

AUTORI

V. Taverniti

SACCO SYSTEM,
Cadorago (Como)

✉ v.taverniti@saccosrl.it

Microrganismi inattivati e come descriverli

Postbiotici, paraprobiotici e altri -biotici: molte definizioni, in attesa di indicazioni

ABSTRACT

Inactivated microorganisms and how to describe them

The use of non-viable microorganisms with beneficial effects on host's health as food supplements opens up many perspectives, which go beyond the simple usefulness of developing more stable and versatile products. This is a new frontier that raises questions and stimuli for the scientific, industrial and regulatory world. Characterizing, producing and regulating inactivated microorganisms is an opportunity to increase knowledge on probiotic microorganisms (traditional and next-generation probiotics), production technologies, analytical methods for the quantification, mechanisms of action and to expand their use, with new applications for different categories of consumers. Although there are currently gaps at the regulatory level and official definitions, which are being worked on, the sector of inactivated microorganisms and their components is growing rapidly and at the same time presents challenges and opportunities, for which all interested parties must be prepared.

RIASSUNTO

L'uso di microrganismi non vitali con effetti benefici per la salute dell'ospite come integratori nutrizionali apre a tante prospettive, che vanno oltre la semplice utilità di sviluppare prodotti più stabili e versatili. Si tratta di una nuova frontiera che pone interrogativi e stimoli per il mondo scientifico, industriale e regolatorio. Caratterizzare, produrre e disciplinare i microrganismi inattivati è un'occasione per aumentare le conoscenze sui microrganismi probiotici (tradizionali e di ultima generazione), sulle tecnologie di produzione, sui metodi analitici di quantificazione, sui meccanismi di azione e di espandere il loro utilizzo, con nuove applicazioni per diverse categorie di consumatori. Nonostante ci siano al momento dei vuoti a livello regolatorio e di definizioni ufficiali, sui quali si sta lavorando, il settore dei microrganismi inattivati e di loro componenti cresce velocemente e prospetta al contempo sfide e opportunità, per le quali tutti i soggetti interessati devono farsi trovare preparati.

PAROLE CHIAVE

Tindalizzati
Lisati
Microrganismi
non vitali
Citometria a flusso
Inattivazione
termica

Introduzione

Un aspetto fondamentale del tema dei microrganismi inattivati può essere introdotto e riassunto da una dichiarazione presente sul sito ufficiale dell'International Probiotic Association (IPA):

“Mentre la definizione evolve, il potenziale dell'uso dei postbiotici a beneficio della salute sta diventando evidente, soprattutto in situazioni in cui l'uso di microrganismi vivi può non essere raccomandato.*

L'argomento è quindi quello di un'alternativa all'uso di microrganismi vivi nel campo degli integratori nutrizionali (*food supplements*), che comprende sia l'utilizzo dei probiotici “tradizionali” con una lunga storia di utilizzo (ovvero, nel panorama europeo, delle specie microbiche afferenti alle liste di presunzione qualificata di sicurezza redatte e aggiornate periodicamente dall'EFSA: <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>) e di probiotici di ultima generazione (*next-generation probiotics*) (1), ovvero probiotici di recente identificazione (grazie principalmente ad analisi genomiche comparative sulla composizione del microbiota intestinale), tipicamente di origine intestinale umana, comprendente quindi prevalentemente microrganismi anaerobi stretti, per i quali è necessaria, non possedendo una lunga storia di utilizzo, una valutazione documentata degli aspetti di sicurezza (2).

Nella review verrà esaminato il tema dei microrganismi inattivati dal punto di vista delle definizioni, ancora non ufficiali, del quadro regolatorio provvisorio, delle tecnologie di inattivazione e delle possibili tecniche di quantificazione, dei potenziali meccanismi di azione e di un mercato in fermento che marcia a una diversa velocità, trainando tutti gli altri aspetti, ancora in divenire.

Quando la forma è sostanza: in attesa di definizioni condivise

L'incipit presente nella dichiarazione dell'IPA “*Mentre la definizione evolve*” citata in precedenza, fa riferimento al dibattito all'interno della comunità scientifica, e non solo, sulla definizione e sul significato da assegnare alla categoria dei “*postbiotics*”, termine che potrebbe evocare qualcosa di futuristico, anche se la ricerca in questo campo sia iniziata circa 100 anni fa e il significato originale fosse diverso. Difatti la prima volta che nella letteratura scientifica appare il termine “*postbiotics*” (3) la definizione faceva riferimento a “*fattori solubili prodotti dai probiotici*”, proponendo “*l'uso di componenti purificati e ben caratterizzati come alternativa più sicura per applicazioni cliniche, soprattutto in condizioni infiammatorie croniche come la malattia infiammatoria intestinale, dove i probiotici non hanno ancora dato risultati incoraggianti per quanto riguarda l'induzione della remissione*”. Pertanto, la definizione originale di postbiotico faceva riferimento a prodotti del metabolismo microbico, quindi a molecole e composti isolati e identificati. Qualche tempo prima dell'articolo sui *postbiotics*, viene pubblicata una proposta di definizione per i microrganismi probiotici inattivati, con il termine *paraprobiotics*, definendoli come “*cellule microbiche non vitali (intatte o rotte) o cellule grezze estratti (cioè con composizione chimica complessa), che, quando somministrati (per via orale o topica) in quantità adeguata, conferiscono un beneficio al consumatore umano o animale*” (4). Questa definizione fa pertanto riferimento a entità complesse, come quelle di una cellula intera o a estratti/lisati cellulari grezzi, ovvero non purificati e caratterizzati, per cui l'effetto sull'ospite non è riconducibile all'attività di una singola molecola, ma veicolata dalla compresenza e dal sinergismo di diverse componenti. I termini *postbiotics* e *paraprobiotics* sono stati usati nella letteratura scientifica secondo le rispettive definizioni proposte negli anni successivi, anche se

*<https://internationalprobiotics.org/home/seeking-clarity-on-postbiotics/>.

