

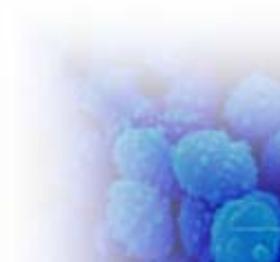


"PROBIOTICI: UNA VISIONE MOLECOLARE"

Maria Luisa Callegari



Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore





Food and Agriculture Organization
of the United Nations



World Health Organization

Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria

Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of
Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including
Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria

Córdoba, Argentina

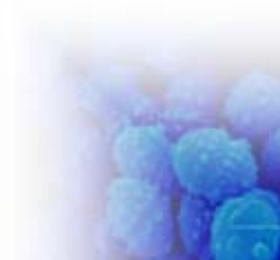
1-4 October 2001

www.fao.org

www.who.int

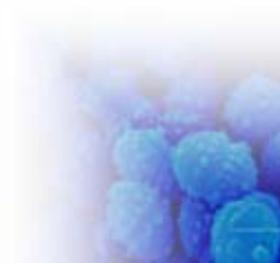


Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore



Si raccomanda che.....

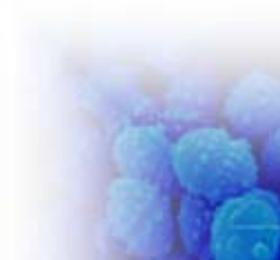
- I ceppi considerati potenziali probiotici siano identificati con tecniche di biologia molecolare riconosciute
- I nomi scientifici assegnati siano in accordo con l'International Code of Nomenclature.
- I ceppi siano depositati in una collezione internazionale.





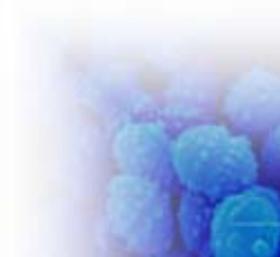
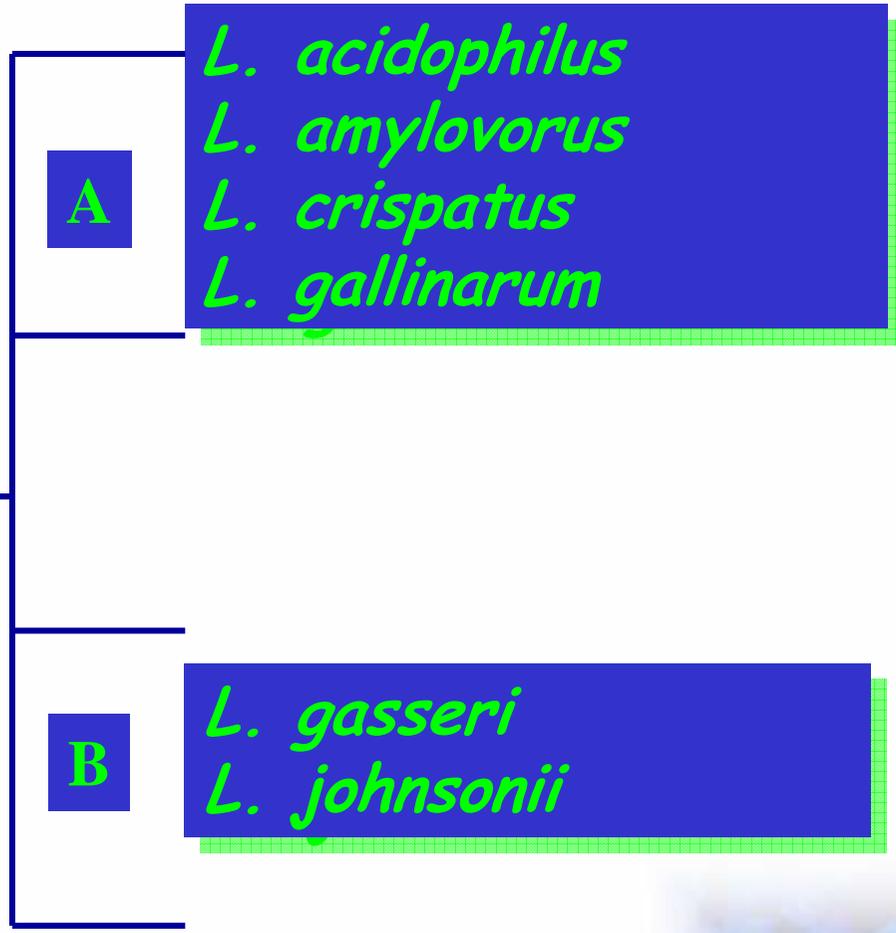
Biologia molecolare...

