,di enzimi,di antibiotici,di batteriocine con variazione del potenziale redox e abbassamento del valore del pH,di acidi grassi volatili (VFAs) a corta catena,in special modo il butirrico,ottimo nutrimento per le cellule della mucosa del colon con migliore assorbimento delle sostanze nutritive a discapito di quelle tossiche,azione protettiva contro le malattie infiammatorie intestinali e lo sviluppo del cancro al colon,di vitamine (in particolare la B1,B2,B6,B12,PP, H,acido pantotenico, acido folico, vitamina K),di batteri che detossificano le ammine aromatiche eterocicliche,di batteri che, aderendo alla parete intestinale,sono coinvolti nell'espressione di specifici geni dell'ospite o che, aumentando l'espressione di peptidi e proteine ne mantengono la funzione di barriera, e, agendo sul sistema immunitario di una immunomodulazione,con secrezione di IgA,espressione di citochi-

ne favorevoli all'organismo (IL-10 e TGF-beta) e inibizione di quelle pro infiammatorie (IL-1,IL-6,IL-8,IL-12, TNF-alfa).
Attualmente viene definito probiotico, un preparato microbiologico che contiene batteri vivi, compresi i loro componenti e i loro prodotti metabolici e che,somministrato per via orale,possiede caratteristiche e proprietà specifiche.
Rispettando le "Linee guida probiotici e prebiotici"(Dicembre 2005) redatte dal Ministero della Salute si possono così riassumere:

- non deve perdere le proprie caratteristiche durante la conservazione;
- deve essere normalmente presente nell'intestino dell'uomo;
- deve essere in grado di sopravvivere,superare la barriera gastrica, resistendo all'azione digestiva del succo gastrico,degli enzimi intestinali e dei sali biliari e di colonizzare l'intestino:per tale motivo la dose minima efficace,peraltro indicativa perché molto dipende dal ceppo utilizzato e dalla preparazione,è di 10^7 cfu/giorno;
- deve essere in grado di aderire alle cellule intestinali e colonizzarle:nel meccanismo di adesione e degli scambi diretti con la mucosa stessa è coinvolta la struttura della membrana batterica, le proteine di superficie ed eventualmente anche quelle secrete:in tale ottica va segnalata la possibile induzione apoptotica su linee cellulari neoplastiche, recentemente evidenziata, fenomeno che apre probabili implicazioni terapeutiche;
- deve esercitare funzioni metaboliche a livello enterico,con effetto benefico per la salute umana,e antagonismo nei confronti di microrganismi patogeni con produzione di sostanze antimicrobiche;
- non deve dare reazioni immunitarie o altrimenti nocive ed essere pertanto considerati sicuri (GRAS status: generally recognised as safe).Anche la resistenza agli antibiotici deve essere valutata dato che se è intrinseca o dovuta a mutazione genetica,il ceppo è accettabile mentre se è insorta per un trasferimento genico orizzontale (es.trasposoni,segmenti di DNA genomico che si staccano per inserirsi in un altro punto,plasmidi coniugativi portatori di geni di resistenza,batteriofagi temperati o virulenti) la sua scelta diventa più problematica;
- deve infine essere somministrato in dosi adeguate e avere un rapporto costo/efficacia favorevole.