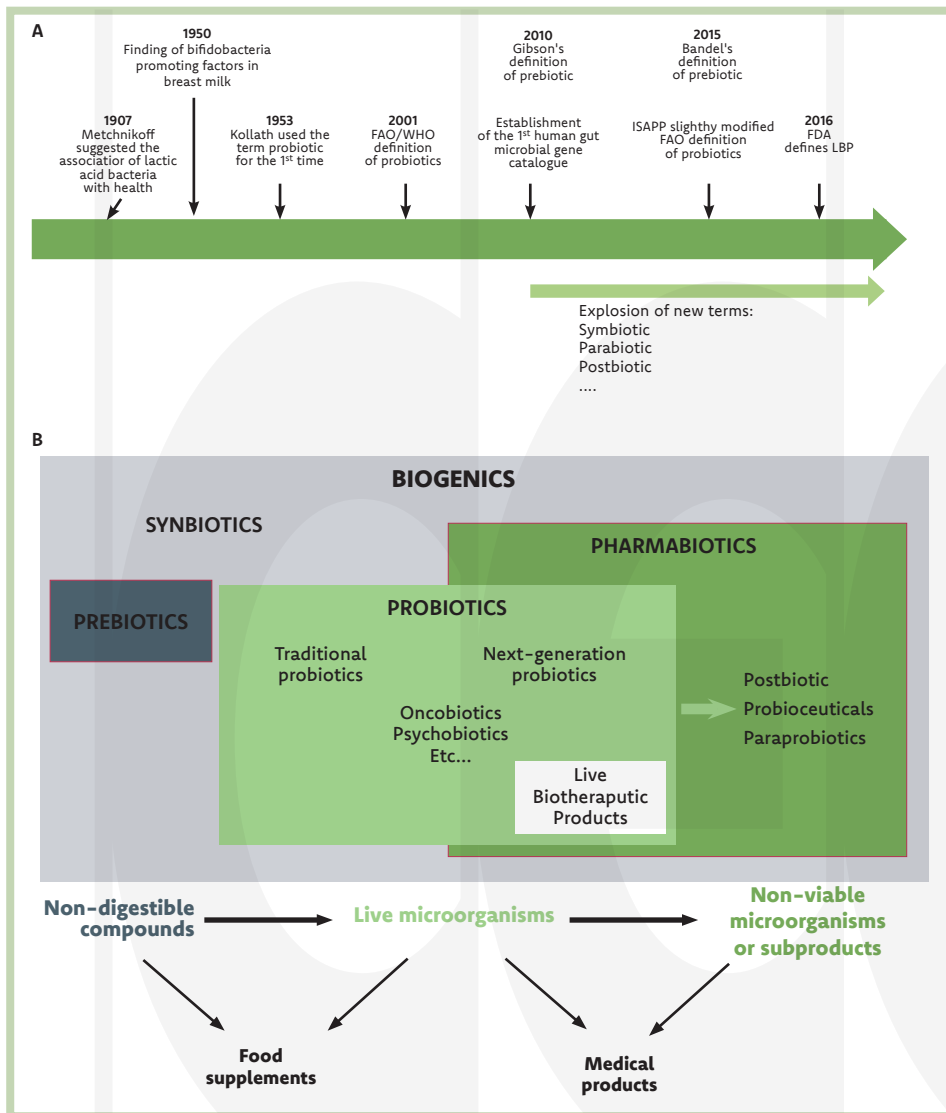


Figura 1 • Sequenza temporale (A) e panorama di alcuni termini usati nel campo dei probiotici (B). (Da: 2.)

altri termini sono via via apparsi (*metabiotics, psychobiotics, parabiotics, immunobiotics* ecc.).

Questo proliferare di definizioni (Figura 1) e il fatto che in alcune occasioni i termini *postbiotics* e *paraprobiotics* fossero stati usati in maniera ibrida e non aderenti al significato originale ha fatto sì che l'ISAPP nel 2021 pubblicasse un *consensus statement*, con l'intento di far chiarezza, proponendo come nuova definizione di postbiotico quella di "preparazione di microrganismi inanimati e/o loro componenti che conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite" specificando che "i postbiotici per essere efficaci devono contenere cellule inattivate o componenti cellulari, con o senza metaboliti, che contribuiscono ai benefici osservati per la salute" (5). A seguito di questa pubblicazione è seguito

uno scambio sulla rivista *Nature Reviews-Gastroenterology & Hepatology* in cui più di 40 scienziati firmatari hanno motivato con diversi punti la loro contrarietà al nuovo termine proposto (6), seguita poi dalla risposta dell'ISAPP (7), secondo le regole della *correspondence*. I punti fondamentali della contestazione al nuovo significato attribuito dall'ISAPP al termine *postbiotics* possono essere riassunti nell'utilizzo dell'aggettivo "inanimato", inesistente nel campo della microbiologia, usato per fare riferimento a cellule non vitali, il volere accorpare in unico termine sia cellule inattivate sia loro componenti e lo scartare l'esigenza di avere una definizione che racchiudesse la categoria dei meta-

boliti microbici, unitamente al fatto che fosse mancata una discussione estesa nell'ambiente scientifico a monte della pubblicazione di un "consensus" (6). Nella risposta finale dello scambio, l'ISAPP ha poi rinnovato l'utilità e appropriatezza della definizione da loro proposta, con la chiosa che "la decisione finale sulla definizione più appropriata e utile ricadrà sulla comunità scientifica e autorità di regolamentazione" (7).

Bisogna riconoscere che le definizioni di postbiotici e paraprobiotics, così come erano state inizialmente proposte, necessitano di essere migliorate, per evitare sovrapposizioni, imprecisioni o confusione.

Per esempio, un postbiotico può contemplare solo un singolo composto o anche una miscela di molecole note?

Il paraprobiotico deve riferirsi solo a cellule inattivate o anche a lisati, che quindi non comporterebbero la presenza di una struttura cellulare? Gli sforzi nel creare uniformità e chiarezza devono tenere conto di quanto giustamente sottolineato dall'ISAPP, soprattutto per quanto riguarda l'evidenza di ambiguità presente in letteratura (5). Una possibilità potrebbe essere quella di mantenere entrambe le definizioni di paraprobiotico e postbiotico, poiché indicano concetti e categorie molto diverse, nonostante molti aspetti debbano essere discussi nella prospettiva di raggiungere un consenso. Per esempio, il termine paraprobiotico può risultare elaborato e, probabilmente, non facile per i consumatori e poco attraente per il marketing, motivo per il quale il termine postbiotico ha avuto molta più risonanza ed è, di fatto, quello più diffuso e accettato.