... è la sola via da seguire per l'identificazione della specie di ceppi probiotici; la caratterizzazione fenotipica non è sufficiente. Si consideri l'esempio delle specie di lattobacilli appartenenti al gruppo "*acidophilus*".





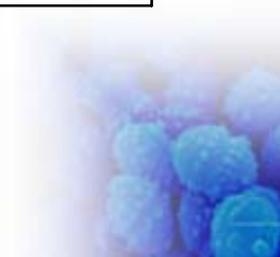
L. acidophilus





Specie di *Lactobacillus* isolate in piastra e identificate mediante test genetici.

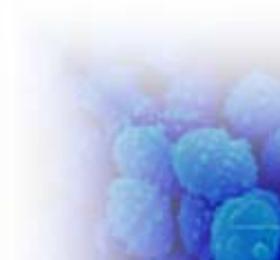
References	Species
Morelli <i>et al.</i> , 1998	<i>L. paracasei</i> , "acidophilus" group B of Johnson (<i>L. gasseri</i> and <i>L. johnsonii</i>)
Dunne <i>et al.</i> , 1999	<i>L. salivarius</i> , <i>L. paracasei</i>
Tannock <i>et al.</i> , 2000	<i>L. casei</i> group of species, <i>L. plantarum</i>
Song <i>et al.</i> , 1999 and 2000	<i>L. gasseri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. crispatus</i>



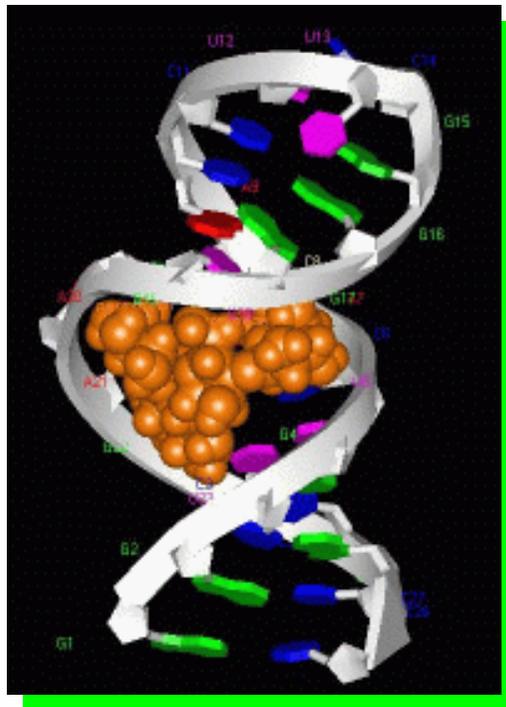


La biologia molecolare come strumento per....

- ✓ l'identificazione tassonomica delle specie batteriche
- la caratterizzazione e il typing dei ceppi potenzialmente probiotici
- la caratterizzazione della microflora intestinale "totale" senza ricorrere alla coltivazione dei batteri in piastra.



Il gene del 16S rRNA è alla base delle tecniche utilizzate per l'identificazione

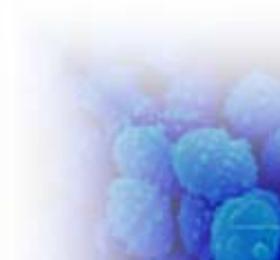


PCR specie-specifiche

ARDRA (AMPLIFIED RIBOSOMAL DNA RESTRICTION ANALYSIS)



Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore



Come ottenere una corretta identificazione

ARDRA è stata messa a punto per identificare diverse specie of *Lactobacillus* isolate da feci e da vagina. Il gene del 16S rRNA amplificato mediante PCR è digerito con enzimi di restrizione. Quattro enzimi di restrizione consentono di identificare 14 specie di *Lactobacillus*.