Strettamente connesse con il concetto di probiosi,cioè di un insieme di azioni favorevoli nel mantenimento della salute determinato da colture batteriche vive e vitali a livello intestinale,sono una serie di azioni sul sistema immunitario.
È noto infatti che,a livello della mucosa intestinale,la microflora ha un ruolo immunitario importante poiché concorre a formare la barriera intestinale che se ben funzionante,previene il passaggio anomalo di antigeni intraluminali,potenzialmente dannosi,e riduce la carica antigenica degradando gli antigeni che stanno per penetrare nella mucosa.Inoltre attiva,a livello della mucosa intestinale,l'azione difensiva di fagociti,plasmacellule e di linfociti,mediante sostanze prodotte da lattobacilli durante il processo di fermentazione,con la funzione di evitare che batteri intestinali possano attraversare la mucosa ed arrivare ai tessuti.La risposta immunitaria ai microrganismi è a livello delle Placche di Peyer, dove i linfociti migrano,si addensano,maturano e si diffondono in tutto l'organismo:tale risposta è adeguata e rispettosa dell'integrità morfologica e funzionale della struttura in cui si svolge.
Questo infiltrato rappresenta la cosiddetta "infiammazione fisiologica"della mucosa intestinale normale, che nasce e si sviluppa in seguito alla massiva stimolazione del sistema immunitario mucosale ad opera di antigeni presenti nell'intestino ma non altera la permeabilità intestinale permettendo il passaggio di antigeni responsabili del processo di sensibilizzazione.
Per quanto riguarda le cellule T regolatorie del sistema immunitario,è noto che il feto risponde immunologicamente verso antigeni che attraversano la placenta e sono presentati al suo sistema immunitario. L'unità feto-placentare è sede di intensa attività immunologica caratterizzata da una prevalenza dei linfociti T-helper di tipo 2 (Th2),con aumentata produzione di IL4,IL5,IL9,IL13, rilasciate da tali linfociti per evitare un possibile rigetto materno del feto, evento questo mediato dai linfociti T-helper di tipo 1 (Th1).I neonati,quindi hanno una predisposizione di tipo allergico (asma, rinite ecc),specie quelli atopici, fino a quando non si realizza il fisiologico "switch"del sistema immunitario agli stimoli antigenici da un tipo di risposta Th2 (atopica) verso una risposta di tipo Th1 (fisiologica e protettiva), con conseguente persistenza del profilo citochinico correlato all'insorgenza di allergia come evidenziato anche in un articolo pubblicato in questo numero[6].

L'imprinting immunologico avverrebbe nei primi giorni di vita e di sviluppo del sistema immunologico ad opera di un corretto equilibrio dei microrganismi,Lattobacilli ed i Bifidobatteri,a livello di tenue e colon,in quanto modulatori e favorenti una fisiologica maturazione del sistema immune.Si determinerebbe così un aumento dei linfociti Th1,deputati alla difesa contro gli agenti infettivi e coinvolti nella regolazione della tolleranza immunologia, e di IgA secretorie, controregolando i linfociti Th2, la risposta IgE mediata e prevenendo le suddette patologie allergiche[7]. Pertanto la microflora che colonizza il nostro intestino durante i primi mesi di vita,interagendo con i nutrienti funzionali quali il latte materno,condiziona,promuovendo lo sviluppo del GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), la regolazione della risposta immune, sia locale sia sistemica,e garantisce adeguate capacità di difesa all'organismo.
Le mutate abitudini alimentari che hanno portato ad un cambiamento della composizione della microflora intestinale con prevalenza degli enterobatteri, anche patogeni, su bifidi e lattobacilli, ha determinato un effetto negativo sulla immunomodulazione bloccando la corretta maturazione e favorendo la comparsa di patologie allergiche[8].
La flora batterica residente e la tolleranza della mucosa intestinale a tali microrganismi sono pertanto elementi chiave per la costituzione di una "barriera"mentre il sistema immunitario intestinale svolge la funzione di filtro e di regolazione della risposta immune locale e sistemica.
La conferma all'ipotesi che i microrganismi probiotici siano in grado di modulare in senso anti-atopico la risposta immune, arriva, almeno in parte, anche dagli studi che sono stati effettuati negli ultimi anni sulla dermatite atopica nei bambini[8,9].
In questo senso i probiotici eserciterebbero da un lato un effetto anti-atopico attraverso una down-regulation sia della risposta di tipoTh2 (con inibizione delle citochine IL-4,IL-5,IL-9 e IL-13 rilasciate dai linfociti helper Th2) sia della produzione di IgE (determinata dai mastociti a livello cutaneo e mucoso e dall'eosinofilia locale e periferica),tutte premesse per lo sviluppo dell'atopia,e dall'altro un aumento delle citochine plasmatiche IL-10 e IL-12,quest'ultima principale responsabile dello switch della polarizzazione delle cellule Th2 verso le Th1 a carattere regolatorio[10].
I probiotici così estenderebbero la loro azione benefica anche al di là del tratto gastrointestinale per cui la spiegazione patogenetica delle malattie allergiche legata alla "hygiene hypothesis"è stata rivista e,del tutto recentemente,considerata come "old friends hypothesis".
Con la messa in luce dell'azione sulla risposta immune aspecifica (produzione di citochine plasmatiche IL-6,IL-10,IL-12),umorale (produzione di IgA secretorie),cellula-mediata (modifica dell'espressione di linfociti T) e sulla produzione di particolari citochine (stimolo allo shift da Th2 a Thl), per l'azione di potenziamento della barriera e della permeabilità della mucosa intestinale,la vecchia "batterioterapia orale",usata da decenni nella prevenzione e terapia delle varie forme di gastroenteriti nell'età evolutiva e nell'adulto,è evoluta e sta assumendo una veste scientifica e, in considerazione dell'elevato livello di evidenze, alcuni probiotici incominciano a trovare indicazioni sempre più chiare in varie condizioni patologiche.
L'eterogeneità clinica e statistica dei tanti studi condotti,l'eterogeneità dei prodotti utilizzati,e dei risultati ottenuti,non consentono però di trarre indicazioni conclusive sull'efficacia dei probiotici nelle varie patologie.
Ciò è dovuto anche al fatto che le potenzialità terapeutiche,attribuite all'aumento di batteri lattici nel lume intestinale e ai meccanismi di immunomodulazione,per l'assunzione di tipi diversi di probiotici,sono non solo specie-specifiche, ma ceppo-specifiche. Inoltre aspetti importanti sono la dose batterica ottimale, gli schemi e la durata del trattamento,il pH intestinale,la composizione e la carica dei diversi ceppi della flora microbica,cioè la microecologia intestinale del soggetto nel momento in cui viene sottoposto al trattamento e infine da quanto tempo si è instaurata la condizione patologica che si vuole curare o solo prevenire.
I dati promettenti devono pertanto essere confermati da studi controllati di maggiori dimensioni,anche con l'aiuto della genomica e della postgenomica che permettono di identificare,nei batteri e nell'ospite,i geni implicati nelle complesse interazioni e gli effetti benefici. Tutto ciò sempre nel rispetto del principio fondamentale "*primum non nocére*", abbandonando approssimazione ed empirismo del passato per intraprendere la strada della medicina basata sulle evidenze.
Le numerose indagini condotte fino da oggi sul complesso ecosistema dell'intestino, e sui probiotici finalizzate alla comprensione dei meccanismi d'azione responsabili dei numerosi effetti benefici spesso osservati, rappresentano pertanto tappe basilari e importanti acquisizioni sull'alimentazione funzionale e, in un prossimo futuro,per gli sviluppi della nutrigenetica e nutrigenomica.