Aldilà del fatto che si ritenga opportuno o efficace mantenere esattamente la parola "*paraprobiotic*", sarebbe utile e scientificamente fondato avere un termine che si riferisca a cellule microbiche, che conservano ed esercitano proprietà specifiche, non dipendenti dalla vitalità, e che quindi si comportano in modo simile ma non uguale alle cellule vitali. L'utilizzo di microrganismi inattivati implica benefici per la salute derivanti da una moltitudine di fattori molecolari che potrebbero interagire in modo sinergico o additivo. E questo aspetto vale anche per i probiotici convenzionali.

Da queste considerazioni deriva la necessità di distinguere componenti e/o fattori molecolari di origine microbica dall'uso di matrici complesse derivanti da cellule microbiche, per le quali il preciso meccanismo complessivo a supporto della salute dell'ospite non è sempre conosciuto.

Risulta evidente che elaborare descrizioni universalmente accettate non risponde solo a un'esigenza formale ma pone anche le basi per delineare come regolamentare, misurare, quantificare e caratterizzare una specifica categoria di integratori nutrizionali. Assimilare una "*preparazione di cellule e/o loro componenti*" (da definizione ISAPP; 5) può rendere complessa la fase di regolamentazione e di verifica della qualità e funzionalità di una determinata categoria di un integratore alimentare, poiché si dovrebbe far riferimento a tecniche diverse, in

quanto cellule intere e componenti vengono quantificati e caratterizzati con tecniche diverse e loro effetto necessita di essere misurato in maniera differente.

Come qualificare e quantificare i microrganismi inattivati

La definizione ufficiale di probiotico (8) che ha lievemente modificato grammaticalmente la definizione elaborata inizialmente dalla Food and Agricultural Organization of the United Nations e la World Health Organization nel 2002 (9) essendo basata sul concetto di microrganismi vivi, veicola implicitamente la modalità della loro "misurazione" e rende la vitalità un attributo fondamentale unito alla necessità di conferire un beneficio per la salute dell'ospite. Difatti, i prodotti a base di microrganismi probiotici vengono rilasciati sulla base di una conta vitale che deve essere riportata in etichetta e garantita fino alla fine della *shelf-life* del prodotto. La zona grigia lasciata all'interno della definizione ufficiale di probiotico dalla locuzione "*quando somministrati in quantità adeguata*", nel panorama italiano ha visto l'intervento del Ministero della Salute (10) con il suggerimento di somministrazione di una quantità pari ad almeno 10^9 cellule vive al giorno per almeno uno dei ceppi presenti nella miscela probiotica, a meno che l'utilizzo di un dosaggio inferiore non sia supportato da studi scientifici per lo specifico ceppo. Le linee guida del Ministero della Salute del 2018 (10) si basavano sulle evidenze scientifiche disponibili in merito alla quantità minima sufficiente per ottenere una temporanea colonizzazione dell'intestino. In merito alla definizione e qualificazione di un prodotto contenente microrganismi inattivati, si apre la duplice questione di stabilire sia quale possa essere il numero massimo di cellule vive residue accettabili nel prodotto finito, sia il numero minimo di cellule totali che devono essere presenti affinché si possa garantire un effetto benefico per la salute dell'ospite. Da una parte la verifica della perdita di vitalità è qualcosa che può essere misurato ma non è di per sé garanzia dell'efficacia di un microrganismo inattivato. Nel caso di un probiotico non vivo, per il quale si deve quindi escludere un processo di colonizzazione da parte

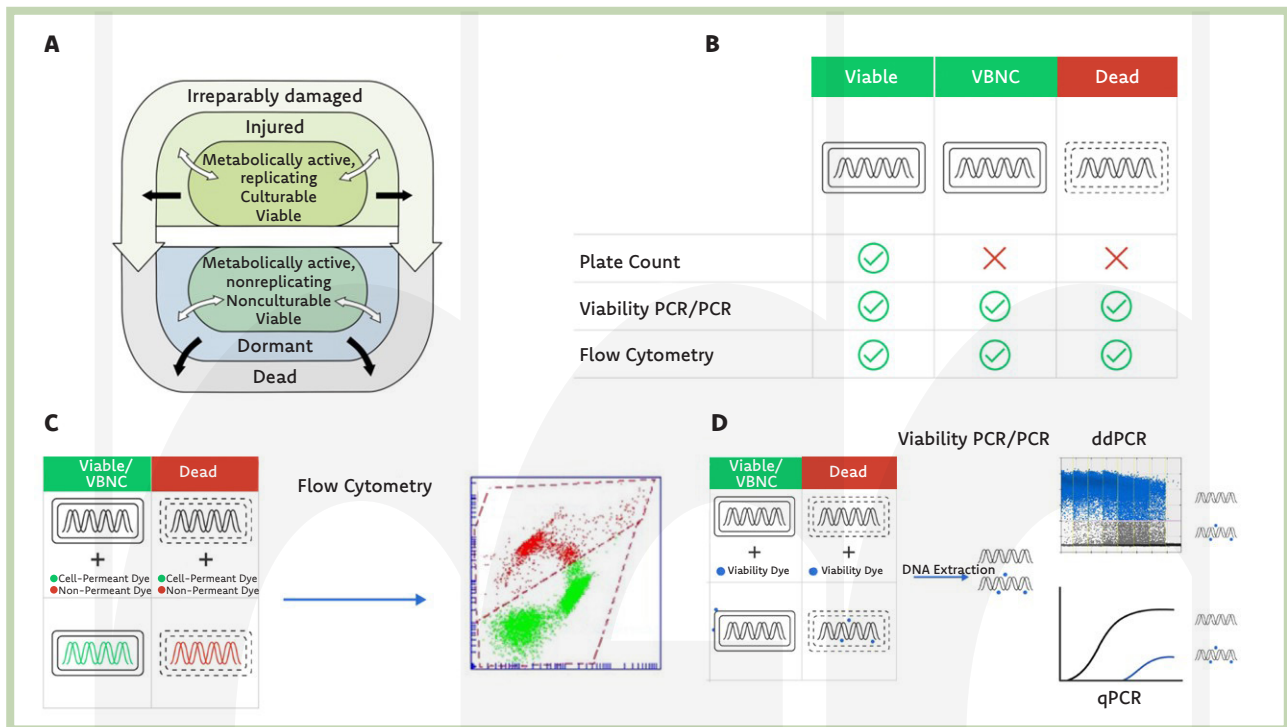


Figura 2 • Mappa concettuale degli stati metabolici dei microrganismi probiotici e possibili transizioni (A) e metodi per l'enumerazione di cellule vive e morte (B,C,D). (A, Da: 14; B, Da: 12.)