Ventura, M., Casas, I. A., Morelli, L., Callegari, M.L. (2000). Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. *Applied and Systematic Microbiology*, 23, 504-509.

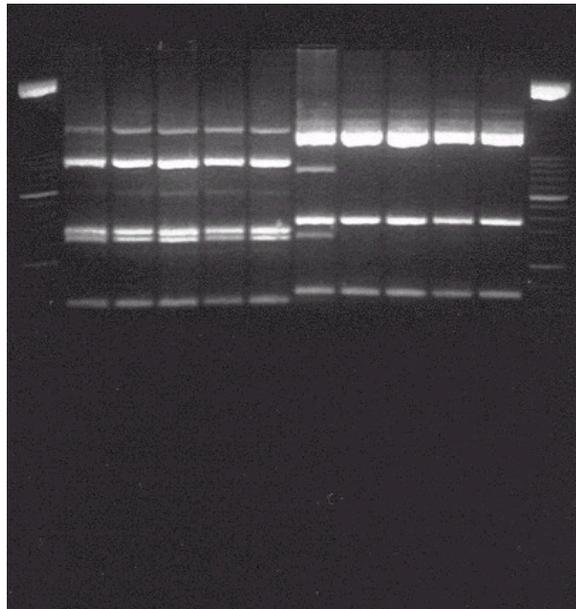


Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore

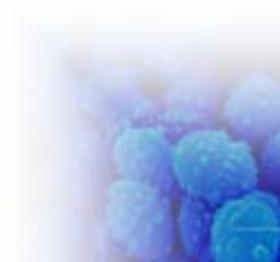


Ceppi di *L. rhamnosus* identificati mediante ARDRA

Sau 3A Hinf I
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



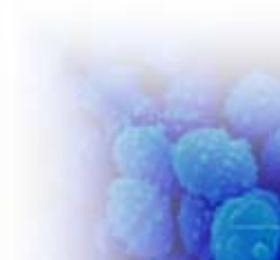
Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore

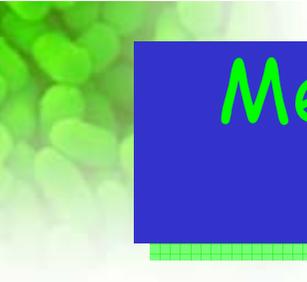




La biologia molecolare come strumento per....

- l'identificazione tassonomica delle specie batteriche
- la caratterizzazione e il typing dei ceppi potenzialmente probiotici
- la caratterizzazione della microflora intestinale "totale" senza ricorrere alla coltivazione dei batteri in piastra.



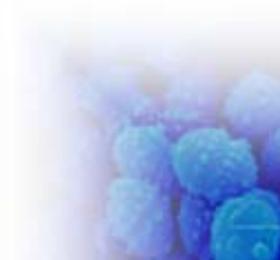


Metodi per il monitoraggio dei probiotici *in vivo*

Necessari per seguire in vivo il comportamento del probiotico ingerito (permanenza, adesione ecc)

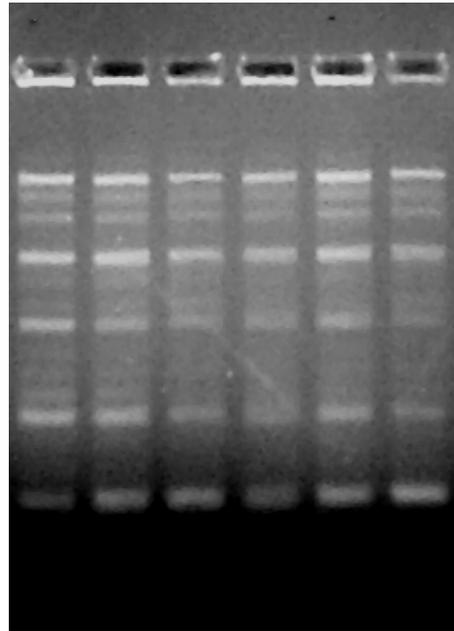
Si possono utilizzare tecniche come:

- PCR ceppo-specifica
- PCR basate sull' uso di oligonucleotidi capaci di produrre profili di bande (RAPD;REP ecc)

