

## DOMANDE D'ESAME

## 1. DEFINIZIONE PROBIOTICI SECONDO FAO/WHO E MINISTERO DELLA SALUTE

According to FAO/WHO probiotics are **live microorganisms that confer a health benefit on the host, when administrated in adequate amounts.**

According to the Italian Ministry of Health probiotics are **viable and active microorganisms that confer health benefits on the host, when consumed in adequate quantities as part of a food or a supplement.**

There are some difference in these definitions. First, in Italy probiotics can be used just in food context indeed there is the word "consumed" by eating; instead for FAO/WHO probiotics can be used in drugs because in the he definition refers to "administrate" probiotics. Other difference is that for the Italian legislation probiotics need to be "viable and active" when they arrive in the intestine, and it means that they are able to multiply and colonize the gut exerting a balancing action on the intestinal microflora (so it isn't enough to be alive in the product); instead in the FAO/WHO definition this is not specify. According to both the definition, microorganism need to be alive in adequate amounts during all the shelf-life.

## 2. COS'È "BILE SALT DECONJUGATION" E COSA CAUSA?

With the purpose to verify the safety of a probiotic defining it as GRAS, assessments of certain metabolic activities must be done such as the bile salt deconjugation.

This activity is due to the microbial enzyme **bile salt hydrolase (BSH)** that is responsible of the **removal of glycine and taurine from bile acids.**

This activity is essential to prevent the reabsorption of bile acids in the small intestine (bile acids without glycine and taurine became less water soluble), because bile acids are toxic for probiotics (bile acids can damage the cell membrane of microorganisms).

But in the other hand, if there is an excessive deconjugation, there will be problems of malabsorption of bile acids that can cause chronic diarrhea. This upset especially happens in SIBO that are people with a small intestinal bacteria overgrowth.

Seeing that o considering that o given that [=visto che]

La bile salt deconjugation è un'attività metabolica svolta dai microrganismi (tra cui probiotici) che hanno l'enzima **bile salt hydrolase (BSH)** che rimuove gli amminoacidi glicina e taurina dagli acidi biliari. Queta rimozione è un'attività essenziale per i probiotici perché gli acidi biliari sono tossici per i probiotici perché danneggiano la membrana cellulare. Rimuovendo i due amminoacidi gli acidi biliari diventano meno assorbibili e quindi non causano danni al microrganismo. Dall'altro lato questo è negativo per l'ospite perché un'eccessiva deconjugazione può portare ad un malassorbimento degli acidi biliari che causa diarrea cronica. Questo problema si osserva soprattutto negli individui SIBO che sono quelli che hanno un'overgrowth di batteri nel piccolo intestino.

## 3. SCRIVERE 2 CEPPI USATI A SCOPI PRODUTTIVI

Some of the most used probiotic strains in food in Europe:

*Lactoseibacillus rhamnosus* GG used for example by Actifit Plus

*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB12

*Lactoseibacillus paracasei* Shirota used by Yakult

*Saccharomyces cerevisiae* Boulardii

*Escherichia coli* Nissle 1917 (Gram -)

## 4. QPS by EFSA

QPS means "**qualified presumption of safety**" and its concepts is similar to that of GRAS ("generally recognize as safe") introduced by FDA.

The difference between QPS and GRAS is that QPS is related to the microorganism so its taxonomy (species) while GRAS is related to the application/use of microorganisms.

**QPS has no value for strain-specific characteristics**, so it's related only to a species. Consequently, it's also necessary to evaluate the strain-specific antibiotic resistance in QPS species.

For example, *E. coli* isn't QPS because the species has a large heterogeneity, although the strain Nissle 1917 is a probiotic so considered as safe.

QPS is attributed by EFSA to microorganisms though a process based on 4 pillars:

- Taxonomy identification
- History of established and safe use
- Pathogenicity and toxicity assessment
- End use

QPS significa Qualified Presumption of Safety ed è stato definite da EFSA. È un concetto simile al GRAS (Genereally recognise as Safe) di FDA. Le **differenze** sono che GRAS riguarda il microrganismo aggiunto nell'alimento, invece QPS riguarda il microrganismo (genere – genus – e specie). QPS non si riferisce al ceppo perché all'interno della specie c'è eterogeneità; per esempio in *E. coli* c'è il ceppo O157:H7 che è patogeno e il ceppo Nissle 1917 che è probiotico.

Per definire un microrganismo QPS ci sono 4 step: identificazione tassonomica, definizione della sicurezza d'uso, analisi di patogenicità e tossicità, uso finale.

## 5. COS'È L'“ANTIBIOTIC RESISTANCE” E PERCHÉ È PERICOLOSA?

The antibiotic resistance is the first assessment conducted in order to declare if a probiotic is GRAS.

There is a difference between a natural/intrinsic antibiotic resistance and an acquired antibiotic resistance:

- In the natural antibiotic resistance there is a very low potential transfer among microorganisms because genes supposed to codify for the antibiotic resistance are in chromosomal DNA. The natural resistance is typical of all strains of a certain species. The defense mechanism are generally related to a low affinity of the antimicrobial for the target, a reduced permeability of the antimicrobial or the emission of the antimicrobial from the cell thanks to a system of active pumps.
- In the acquired antibiotic resistance there is much more risk because the potential transfer among microorganisms is very high since [= dato che] genes of antibiotic resistance are in plasmids. Indeed [=infatti], **bacterial strains that present an acquired antimicrobial resistance mustn't be used as a food additive, unless it is demonstrated that is the result of chromosomal mutations**. So the acquired resistance can cause concern or not, depending on where the gene is found (plasmids or chromosomal DNA).

The risk is that the antibiotic resistance can be transferred to undesirable/pathogenic microorganisms and with a progressive accumulation of genes generate a “*multidrug-resistant bacteria*” also called “superbugs”.

L'antibiotico resistenza è la prima analisi da fare per definire un probiotico come GRAS. L'antibiotico resistenza può essere:

- **Acquired.** È più pericolosa perché c'è un più alto potere di trasferimento del gene con l'antibiotico resistenza. La mutazione generalmente si trova nei plasmidi, che sono elementi genetici mobili, quindi il trasferimento tra specie avviene facilmente. Per questo motivo questi microrganismi non possono essere utilizzati come probiotici, a meno che venga dimostrato che la mutazione è a livello di DNA cromosomale. Il rischio più pericoloso si ha nel caso dei “superbugs” che sono microrganismi in cui c'è una progressiva accumulazione di geni modificati. I meccanismi di difesa riguardano una modifica del target dovuto alla mutazione o un'inattivazione della medicina che causa un alto rischio di resistenza.
- **Natural.** È meno pericolosa perché l'antibiotico resistenza è nel DNA cromosomale e questo la rende meno trasferibile. Questa antibiotico resistenza è tipica di tutti i ceppi di una specie. I meccanismi di difesa riguardano una bassa affinità dell'antimicrobico per il target o ad una riduzione della permeabilità dell'antimicrobico, o la fuoriuscita dell'antibiotico dalla cellula grazie al sistema di pompe attive.

Quindi l'antibiotico resistenza è pericolosa perché causa un'inefficienza [=inefficiency] degli antibiotici e quindi diventa più complicato curare certe malattie.

Un esempio di microrganismo probiotico con antibiotic resistance è il *B. animalis subsp. lactis*.

## 6. LO YOGURT È UN PROBIOTICO? MOTIVARE LA RISPOSTA

**Yogurt isn't a probiotic product**, like lots of other fermented food products, although it is associated with health benefits.

There are two reasons why yogurt shouldn't be considered probiotic:

- **Yogurt is produced with different bacterial strains depending on the producer, so we don't fully know its microbiological composition**, but only that it contains *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (only genus, species and subspecies), and **the probiotic effect is strain-dependent!**
- Also a legal reason because in Europe yogurt is a conventional food while probiotic products are considered novel food, so the reference law is different.

Anyway, because of the health benefit of yogurt, EFSA has approved the health claim related to the improvement of the lactose digestion with a consumption of at least  $10^8$  CFU/g.

## 7. MICRORGANISMO USATO PER CURARE ULCERA È CONSIDERATO PROBIOTICO? MOTIVARE LA RISPOSTA

**A probiotic product is supposed to improve the health conditions/well-being of people in good health**, indeed they are considered as “*functional food*”.

For this reason, in Italy a probiotic product is related to food or supplements but not to drugs.

In conclusion, a microorganism used to contrast ulcer (like other diseases) isn't considered probiotic but a “*live biotherapeutic product*” that contains live microorganisms in order to prevent/treat/cure a disease.

Secondo la legislazione italiana i probiotici non sono *drugs* e quindi non possono essere usati per curare l'ulcera. Invece i probiotici sono considerati “*functional food*” che sono alimenti che promuovono la salute di persone che sono già in buone condizioni salutari. Quindi un microrganismo usato per curare l'ulcera non è un probiotico, ma potrebbe essere un *live biotherapeutic product* che contengono microrganismi vivi usati per prevenire/curare malattie.

## 8. COS'È “GENETIC DRIFT”? FARE UN ESEMPIO

The “genetic drift” is a **result of progressively and accumulated DNA mutations that can cause the loss of probiotic properties**. In order to reduce the genetic instability of probiotics, the number of generations of a probiotic strain during the industrial process need to remain as low as possible.

An example is the case of the hypermutability of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG that involves the deletion of regions of genes encoding the pili subunits involved in adhesion to mucosa so the bacterial persistence in the human intestinal tract (probiotic capacity).

### 9. COME SI CHIAMA UN PRODOTTO PROBIOTICO CHE CONTIENE CELLULE MORTE E UNO CONTENENTE METABOLITI?

According to the definition of probiotic, a probiotic product must contain live microorganisms in a minimum amount, in order to explicate the probiotic effect.

Also no-viable microbial cells and products of microbial metabolism have probiotics effect, but a product contains only dead cells or metabolites can't be named as probiotic according to the legislation.

*A product contains no-viable microbial cells that confer health benefit when administrated in adequate amount is called "para-probiotic" while a product contains any substances produced through the metabolic activity of the microorganism and that exerts a beneficial effect on the host directly or indirectly is called "post-biotic".*

Para-probiotics and post-biotics represent an opportunity for facilitate the use of NGP in food and supplements.

Per definizione i microrganismi probiotici devono essere vivi, quindi un prodotto che contiene cellule morte o metaboliti non è un probiotico.

Però ci sono i para-probiotici che sono prodotti che contengono cellule morte; e i post-biotici che contengono metaboliti.

I para e post-biotici possono avere un'azione sulla salute, questo perché nell'intestino umano sono presenti dei recettori che li riconoscono.

### 10. DIFFERENZE TRA "NEXT GENERATION PROBIOTIC" E "LIVE BIOTHERAPEUTIC PRODUCTS"

*NGPs are microorganisms never previously intended for human consumption and for which the ability to bring health benefit of the host has been demonstrated.*

*Biotherapeutic products contain microorganisms supposed to prevent/treat/cure a specific disease.*

So the first are like probiotic while the second are intended to be used like drugs.

From a scientific point of view, NGPs can be considered as probiotics, because they improve the state of health, but from a legal point of view they are under the category of biotherapeutic products (medicine), because EFSA and FDA has declared that microorganisms never used for the human consumption, they never be accepted inside food and supplements.

Dal punto di vista scientifico possono essere considerati probiotici perché hanno un effetto positivo sulla salute del consumatore, ma dal punto di vista legale sono considerati live biotherapeutic products perché FDA e EFSA dichiarano che solo i microrganismi che hanno una lunga storia di consumo umano possono essere usati come probiotici negli alimenti. I live biotherapeutic products possono essere utilizzati come medicine.

Gli NGP sono una categoria di live biotherapeutic products.