Gli antichi medici insegnavano che *"La morte risiede nell'intestino"*, Paracelso (1493-1541) medico e pensatore svizzero,progenitore della chimica farmaceutica,sosteneva che *"nell'intestino si trova la culla della morte e della vita"* mentre Pasteur (1822-1895) aveva già ipotizzato che *"life of upper animals would be impaired by the absence of indigenous microrganisms"*. È stata però la brillante intuizione di Metchnikoff, frutto forse di un antico sapere, che ha dato origine alla cultura e alla diffusione dell'uso dei fermenti lattici,e, evolvendo nel corso degli anni,nel concetto più ampio di "probiosi",ha aperto le porte ad un importante capitolo della scienza oggi denominato "probiotici,prebiotici ed alimenti funzionali".

BIBLIOGRAFIA

[1] Metchnikoff E.
The prolongation of life.Optimistic studies.
Putman and sons 1908:1-38.

[2] Vergin F.
Antibiotics and probiotics.
Hippokrates 1954;25:116-119.

[3] Lilly DM,Stillwell RH.
Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms.
Science 1965;147:747-748.

[4] Fuller R.
Probiotics in man and animals.
J Appl Bacteriol 1989;66:365-378.

[5] Huis in't Veld JH,Havenaar R,Marteau P.
Establishing a scientific basis for probiotic R&D.
Trends Biotechnol 1994;12:6-8.

[6] Valsecchi C,Marseglia A,Ricci A,et al.
Probiotici e bambini:è utile un'integrazione nei casi di allergia?
Ped Med Chir 2008;30:197-203.

[7] Björkstén B.
Environmental influences on the development of the immune system:consequences for disease outcome.
Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program 2008;61:243-254.

[8] Giovannini M,Agostoni C,Riva E,et al.
A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing Lactobacillus casei in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. Felicita Study Group.
Pediatr Res 2007;62:215-220.

[9] Caramia G,Atzei A,Fanos V.
Probiotics and the skin.
Clinics Dermatology 2008;26:4-11.

[10] Castellazzi AM,Valsecchi C,Montagna L,et al.
In vitro activation of mononuclear cells by two probiotics:Lactobacillus paracasei I 1688, Lactobacillus salivarius I 1794, and their mixture (PSMIX).
Immunol Invest 2007;36:413-421