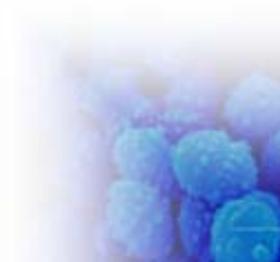


RAPD-PCR

Ctrl 1 2 3 4 5

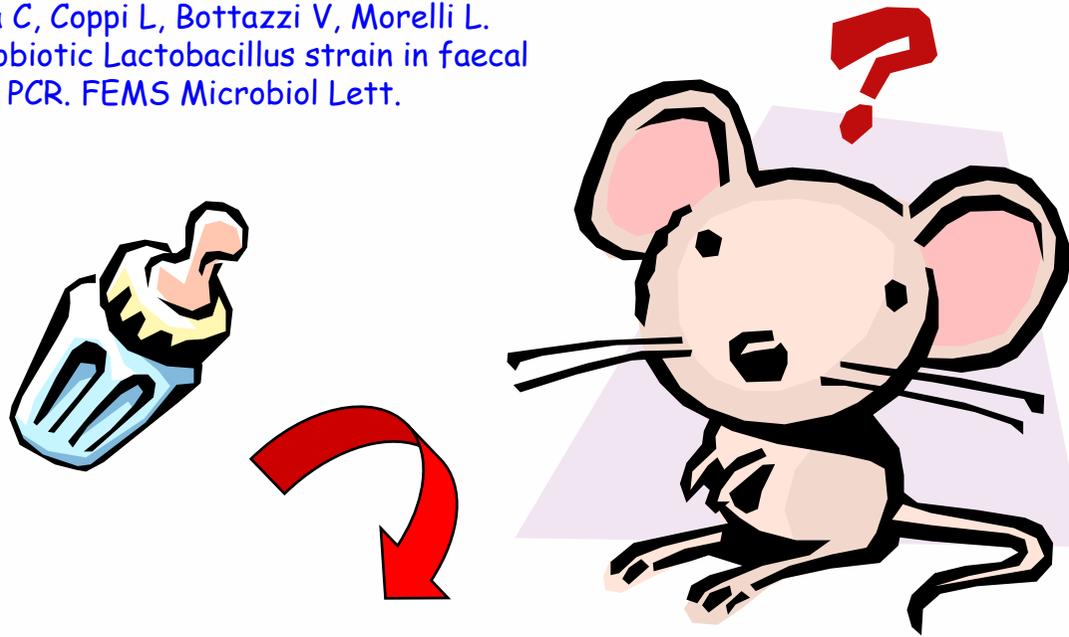


Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore



Un esempio del monitoraggio di un probiotico mediante PCR ceppo-specifica

Lucchini F, Kmet V, Cesena C, Coppi L, Bottazzi V, Morelli L.
Specific detection of a probiotic *Lactobacillus* strain in faecal
samples by using multiplex PCR. FEMS Microbiol Lett.
1998;158:273-278.



Il ceppo di L. gasseri 4B2 (6X10⁸ CFU) è stato somministrato ai topi risospeso in 100 µl di una soluzione al 20% di glucosio.