del ceppo, la definizione di un numero minimo adeguato di cellule totali è un aspetto meno immediato da stabilire e dovrà essere, pertanto, più direttamente correlato all'evidenza di un effetto benefico sulla salute dell'ospite, osservato per uno specifico dosaggio e/o legato a una evidenza di funzionalità comparabile con il corrispettivo ceppo vitale (Figura 2). La tradizionale tecnica di conta delle unità formanti colonia (UFC) a seguito di diluizione e semina su terreno di coltura agarizzato in piastra può essere utilizzata come controllo dell'efficacia del trattamento di inattivazione in termini di assenza di crescita e quantificazione del numero di UFC residue (Figura 2B). Come anticipato, non è stata ancora fissata una soglia massima di cellule vive per prodotti derivanti da probiotici tradizionali, per cui la strategia temporanea, in alcuni casi, è quella di far riferimento ad alcuni mercati pionieri nel campo dei probiotici, come quello giapponese, in cui diversi prodotti a base di cellule inattivate riportano in etichetta una quantità di cellule vitali residua inferiore a 10^3 UFC/g. Diverso è il caso di alcuni Novel Foods (di cui si parlerà successivamente) come quello di *Akkermansia muciniphila*, per cui l'EFSA ha fissato un valore massimo di cellule vitali inferiore a 10 UFC/g (11).

Tuttavia, la conta in piastra costituisce soprattutto un aspetto di controllo qualità su un prodotto a base di microrganismi inattivati, che risulta circoscritto al concetto di replicabilità e che non può esplorare altri stati metabolici e fisiologici delle cellule (Figura 2A).

I microrganismi inattivati necessitano di tecniche di enumerazione non legate alla coltivabilità e una review recente (12) elenca e descrive i metodi analitici di enumerazione disponibili per probiotici e postbiotici (Figura 2 B,C,D). Uno dei metodi utilizzati, spesso anche per il rilascio del prodotto, è basato sull'utilizzo di una camera di conta, che presenta tuttavia il limite di non poter discriminare, per i batteri, tra cellule vive e cellule morte. La citometria a flusso (Figura 2C) è emersa come uno strumento avanzato nella valutazione della vitalità dei probiotici, in grado di estrarre informazioni dettagliate sulle singole cellule, comprese le loro dimensioni, granularità e morfologia attraverso l'analisi della diffusione della luce laser. La norma ISO 19344 IDF 232 (13) riporta il metodo di enumerazione dei batteri lattici, utilizzando tre diversi protocolli di colorazione per valutare l'attività enzimatica cellulare (basata sull'enzima esterasi), l'integrità della membrana e il potenziale della membrana,

fornendo quindi un insieme di informazioni sulla vitalità batterica. Nello studio dell'integrità di membrana, uno dei coloranti utilizzati è in grado di penetrare tutte le cellule batteriche, indipendentemente dalla loro vitalità, restituendo quindi un dato di unità fluorescenti totali (Total Fluorescent Units, TFU) che include batteri vivi, danneggiati e morti. Un altro colorante invece riesce a penetrare solo le cellule batteriche con membrana compromessa e questo consente di ricavare, per sottrazione, il dato di unità fluorescenti attive (Active Fluorescent Units, AFU) che rappresentano le cellule vitali, con membrane integra. La differenza tra TFU e AFU, che vengono definite non-AFU (n-AFU), rappresenta la popolazione di cellule morte o irrimediabilmente danneggiate. A parte la norma ISO 19344 IDF 232 (13), sono stati sviluppati altri protocolli i cui coloranti hanno diversi tipi di target, per fare solo qualche esempio le proteine intracellulari di cellule integre o le specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) (12). Pertanto, la citofluorimetria, nell'ambito dei microrganismi inattivati, a parte fornire un dato di conta totale (TFUs), consente anche di fare valutazioni più dettagliate e specifiche sullo stato fisiologico, metabolico e di integrità delle cellule, il che può essere rilevante per esempio nel valutare e confrontare gli effetti, i tipi ed entità di danno esercitati su diversi ceppi da differenti trattamenti di inattivazione. Altri metodi di enumerazione vengono dalla biologia molecolare, come la tecnica denominata quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) e la droplet digital-PCR (dd-PCR) (Figura 2D), le quali richiedono anzitutto che vengano sviluppate delle sonde nucleotidiche ceppo-specifiche (o almeno specie-specifiche, a seconda del tipo di prodotto), che vadano quindi ad amplificare in maniera specifica il DNA del ceppo di interesse. In questo panorama, la viability quantitative-PCR (vqPCR) consente di amplificare in maniera specifica il DNA presente nelle cellule integre sfruttando un colorante, come per esempio il propidio monoazide (PMA) che penetra solo le cellule morte e con membrana danneggiata, andando a intercalarsi nel DNA, impedendone così l'amplificazione (12). Questa tecnologia potrebbe risultare utile per alcuni prodotti a base di microrganismi inattivati, sebbene l'utilità maggiore sia quella di

ottenere una conta vitale non dipendente dalla coltivabilità che comprenda anche quella che viene definita come popolazione di cellule vive ma non replicabili (Viable But Not Cultivable Cells, VBNCs; 14 e Figura 4A) analogamente a quello che può essere fatto in citometria a flusso. Quest'ultima sarà probabilmente la tecnologia sulla quale si lavorerà maggiormente per sviluppare metodi di conta ufficiali per i prodotti a base di microrganismi inattivati che possano diventare di routine e allineabili tra diversi laboratori.

Come agiscono i microrganismi inattivati

Tra i vantaggi promossi nell'utilizzo di microrganismi inattivati vi è quello di una potenziale migliore stabilità del prodotto, sia in termini di tempi e temperature di conservazione, la possibilità di ridurre l'overage da applicare per ottenere la concentrazione desiderata fino alla fine della shelf-life (15) e il ridotto rischio per la salute in categorie di consumatori fragili (anziani, bambini, soggetti immunocompromessi, con alterata permeabilità intestinale) (Figura 3A).

Tuttavia, la versione inattivata di un microrganismo non si esaurisce nell'ottenere meramente un ceppo più versatile in termini di conservazione e/o di utilizzo finale. L'inattivazione non ha solo scopo di "togliere" qualcosa al ceppo probiotico (privarlo della vitalità) per renderlo più adattabile, ma anche quello di ottenere qualcosa di nuovo e di diverso. Non tutte le funzionalità probiotiche sono dipendenti dalla vitalità e diverse proprietà vengono mantenute o possono risultare maggiormente pronunciate a seguito del processo di inattivazione. Si fa riferimento soprattutto a quelle capacità di *cross-talk* o interazione tra microrganismi e cellule dell'ospite (epiteliali, endoteliali, immunitarie, entero-endocrine) che dipendono dalla presenza e dal riconoscimento di specifiche molecole microbiche (Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPs) le quali, interagendo con determinati recettori delle cellule dell'ospite (es. TLRs), attivano una cascata del segnale che porta all'attivazione di risposte a livello sia locale che sistemico, che possono coinvolgere il sistema immunitario, l'integrità intestinale, le risposte

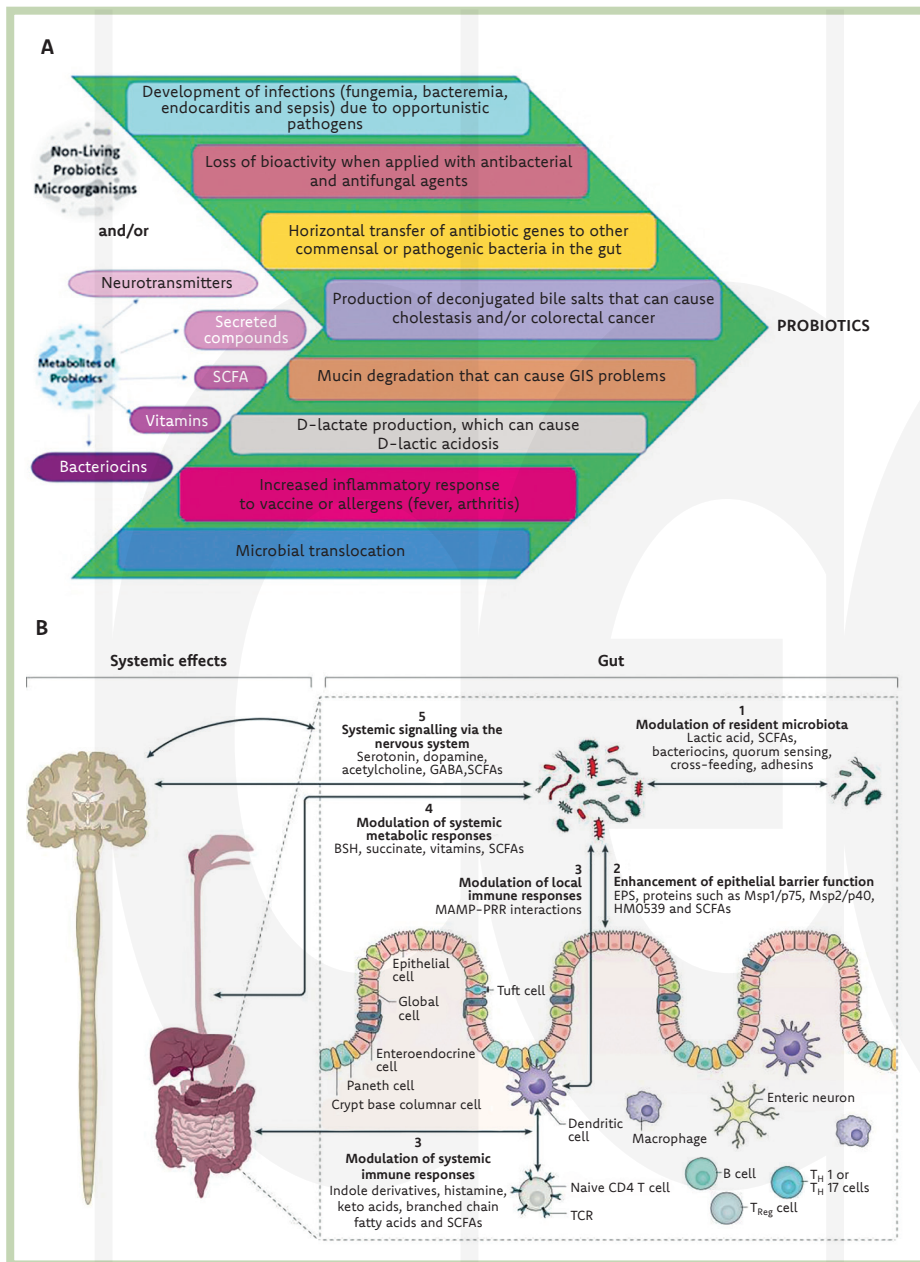


Figura 3 • Potenziali vantaggi dei microrganismi inattivati (A) e meccanismi di azione e di interazione con l'ospite (B).

(A, Da: Yeşilyurt N, Yılmaz B, Ağagündüz D et al. Involvement of Probiotics and Postbiotics in the Immune System Modulation. *Biologics*. 2021;1(2):89-110. B, Da: 5.)

neuroendocrine ecc. (5) (Figura 3B). Quello che si ottiene a seguito di un trattamento di inattivazione dipende dal trattamento stesso, dalle sue condizioni (es. diverse combinazioni di tempi e temperature, facendo il caso del trattamento termico) e dal ceppo microbico specifico. Non è pertanto semplice prevedere come possano essere eventualmente modificate le funzionalità probiotiche di un ceppo inattivato rispetto al suo corrispettivo vitale. A tal proposito la letteratura riporta casi molto diversi, in cui

si assiste in alcuni casi a una sostanziale equivalenza tra il ceppo vitale e quello inattivato, in altri a una riduzione o diversa funzionalità a seguito di inattivazione, in altri ancora a una aumentata funzionalità del ceppo inattivato rispetto alla forma vitale. La situazione è ovviamente molto più complessa di così e dipende da quanto e come il trattamento ha impattato sulle diverse componenti (in particolar modo presenti sulla superficie) della cellula microbica e da quale/i di queste dipenda maggiormente la funzionalità probiotica. Ceppi diversi afferenti alla stessa specie possono reagire in maniera diversa a un determinato trattamento di inattivazione, che può influire diversamente sulla struttura e integrità cellulare, sui diversi tipi di proteine, polisaccaridi, lipidi e da come tutti questi composti vengono esposti e quindi riconosciuti dalle cellule dell'ospite, così come processi diversi possono avere un effetto finale

distinto sulle proprietà di un determinato ceppo. Da ciò ne deriva che un ceppo probiotico, dopo essere stato inattivato, potrebbe avere caratteristiche diverse rispetto al progenitore e che necessitano pertanto di essere investigate. Questo solleva la questione della difficoltà di riuscire a identificare un metodo univoco di "misurazione" della funzionalità di un postbiotico o paraprobiotico, che andrà verosimilmente studiata caso per caso, alla stregua di quando si caratterizza un ceppo ex novo.

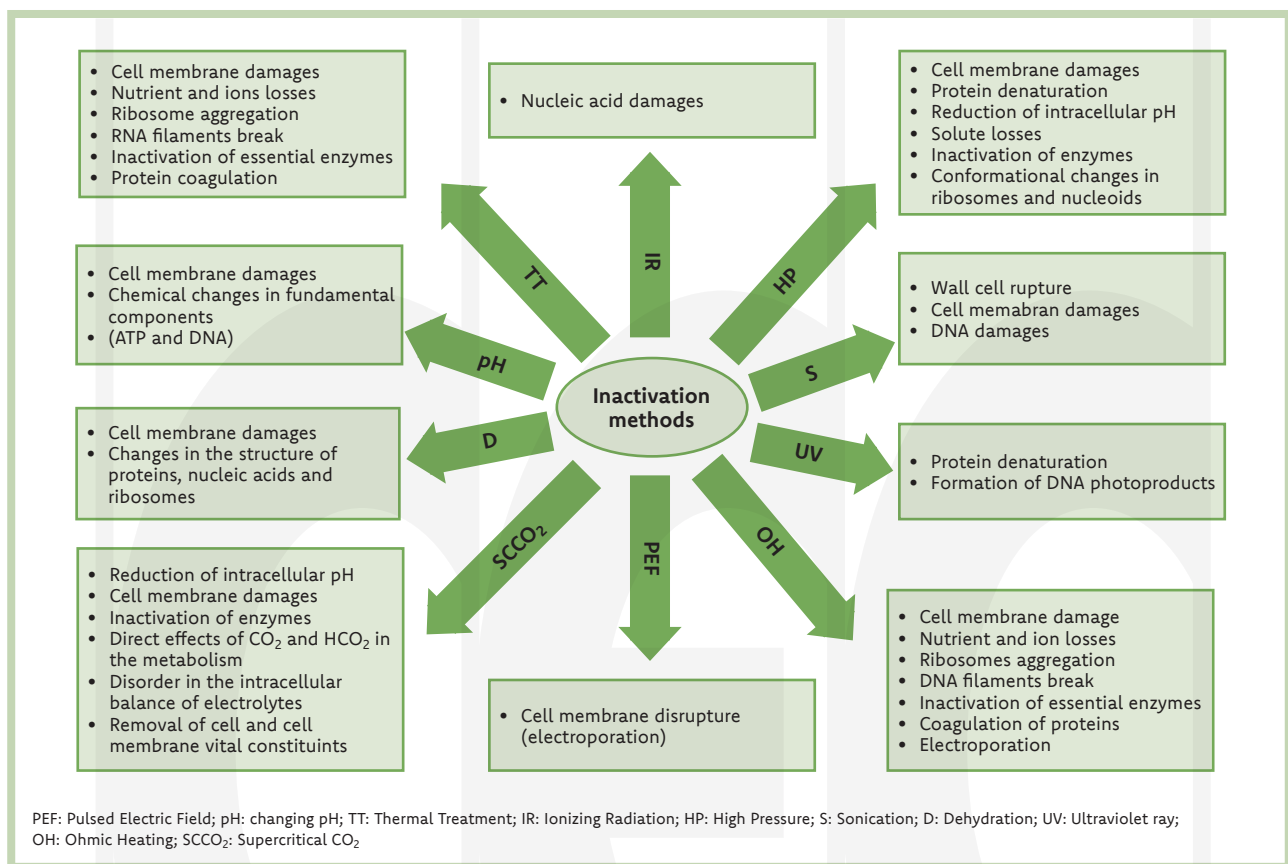


Figura 4 • Metodi di inattivazione dei microrganismi e meccanismi coinvolti. (Da: 19.)

Come sono attualmente prodotti e regolamentati i microrganismi inattivati

A livello regolatorio in Europa i microrganismi inattivati seguono attualmente le stesse regole dei probiotici per quanto riguarda gli *health claims* (16) e i Novel Foods (17), qualora rientrino in quest'ultima categoria. Il criterio presunzione qualificata di sicurezza (QPS) si applica quando microrganismi probiotici sono utilizzati come progenitori per ottenere microrganismi inattivati. I microrganismi non presenti nell'elenco QPS rientrano quindi in una richiesta di nuovi prodotti alimentari e sono vincolati all'approvazione da parte dell'EFSA prima di poter essere utilizzati per lo sviluppo di alimenti o mangimi in Europa. Non è stato stabilito se nella definizione che verrà elaborata per i microrganismi inattivati si vorrà specificare se il progenitore debba essere necessariamente un probiotico inteso in senso tradizionale, ma ci sono alcuni precedenti che aprono a tante possibilità.

A tal proposito, la valutazione della sicurezza dei batteri inattivati come Novel Foods è ora disponibile per tre diverse preparazioni, ovvero *Bacteroides xylanisolvans*, *Akkermansia muciniphila* e *Mycobacterium manresensis*, le quali non sono state invece accettate per lo status QPS nella forma di microrganismi vivi. Nell'Unione Europea attualmente non esiste nessuna normativa specifica per i microrganismi inattivati; tuttavia, visto che nel *consensus statement* (5) viene richiesto un beneficio dimostrato per la salute, l'interpretazione espressa da una pubblicazione da Vinderola et al. (18) è che l'eventuale uso del termine *postbiotic* (o comunque quello che verrà selezionato) in un alimento o un integratore alimentare richiederà prima l'approvazione delle indicazioni per la salute (*health claims*) da parte dell'EFSA e di approvazione come Novel Food (18). Ma la situazione è più complessa di così, poiché anche microrganismi inattivati derivanti da progenitore QPS possono ricadere nell'iter dei Novel Food, in particolare a seconda del trattamento di inattivazione applicato per ottenere la versione non

vitale e l'entità dell'impatto del processo di inattivazione. Diverse tecnologie possono essere applicate per ottenere l'inattivazione dei microrganismi, con diversi costi, diverso impatto sulla struttura cellulare e sulle molecole e quindi con diverso esito sulla funzionalità complessiva del ceppo. L'inattivazione per trattamento termico è attualmente il processo più diffuso, sebbene ci siano tecnologie più recenti, alcune delle quali possono modificare in misura minore l'integrità cellulare e componenti. Tra queste vi è l'utilizzo di radiazioni (UV e ionizzanti), alte pressioni, sonicazione, riscaldamento ohmico, CO₂ supercritica ecc. (19) (Figura 4).

Il fatto che alcune tecnologie di inattivazione non-termica abbiano origine o applicazione sugli alimenti recente può comportare che i microrganismi ottenuti attraverso tali processi ricadano nella categoria dei Novel Foods. Riportando quanto previsto dal Regolamento 2015/2283, rientrano nella categoria dei Novel Foods anche

alimenti e ingredienti alimentari ai quali è stato applicato un processo di produzione non in uso nella Comunità Europea prima del 15 maggio 1997 per prodotti alimentari, laddove tale processo dia luogo a cambiamenti significativi nella composizione o nella struttura degli alimenti o degli ingredienti alimentari che ne influenzano il valore nutrizionale, il metabolismo o il livello di sostanze indesiderabili (17).

Secondo quanto riportato da un documento redatto dalla Commissione Europea (20) la mancanza di una posizione comune in merito alla classificazione delle nuove tecnologie in tutti gli Stati membri può ostacolare la loro diffusione in Europa. Per esempio, l'utilizzo delle alte pressioni (High Pressure Processing, HPP) non cade più sotto la classificazione Novel Foods ma, come riscontrato da molti operatori del settore, molte opportunità sono andate perse nel tempo a causa della confusione relativa al regolamento sui nuovi alimenti. La situazione a riguardo negli Stati Uniti, coordinata dalla Food and Drugs Administration (FDA), è molto diversa

e vede un aumento dell'uso di tecnologie innovative a differenza dell'Europa (20). Un altro esempio potrebbe essere quello delle radiazioni gamma. Il documento redatto dalla Commissione Europea nell'ambito del quadro normativo sull'uso delle radiazioni nei prodotti alimentari (21) riporta che:

sebbene negli ultimi anni siano stati compiuti notevoli progressi tecnologici nel campo delle radiazioni ionizzanti (per esempio lo sviluppo del fascio di elettroni a bassa energia), è improbabile, ma non può essere escluso a priori, che i prodotti alimentari derivanti da tale tecnologia possano essere considerati nuovi prodotti alimentari poiché i cambiamenti nella composizione o nella struttura degli alimenti indotti da tali tecniche di irradiazione sono minori. Tuttavia, spetta agli operatori del settore verificare se il prodotto che intendono immettere sul mercato dell'Unione rientra o meno nell'ambito di applicazione del regolamento sui nuovi alimenti ed è necessaria un'analisi caso per caso secondo la procedura descritta nel regolamento di esecuzione della Commissione (UE) 2018/456 (21).

Pertanto, la cosa più probabile è che dovrà essere valutata caso per caso se un determinato ceppo inattivato con uno specifico trattamento non-termico possa ricadere nella categoria dei Novel Foods.

Come possono essere inquadrate i microrganismi inattivati in prodotti farmaceutici in Europa

Secondo l'Allegato 1 della Direttiva 2001/83/CE (22) (corretta poi dalla 2004/27/CE; 23) "un medicinale biologico è un prodotto, il cui principio attivo è una sostanza biologica. Una sostanza biologica è una sostanza prodotta o estratta da una fonte biologica che necessita, per la caratterizzazione e determinazione della sua qualità, di una combinazione di test fisico-chimici-biologici, insieme al processo produttivo e al suo controllo."

Pertanto, secondo quanto riportato in una recente pubblicazione (24) quelli che sono definiti *postbiotics* possono quindi essere considerate sostanze attive per medicinali biologici.

Il suggerimento è che gli sviluppatori di medicinali a base di postbiotici possano fare riferimento alle linee guida dedicate ai *biological medicinal products*, non essendoci attualmente per i postbiotici delle linee guida dedicate. La cosa più probabile è che il quadro normativo evolverà via via che verranno sviluppati nuovi prodotti. Tuttavia, una sfida importante in questo scenario è che a differenza dei probiotici sviluppati come medicinali, conosciuti come Live Biotherapeutics (LBP) (25), dove non è presente in diversi casi alcun rischio di assorbimento sistemico e di traslocazione, nel caso di postbiotici, a seconda dei processi di produzione utilizzati e del contenuto del preparato (circostanze in cui contenga anche metaboliti, componenti della parete cellulare, DNA batterico ecc.) allora la questione dell'assorbimento deve essere valutata con attenzione.

Un altro scenario è quello regolato dalla normativa comunitaria (Regolamento UE, 2017/745; 26) riguardante i dispositivi medici, ovvero “prodotti che prevencono, curano o alleviano le malattie mediante meccanismi non farmacologici, immunologici o metabolici”. Un aggiornamento del 2021 ha previsto che i dispositivi medici non possano contenere microrganismi vivi, per cui l'impiego di microrganismi inattivati nei dispositivi medici in Europa potrebbe essere un campo promettente, a fronte della dimostrazione di meccanismi di azione di natura fisica che sottendono alla funzionalità del prodotto a base di microrganismi inattivati (27).

Diversi tipi formulazioni e trend di mercato

La richiesta dello sviluppo di prodotti a base di microrganismi inattivati è in forte aumento nel mercato degli integratori nutrizionali, quasi mossa da un appeal intrinseco di questo tipo di formulazione, oltre che da questioni di versatilità del prodotto finale. Inoltre, sono già presenti sul mercato e vengono sempre più richiesti prodotti “ibridi”, contenenti sia ceppi vivi che inattivati, con

eventuale aggiunta di prebiotici. Aldilà dei trend di mercato, così come si dovrebbe applicare anche a prodotti probiotici multiceppo o ai sinbiotici, anche nelle formulazioni di questa tipologia di prodotti “misti” tra cellule vive e inattivate è importante valutare il razionale scientifico (sinergismo, modulazione della funzionalità) e l'opportunità della scelta di determinate combinazioni, che siano di reale valore per la salute del consumatore.

Conclusioni

Il mondo dei microrganismi inattivati prospetta al contempo sfide e opportunità, sia per quanto riguarda il processo produttivo (sviluppo e uso di tecnologie innovative), i metodi di quantificazione (non solo come strumento di controllo qualità ma anche di caratterizzazione) e studio delle proprietà benefiche.

Tutto ciò permetterà di aumentare le nostre conoscenze in generale sui probiotici (tradizionali e di ultima generazione), sui meccanismi di azione, di allargare il loro utilizzo a nuove specie e ceppi, di espandere il loro utilizzo in animali (da compagnia e da reddito) e in diverse categorie di consumatori (sani e con patologie) per applicazioni specifiche.

Mentre la macchina dei *postbiotics* continua la sua marcia, l'IPA parallelamente profonde sforzi in un lavoro congiunto tra l'ambiente scientifico e industriale per razionalizzare, in primo luogo, le applicazioni delle diverse categorie identificabili nel campo dei microrganismi inattivati, di loro composti e metaboliti. Le definizioni arriveranno probabilmente di conseguenza.

Bibliografia

1. Abouelela ME, Helmy YA. Next-Generation probiotics as novel therapeutics for improving human health: current trends and future perspectives. *Microorganisms*. 2024;12(3):430.
2. Martín R, Langella P. Emerging health concepts in the probiotics field: streamlining the definitions. *Front Microbiol*. 2019;10:1047.
3. Tsilingiri K, Rescigno M. Postbiotics: what else? *Benef Microbes*. 2013;4(1):101-107.
4. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr*. 2011;6(3):261-274.

5. Salminen S, Collado MC, Endo A et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(9):649-667.
6. Aguilar-Toalá JE, Arioli S, Behare P et al. Postbiotics - when simplification fails to clarify. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(11):825-826.
7. Salminen S, Collado MC, Endo A et al. Reply to: Postbiotics - when simplification fails to clarify. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(11):827-828.
8. 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(8):506-514.
9. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations [online], <ftp://ftp.fao.org/esn/food/wgreport2.pdf>. 2002.
10. Ministero-Della-Salute-Italy. Guideline probiotics and prebiotics. https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_ulterioriallegati_ulterioreallegato_0_alleg.pdf. 2018.
11. Turck D, Bohn T, Castenmiller J et al. Safety of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J.* 2021;19(9):e06780.
12. Boyte ME, Benkowski A, Pane M, Shehata HR. Probiotic and postbiotic analytical methods: a perspective of available enumeration techniques. *Front Microbiol.* 2023;14:1304621.
13. ISO. 2015. ISO 19344:2015 | idf 232:2015: Milk and milk products -- starter cultures, probiotics and fermented products -- quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry. Geneva: International Organization for Standardization.
14. Davis C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods.* 2014;103:9-17.
15. Fenster K, Freeburg B, Hollard C et al. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms.* 2019;7(3):83.
16. EFSA. EFSA Guidance on the scientific requirements for health claims related to the immune system, the gastrointestinal tract and defence against pathogenic microorganisms. *EFSA J.* 2016;14(1):4369.
17. EFSA. Guidance on the preparation and submission of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283 (Revision 1). *EFSA J.* 2021;19(3):6555.
18. Vinderola G, Sanders ME, Salminen S, Szajewska H. Postbiotics: The concept and their use in healthy populations. *Front Nutr.* 2022;9:1002213.
19. de Almada C, Almada C, Martinez C et al. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci.* 2016;58:96-114.
20. Probst L, Frideres L, Pedersen B. Business innovation observatory sustainable, safe and nutritious food new nutrient sources. *Business, Environ Sci, Agric Food Sci.* 2015.
21. Commission Staff Working Document Evaluation of the EU legal framework on food irradiation (Directives 1999/2/EC and 1999/3/EC) SWD/2021/0225 final, available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52021SC0225>.
22. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal L 311, 28/11/2001 P. 0067-0128.*
23. Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal L 136, 30/04/2004 P. 0034 - 0057*
24. Vinderola G, Druart C, Gosálbez L et al. Postbiotics in the medical field under the perspective of the ISAPP definition: scientific, regulatory, and marketing considerations. *Front Pharmacol.* 2023;14:1239745.
25. Cordaillat-Simmons M, Rouanet A, Pot B. Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework. *Exp Mol Med.* 2020;52(9):1397-1406.
26. Regulation (EU) 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on medical devices, amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and repealing Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EEC, available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32017R0745>.
27. Andresen V, Gschossmann J, Layer P. Heat-inactivated *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (SYN-HI-001) in the treatment of irritable bowel syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(7):658-666.