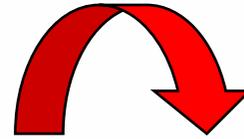


Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore

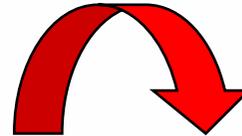




Le feci sono state seminate in Rogosa

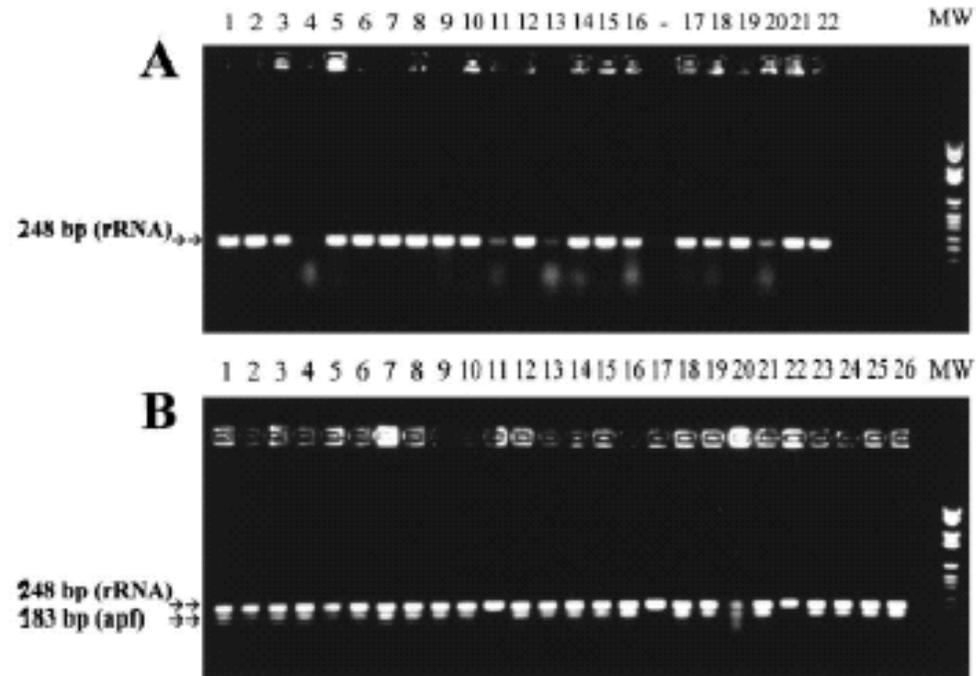


Dalle colonie isolate è stato estratto il DNA

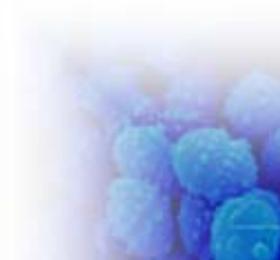


L'identificazione del 4B2 isolato da feci è stata eseguita mediante PCR. Per la reazione si è utilizzata una coppia di primer disegnati in base alla sequenza del gene dell'APF. Una seconda coppia di primer disegnati, invece, su una regione universale del gene del 16S rRNA è stata utilizzata come controllo per la reazione.





Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore





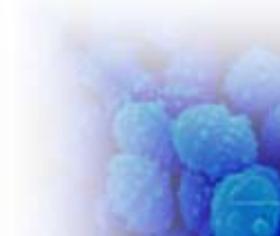
Un altro esempio di monitoring di un ceppo probiotico

Il ceppo di *Lactobacillus crispatus* M247 è particolarmente interessante da un punto di vista medico in quanto capace di contrastare la colite indotta in topi.

Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, Elli M, Brun P, Cavaggioni A, Tormen D, Sturniolo GC, Morelli L, Palu G. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;43:197-204.



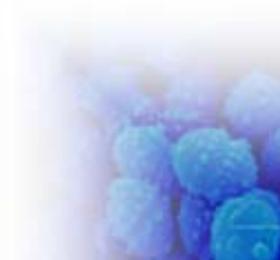
Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore

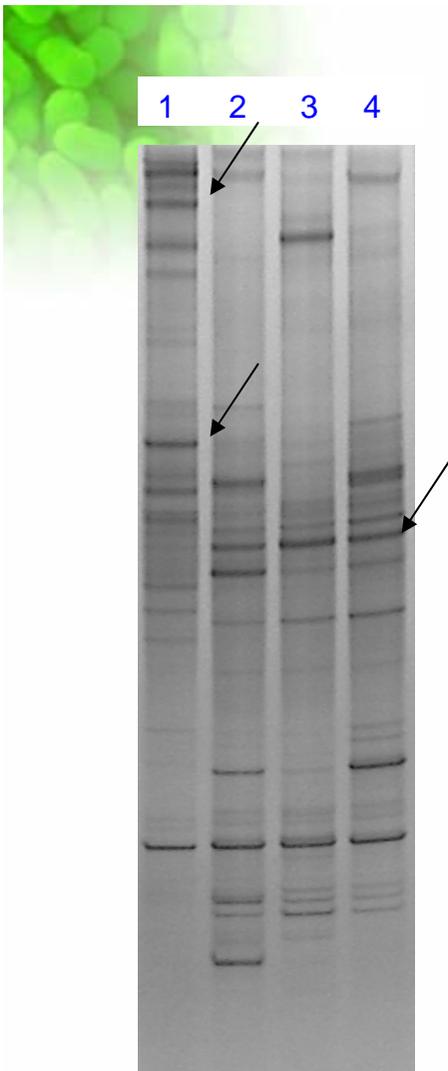




La biologia molecolare come strumento per....

- l'identificazione tassonomica delle specie batteriche
- la caratterizzazione e il typing dei ceppi potenzialmente probiotici
- la caratterizzazione della microflora intestinale "totale" senza ricorrere alla coltivazione dei batteri in piastra.



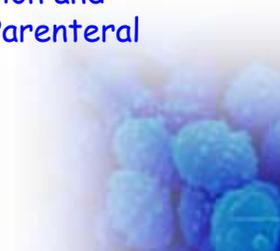


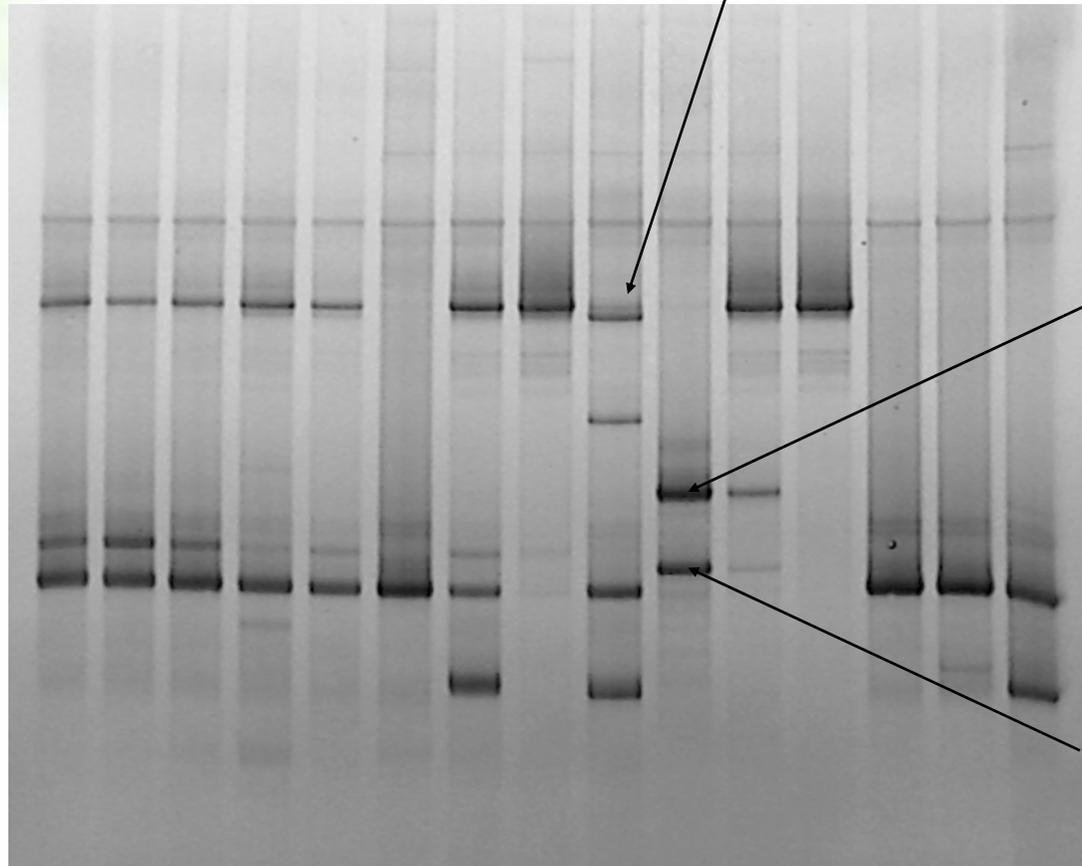
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

Permettono di confrontare nel tempo la microflora di un individuo.

Lane 1: T0, lane 2 : nutrizione esclusiva per 10 giorni; lane 3: nutrizione esclusiva per 10 settimane e lane 4 nutrizione parziale per 6 settimane.

LIONETTI P, CALLEGARI ML, FERRARI S, CAVICCHI MC, POZZI E, DE MARTINO M, MORELLI L. (2005). Enteral nutrition and microflora in pediatric Crohn's disease. *JPEN Journal Parenteral Enteral Nutrition*, 29(4 Suppl):S173-175;





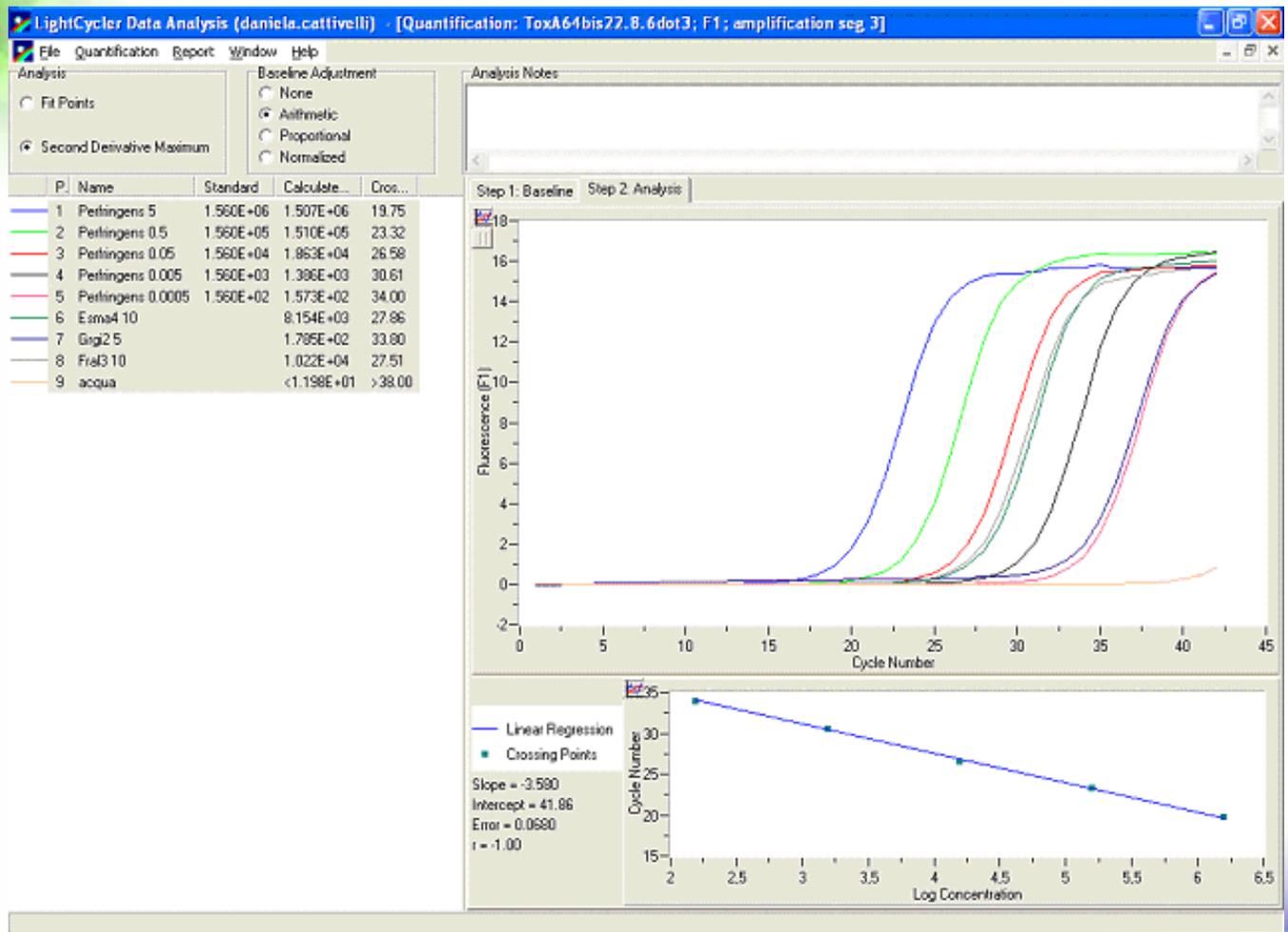
B. longum

B. dentium



Centro Ricerche Biotecologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore







*Grazie per
l'attenzione!*



Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore

