



FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECHNICHE  
BRESCIA

# ***LACTOSE AND GLUTEN-FREE: ALIMENTI DEL DOMANI?***

Maurizio Zavanella



**101**

EDITO A CURA DELLA  
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE  
E ZOOTECHNICHE - BRESCIA



*LACTOSE AND GLUTEN-FREE:*  
ALIMENTI DEL DOMANI?





FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE  
- BRESCIA -

Direttore scientifico: Prof. E. LODETTI

***LACTOSE AND GLUTEN-FREE:***  
**ALIMENTI DEL DOMANI?**

MAURIZIO ZAVANELLA

**Collaboratori:**

PAOLO AURELI  
LAURA ROSSI – SILVIO MORETTI  
GIOVANNI BANDI  
CLAUDIO MACCA  
LUGIA FAVALLI  
SIMONETTA SIGNORINI  
MARA LUCISANO – CAROLA CAPPA  
ANNA MARIA FERRINI  
BRUNELLA APPICCIAFUOCO  
ELISABETTA DELIBATO  
MARIA ROSA MASSARO  
MICHELE SONNESSA  
SILVANA BIANCHINI RANGOZZI

EDITO A CURA DELLA  
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE  
E ZOOTECNICHE - BRESCIA  
Via Istria, 3/b - 25125 Brescia  
[www.fondiz.it](http://www.fondiz.it)



In copertina:

“La lattaia” (The Milkmaid) di Jan Vermeer, pittore olandese di Delft (1632-1675).

Dipinto a olio su tela di cm 46,5 x 41, databile intorno al 1660, conservato nel Rijksmuseum, Amsterdam (Olanda) ([www.rijksmuseum.nl](http://www.rijksmuseum.nl)).

*Una domestica versa il latte, completamente presa dal suo lavoro. Al di fuori del latte che scende, tutto è immobile nella penombra della stanza. Veermer ha ristretto la sua tavolozza ai colori primari rosso, blu e giallo, eseguendo il disegno con grande cura, come dimostrano i numerosi ritocchi in corso d'opera. Difatti il triangolo formato dalla figura e dalla tavola (con il pane) viene bilanciato dal rettangolo della parete di fondo, per cui la testa della donna assume contorni monumentali e un senso di dignità. Numerosi Autori hanno speculato sull'attività e sul carattere della “Milkmaid”, concludendo che il suo aspetto sarebbe più consono ad una santa o ad un'eroina del passato ([www.metmuseum.org](http://www.metmuseum.org)).*

Si ringrazia la Direzione del Rijksmuseum di Amsterdam per la riproduzione del quadro di Veermer in alta definizione gentilmente messa a nostra disposizione.

*Immagini fotografiche:*

*Sardegna 2015\** di Enzo Zavanella

*Biennale Venezia 2015\*\** di Luisa Zavanella

ISBN 978-88-97562-15-3

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, maggio 2016

Litos S.r.l. - Gianico (Bs) 2016

## NOTE BIOGRAFICHE DEI COLLABORATORI

### MAURIZIO ZAVANELLA

Laureato in Scienze Biologiche all'Università di Padova, ha diretto il Dipartimento di Bacteriologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (sede centrale di Brescia) comprendente attività di controllo degli alimenti e di produzione di biomasse in fermentatori.

*maurizio.zavanella@libero.it*

### PAOLO AURELI

Laureato in Scienze Biologiche all'Università "La Sapienza" di Roma, ha diretto il Laboratorio Alimenti e successivamente il Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari dell'Istituto Superiore di Sanità. È stato componente dell'*Advisory Forum* dell'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) e responsabile del Laboratorio Nazionale di Riferimento per il Latte e derivati nonché del Centro Nazionale per la Diagnosi di Botulismo.

*paoau@hotmail.it*

### LAURA ROSSI\*

Laureata in Scienze Biologiche con Dottorato in Auxologia e Fisiopatologia della Crescita e Specializzazione in Scienza dell'Alimentazione, è Ricercatore dell'Area Scientifica di Scienze Applicate all'Alimentazione presso il Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione di Roma e Delegato italiano alla FAO.

\*Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (CREA-NUT), Roma.

*laura.rossi@entecra.it*

### SILVIO MORETTI\*\*

Laureato in Scienze Biologiche all'Università "La Sapienza" di Roma, è Docente in Sicurezza Alimentare, Referente Regionale dell'Associazione Italiana Celiachia e Membro del Gruppo di Lavoro "Celiachia" del Ministero della Salute per la redazione delle "Linee-guida della Malattia Celiaca".

\*\* Gruppo Lavoro Celiachia - Ministero della Salute; Commissione di Studio per la Nutrizione - Ordine Nazionale dei Biologi, Roma.

*sede@aiclazio.it*

### GIOVANNI BANDI

Laureato in Farmacia nel 1976 presso l'Università di Pavia, dove si è specializzato in Farmacologia nel 1983, ha insegnato Chimica analitica, Farmacologia, Biochimica, Chimica Farmaceutica, Chimica degli Alimenti, Fisiologia, Biomateriali nelle Università di Pavia, Padova, Verona, Bologna e Lugano.

*giovanni.bandì@unipv.it*

## CLAUDIO MACCA

Medico responsabile dell'Unità di Dietetica e Nutrizione Clinica degli Spedali Civili di Brescia. Specializzato in Medicina Interna e in Endocrinologia, è Docente nei Corsi di Specializzazione della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Brescia. È Presidente dell'ADI (Associazione Italiana di Dietetica e Nutrizione Clinica) e Fondatore della Filosofia Dietetica "Cucina Lineare Metabolica".

*claudio.macca@spedalivicivi.brescia*

## LUIGIA FAVALLI

Laureata in Scienze Biologiche all'Università di Milano e Specializzata in Scienza dell'Alimentazione, indirizzo Nutrizionistico. All'Università di Pavia ha ricoperto l'incarico di Professore Associato nel Dipartimento di Scienza del Farmaco, per gli insegnamenti di Farmacologia Applicata, Dietofarmacologia dello Sport e Tossicologia.

*luigia.favalli@unipv.it*

## SIMONETTA SIGNORINI

Laureata in Scienze Biologiche presso l'Università di Pavia, si è specializzata in Biochimica e Chimica Clinica all'Università di Brescia. Ha conseguito un *Master Executive in Management* Aziende Ospedaliere e Socio-assistenziali presso l'Università Bocconi di Milano. Svolge l'attività di Biologa Responsabile del Settore Autoimmunità (che include esami per la diagnostica della malattia celiaca e sensibilità al glutine) presso il Laboratorio di Analisi "Fleming", oggi *Synlab Italia S.r.l.* ed è inoltre Coordinatrice Scientifica sull'Autoimmunità per il Gruppo Europeo *Synlab Holding*.

*simonetta.signorini@synlab.it*

## MARA LUCISANO

Professore Ordinario di Processi della Tecnologia Alimentare presso l'Università degli Studi di Milano, Dipartimento Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, Sezione di Scienze e Tecnologie dei Sistemi Alimentari.

Le ricerche affrontate riguardano prevalentemente temi di tecnologia alimentare e problematiche relative alla qualità dei prodotti finiti. Le tematiche di ricerca più recenti si focalizzano sul ruolo dei diversi ingredienti nei processi di panificazione e di pastificazione tradizionali e non convenzionali (alimenti senza glutine), con particolare attenzione al processo tecnologico, alla qualità del prodotto finito e alla sua evoluzione durante la conservazione.

*mara.lucisano@unimi.it*

## CAROLA CAPPA

Laureata in Scienze Alimentari e Dottore di Ricerca in Innovazione Tecnologica per le Scienze Agro-Alimentari e Ambientali. Dal 2012 è Assegnista di Ricerca post-dottorato presso l'Università degli Studi di Milano, Dipartimento Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente. Dal 2016 è *Postdoctoral Research Associate* presso la Michigan State University.

Dal 2015 svolge attività didattica nel "*Master in cucina popolare italiana di qualità*" e "*Master in the Slow Art of Italian Cuisine*" presso l'Università degli Studi di Scienze Gastronomiche di Cuneo, con attività di ricerca principalmente applicate ai cereali e allo sviluppo di alimenti senza glutine.

*carola.cappa@unimi.it*

## **ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ - ROMA**

### **ANNA MARIA FERRINI**

Laureata in Scienze Biologiche con Diploma e Specializzazione in Scienza dell’Alimentazione. È Primo Ricercatore del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare e Responsabile del Laboratorio Nazionale di Riferimento del Latte e dei Prodotti a base di latte presso l’Istituto Superiore di Sanità di Roma.



*annamaria.ferrini@iss.it*

### **BRUNELLA APPICCIAFUOCO**

Laureata in Biologia Sanitaria presso l’Università degli Studi dell’Aquila, lavora nel Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell’Istituto Superiore di Sanità di Roma con attività di controllo e di ricerca in microbiologia degli alimenti.

### **ELISABETTA DELIBATO**

Laureata in Scienze Biologiche a Roma presso l’Università “La Sapienza” con Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche presso l’Università “Tor Vergata”, lavora presso l’Istituto Superiore di Sanità di Roma con attività di controllo e di ricerca in microbiologia degli alimenti.

### **MARIA ROSA MASSARO**

Laureata in Scienze Biologiche con Diploma di Specializzazione in Microbiologia e Virologia presso l’Università “La Sapienza” di Roma. Opera nell’ambito della sicurezza alimentare presso l’Istituto Superiore di Sanità, dove si occupa di attività di ricerca inerenti la microbiologia degli alimenti e la presenza di residui di inibenti in prodotti di origine animale.

### **MICHELE SONNESSA**

Laureato in Biotecnologie Biomediche presso l’Università degli Studi della Basilicata, lavora presso l’Istituto Superiore di Sanità di Roma, dove si occupa dello sviluppo di metodi di ricerca in microbiologia nell’ambito della sicurezza alimentare.

### **SILVANA BIANCHINI RANGOZZI**

Laureata in Lettere all’Università Cattolica di Brescia e diplomata ISEF (Istituto Superiore di Educazione Fisica) di Milano.



## PRESENTAZIONE

*Da tempo un numero crescente di persone d'ogni età e latitudine lamenta disturbi attribuiti al consumo di certi alimenti. Due le categorie di cibi più frequentemente colpevolizzati: quelli che contengono lattosio e quelli che contengono glutine.*

*Ovvie (ed immediate) le ripercussioni sul commercio dei derivati del latte e dei cereali in genere.*

*Le industrie, pertanto, si sono attivate per aggirare l'ostacolo delle intolleranze, mettendo a punto, con procedimenti tecnologici innovativi, prodotti dichiarati "lactose-free" o "gluten-free" certamente molto validi e gradevoli, tanto da conseguire ampie soddisfazioni.*

*Tuttavia una considerazione s'impone. Vale a dire che, davanti agli scaffali dei supermercati, sta sempre e soltanto al consumatore scegliere "cum granu salis" i prodotti ritenuti più adatti alla tutela della propria salute.*

*Questo significa, per chi sospetta di essere intollerante, valutare possibili alternative sulla tavola, rivolgendosi, ad esempio, verso l'acquisto di certi formaggi stagionati che non contengono lattosio, o la preparazione di piatti a base di vegetali (come riso o mais) naturalmente privi di glutine.*

*Ma gli alimenti con scritto sopra "free", "frei", "sans" saranno quelli del domani?*



Il Segretario Generale  
dr. Stefano Capretti



Il Presidente  
dr. Francesco Bettoni







# INDICE



PREFAZIONE .....

XIII

## PARTE PRIMA

### Capitolo 1

*INTOLLERANZA AL LATTOSIO E PRODOTTI LATTIERO-CASEARI DELATTOSATI:*

*STATO DELLE CONOSCENZE (Paolo Aureli)..... 3*

### Capitolo 2

*INTRODUZIONE E STORIA DEGLI ALIMENTI SENZA GLUTINE*

*(Laura Rossi, Silvio Moretti) ..... 41*



### Capitolo 3

*LATTOSIO E GLUTINE. FONDAMENTI*

*(Giovanni Bandi)..... 57*

### Capitolo 4

*IL PROBLEMA DELLE INTOLLERANZE AL LATTOSIO E AL GLUTINE*

*(Claudio Macca)..... 63*

### Capitolo 5

*LA MODA DEL "LACTOSE AND GLUTEN-FREE": GUSTO O SALUTE?*

*(Luigia Favalli)..... 99*

### Capitolo 6

*STUDIO DELLE REAZIONI AVVERSE AL GLUTINE ED EVOLUZIONE DEI METODI*

*DI ANALISI LABORATORISTICI (Simonetta Signorini)..... 103*

### Capitolo 7

*SVILUPPO DI ALIMENTI GLUTEN-FREE: INGREDIENTI E TECNOLOGIE*

*(Mara Lucisano, Carola Cappa)..... 129*

## PARTE SECONDA

*LATTOSIO E GLUTINE IN LABORATORIO*

*(Maurizio Zavanella, Anna Maria Ferrini, Brunella Appicciafuoco,*

*Elisabetta Delibato, Maria Rosa Massaro, Michele Sonnessa)..... 147*

## APPENDICE

*RIPASSANDO BIOCHIMICA..... 241*

*RICETTE GLUTEN-FREE DALLA BBC..... 255*

*ANTICHI SAPORI: IL MONOCOCCO..... 269*



XI



## PREFAZIONE

### QUANDO I CIBI FANNO MALE

Da sempre si sa che gli alimenti possono qualche volta provocare nell'uomo reazioni avverse, attualmente chiamate *tossiche* e *non-tossiche*.

Le **reazioni tossiche** sono le più gravi, non dipendono strettamente dalla dose scatenante e colpiscono indifferentemente gli individui. In pratica, corrispondono agli *avvelenamenti alimentari*, che poi comprendono intossicazioni e tossinfezioni. Alla base delle intossicazioni c'è l'ingestione di un agente non vitale, che può essere una sostanza chimica, come un fertilizzante, un antibiotico, una tossina batterica preformata.

Nelle tossinfezioni, invece, oltre alla tossina, partecipa anche un agente infettante vivo, come avviene in presenza di certi microrganismi patogeni (ad esempio, le salmonelle) che si moltiplicano nell'organismo.

Le reazioni **non-tossiche** danno generalmente conseguenze meno gravi, dipendono dalla dose della sostanza nociva e sono legate alla suscettibilità individuale dell'ospite.

Si dividono in *allergie* e *intolleranze*.

#### **Forme di reazioni avverse al cibo non tossiche**

Le forme di reazioni avverse al cibo non tossiche possono manifestarsi in queste tre forme:

➤ **Allergia:** la manifestazione è immediata con produzione di anticorpi di classe IgE, le manifestazioni sintomatologiche possono essere di tipo respiratorie (riniti, asma), cutanee (orticaria, eczemi), anafilassi, congiuntiviti, disturbi dell'apparato gastrointestinale.

➤ **Intolleranze enzimatiche:** determinate dall'incapacità di metabolizzare l'alimento, ad esempio *deficit* di lattasi, *deficit* di G<sub>6</sub>PD Glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (che provoca il favismo), intolleranza al grano (che provoca la celiachia). Le manifestazioni sintomatologiche possono interessare il sistema gastrointestinale, oppure i disturbi possono essere di tipo extra-gastrointestinale ed interessare l'intero organismo.

➤ **Intolleranze farmacologiche o da additivi alimentari:** non sono reazioni immediate e le manifestazioni sintomatologiche sono variabili da forme di tipo gastrointestinale a forme extra-gastrointestinali (di entità da lieve a moderata), in quanto possono essere presenti sia meccanismi di tipo biochimico che immunologico, con produzione di anticorpi specifici (generalmente di classe IgG).



## IL PROBLEMA DELLE CARENZE ENZIMATICHE

### *Il lattosio*

La reazione di demolizione del lattosio è importante per le conseguenze sul metabolismo intestinale. La carenza dell'enzima lattasi (che caratterizza gli individui adulti in misura variabile nei diversi gruppi etnici, ma che è particolarmente diffusa nelle popolazioni asiatiche e africane) provoca intolleranza verso gli alimenti che contengono lattosio, con conseguenti sintomi a livello gastro-intestinale. La genetica ha dimostrato che esistono fondate ragioni per spiegare le cause di questo fenomeno, attorno al quale sono state avanzate numerose ipotesi.



Vincenzo Campi, *I mangiatori di ricotta*, olio su tela del 1580 circa, conservato presso il Musée des Beaux Arts di Lione.

### **PIONEERS IN LACTOSE INTOLERANCE**

**John Witte**, biochimico, University of California, San Francisco, USA (1990)

*“Experiments demonstrated that newly synthesized lactase is initially recognized as a precursor molecule with a relative molecular weight (Mr) of 205,000. We identified two distinct alterations in lactase biosynthesis accounting for adult hypolactasia. Studies in three deficient subjects demonstrated markedly reduced synthesis of the precursor protein though posttranslational processing appeared identical to normal. Multiple studies in a fourth deficient subject demonstrated synthesis of ample amounts of precursor lactase but reduced conversion to the mature active form of the enzyme”.*



Più Autori si sono dedicati allo studio della deficienza di lattasi, soprattutto nei bambini. Uno dei centri di ricerca più affermati si trovava in Olanda, presso l'Academic Medisch Centrum dell'Università di

Amsterdam. Tra questi Ricercatori si citano **Van't Hoff e Coll.** (1991) e **Rings E.H. e Coll.** (1994).



**Mark G. Thomas**, genetista, University College, Londra (PLOS 2009) in collaborazione con **Joachim Burger** e **Mattews Collins**, Mainz University (Mainz, Germania).

*“Lactase persistence (LP) is common among people of European ancestry, but with the exception of some African, Middle Eastern and southern Asian groups, is rare or absent elsewhere in the world. Lactase gene haplotype conservation around a polymorphism strongly associated with LP in Europeans (-13,910 C/T) indicates that the derived allele is recent in origin and has been subject to strong positive selection. Furthermore, ancient DNA work has shown that the -13,910\*T (derived) allele was very rare or absent in early Neolithic central Europeans”.*



Given that dairying in the Middle East started thousands of years before the LP allele emerged in Europe, ancient herders must have found ways to reduce

lactose concentrations in milk. It seems likely that they did so by making cheese or yogurt. Fermented cheeses such as feta and cheddar have a small fraction of the lactose found in fresh milk; aged hard cheeses similar to Parmesan have hardly any. Once the LP allele appeared, it offered a major selective advantage. In a 2004 study, researchers estimated that people with the mutation would have produced up to 19% more fertile offspring than those who lacked it. The researchers called that degree of selection “among the strongest yet seen for any gene in the genome”. Compounded over several hundred generations, that advantage could help a population to take over a continent. But only if “the population has a supply of fresh milk and is dairying”, says **Mark G. Thomas**. “It’s gene-culture coevolution. They feed off of each other.” (da Andrew Curry, *free lancer* in Berlin, 2013).



**Robert T. Jackson e Michael C. Latham** negli anni '70 hanno indagato sulla **diffusione del malassorbimento del lattosio tra i bambini del popolo Masai** (*Lactose malabsorption among Masai children of East Africa*, Am. J. Clin. Nutrition 1979, 32, 779-782), tra i quali **il 62% soffriva di malassorbimento di lattosio**, mentre solo il 38% era in grado di assorbirlo. Come mai i Masai sono più intolleranti delle altre popolazioni africane? Una risposta può essere trovata nelle cosiddette “**firme di selezione recente**”. In sostanza, nel genoma dei Masai il **segnale** di “recente selezione positiva” sulla variazione e differenziazione **per il gene LCT è maggiore** rispetto alle altre popolazioni, probabilmente a causa della forte pressione selettiva. In altre parole, **la selezione genetica è più recente tra i Masai**, quindi **meno completa ed efficiente** (www.lactease.com).



*I Masai.*



*Robert T. Jackson.*

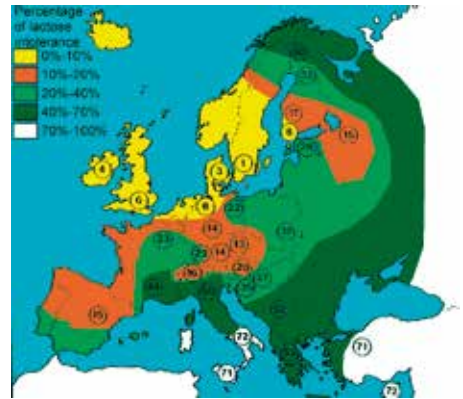


*Michael C. Latham,  
Cornell University,  
Ithaca (NY), USA.*



La lattasi è generalmente presente nei neonati e nei bambini, che sono quindi in grado di scindere il lattosio presente nel latte e di assorbire, a livello intestinale, galattosio e glucosio. Con il progredire dello sviluppo, l'espressione e l'attività della lattasi iniziano a diminuire nella maggior parte delle persone e generalmente sono mantenute a livelli efficaci soltanto nelle popolazioni caucasiche, a condizione che si continui a inserire nella loro alimentazione latte o, in generale, alimenti che contengano lattosio.

Il problema dell'intolleranza al lattosio è stato, in gran parte, risolto dall'industria, che sta mettendo a disposizione, in crescendo, un notevole numero di prodotti "senza lattosio" (*lactose-free*), chiamati anche "ad alta digeribilità". Il successo di questi alimenti è testimoniato dallo spazio loro riservato nelle aree commerciali e dall'apprezzamento dei consumatori.



Mappa delle percentuali d'intolleranza al lattosio in Europa.



D'altronde, non tutti i latticini contengono quantità apprezzabili di lattosio, come si può vedere dalla seguente tabella.

Lo *yogurt*, grazie alla fermentazione, è generalmente tollerato e allo stesso modo sono ben tollerati certi formaggi a lunga stagionatura (parmigiano-reggiano, pecorino, provolone, ecc). Sorpresa delle sorprese, tra i digeribili il gorgonzola (vedi APPENDICE) e il mascarpone (eccetto quello definito "cremoso"), che si può assumere perché prodotto tramite la coagulazione acido-termica della caseina (lacuochinasopraffina.com; cucinainsimpatia.net).

## LATTE E FORMAGGI

Valori medi di lattosio contenuto (in grammi per 100 grammi di alimento)

|                 |                    |                       |       |
|-----------------|--------------------|-----------------------|-------|
| latte           | bovino             | intero                | 4.5   |
|                 |                    | parzialmente scremato | 4.6   |
|                 |                    | delattosato           | 0.5   |
|                 |                    | in polvere magro      | 50.5  |
|                 | pecora             |                       | 4.5   |
|                 | capra              |                       | 4.2   |
|                 | bufala             |                       | 4.9   |
| yogurt          | da latte bovino    | intero                | 3.2   |
|                 |                    | parzialmente scremato | 3.3   |
|                 |                    | alla frutta           | 3.1   |
| panna           |                    |                       | 4.1   |
| focchi di latte |                    |                       | 2.6   |
| formaggi        | da latte bovino    | crescenza             | 1.5-2 |
|                 |                    | Taleggio              | 0     |
|                 |                    | Gorgonzola            | 0     |
|                 |                    | fontina               | 0     |
|                 |                    | provolone             | 0     |
|                 |                    | grana padano          | 0     |
|                 |                    | parmigiano-reggiano   | 0     |
|                 |                    | mozzarella            | 1.5   |
|                 |                    | ricotta               | 4     |
|                 |                    | <i>Cheddar</i>        | 0.2   |
|                 |                    | <i>Edam</i>           | 1     |
|                 |                    | mascarpone            | 0     |
|                 | da latte di pecora | pecorino              | 0     |
|                 |                    | ricotta romana        | 3.2   |

La celiachia è un'intolleranza al glutine, sostanza lipoproteica presente in **frumento, segale, orzo, avena, farro, spelta, Kamut®**. Può manifestarsi dopo una situazione di *stress* (malattia, gravidanza. Intervento chirurgico), aumentando nel corso della vita o scomparendo improvvisamente.

Nei bambini può comparire qualche mese dopo l'introduzione del glutine nella dieta.

È probabilmente conseguenza di una quantità esagerata di glutine che l'organismo non è in grado di metabolizzare.



Il cesto di pane, *Salvador Dalí (1926), St. Petersburg, Museum, Florida (USA)*.



*Frumento*



*Segale*



*Orzo*



*Avena*



*Farro*



*Spelta*



*Kamut®*

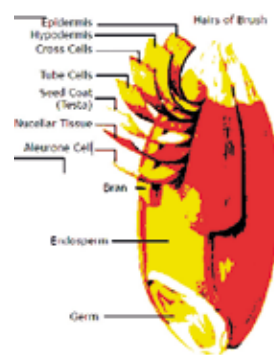


**CONTENGONO  
GLUTINE!!!**

Il **glutine** è definito come la frazione proteica del frumento, segale, orzo, avena, *Kamut®*, spelta, triticale o i loro ceppi ibridati o da essi derivati, insolubile in acqua e 0,5 M NaCl e alla quale i celiaci sono intolleranti.

Le **prolamine** sono definite come le frazioni del glutine che possono essere estratte con etanolo al 40-70%. La prolamina da frumento è la gliadina, dalla segale è la secalina, dall'orzo è l'ordeina e dall'avena è l'avenina.

Il contenuto di prolamina nel glutine è considerato generalmente del 50% circa.

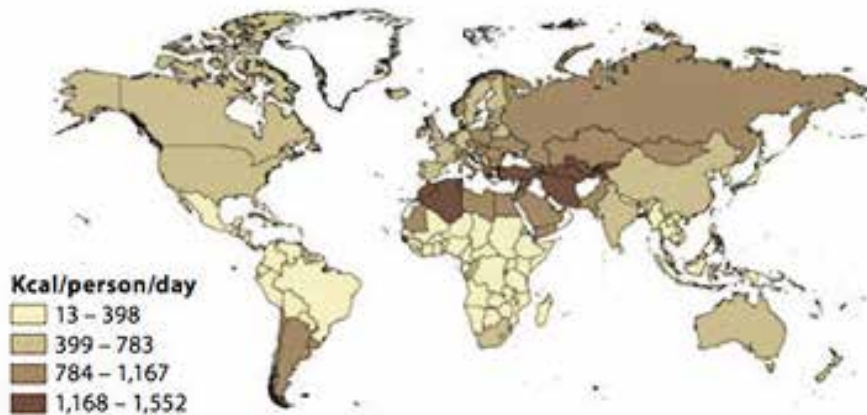




## Prevalence of celiac disease



## Wheat consumption



Il progresso nelle conoscenze scientifiche ha permesso di accertare che la celiachia è una malattia autoimmune che si instaura in soggetti geneticamente predisposti. Questo fatto può rivestire notevole importanza nella diagnosi precoce per il neonato.

In Europa è senz'altro la malattia genetica più frequente. La sua incidenza, in Italia, si aggira intorno all'1% della popolazione e, secondo alcuni Autori, riguarda percentualmente in prima linea le donne. Esistono anche rapporti fra celiachia e intolleranza al lattosio.

È interessante ricordare gli sforzi spesi dai Ricercatori che fin dal XIX° secolo si sono dedicati allo studio di questa patologia, avanzando teorie sulle sue origini e proponendo rimedi non sempre efficaci.

### **PIONEERS IN THE GLUTEN-FREE DIET**

(da Van Berge G.P. e Coll., 1993)



**Samuel Jones Gee** (1839 – 1911) è stato un medico pediatra britannico. Nel 1888 pubblicò la prima moderna e completa descrizione della celiachia nei bambini (o malattia di Gee-Herter), teorizzando l'importanza della dieta per il suo controllo. Gee studiò i precedenti documenti riportanti la malattia e concluse che una dieta mirata fosse l'unica cura possibile. Gee riconobbe che l'intolleranza al latte e gli alimenti contenenti elevate quantità di amido doversero essere evitati. Tuttavia, egli vietò frutta, riso, sago e verdure, mentre consigliava carne cruda e fette sottili di pane tostato.

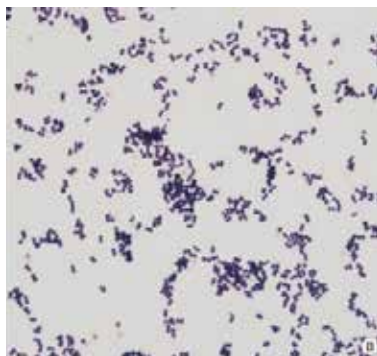
**Christian Archibald Herter**, medico e farmacologo statunitense (1865 - 1910), professore di chimica medica al *Bellevue Hospital Medical College* di New York, scrisse nel 1908 un libro sui bambini celiaci, definendo la malattia "infantilismo intestinale"; notò inoltre che i grassi erano più tollerati rispetto ai carboidrati.



**Sidney V. Haas**, pediatra americano (1870-1964), sviluppò nel 1924 una dieta a base di banane, che rimase "in vigore" finché non furono definitivamente determinate le cause della celiachia. I suoi studi furono continuati dal figlio, Merrill P. Haas, che pubblicò "*The Management of Celiac Disease*".

**Solo nel 1940 si fece un collegamento con il grano**, proposto dal pediatra olandese **Willem Karel Dicke**. A contribuire nella scoperta fu la **carestia olandese del 1944**, quando il grano scarseggiava e i suoi pazienti mostravano un deciso miglioramento della situazione.

La cura? Tentativi con farmaci (larazolide acetato), vaccini (Nexvax-2), **microrganismi della bocca** (Tian e Coll., 2014) che digeriscono il glutine (*Rothia*), hanno avuto esiti contrastanti. Occorre invece escludere dalla dieta alcuni alimenti comuni, pane, pasta, biscotti e pizza, sostituendoli con mais, riso o altri vegetali. E ritornare a colture di piante con minor contenuto di glutine (vedi quadro sotto) e sistemi di panificazione tradizionali.





*Amaranto*



*Miglio*



*Sorgo*



*Grano saraceno*



*Riso*



*Mais*



*Tapioca*



*Teff*



*Quinoa*



Anche in questo caso l'industria ha preparato (e continua a vendere) una vasta scelta di prodotti alimentari "senza glutine" che, attraverso la grossa distribuzione, possono coprire in gran parte la domanda del pubblico.

**Certamente con i prodotti *lactose-free* e *gluten-free* l'industria ha colto una grossa opportunità commerciale, occupando quote di mercato del tutto inattese.**



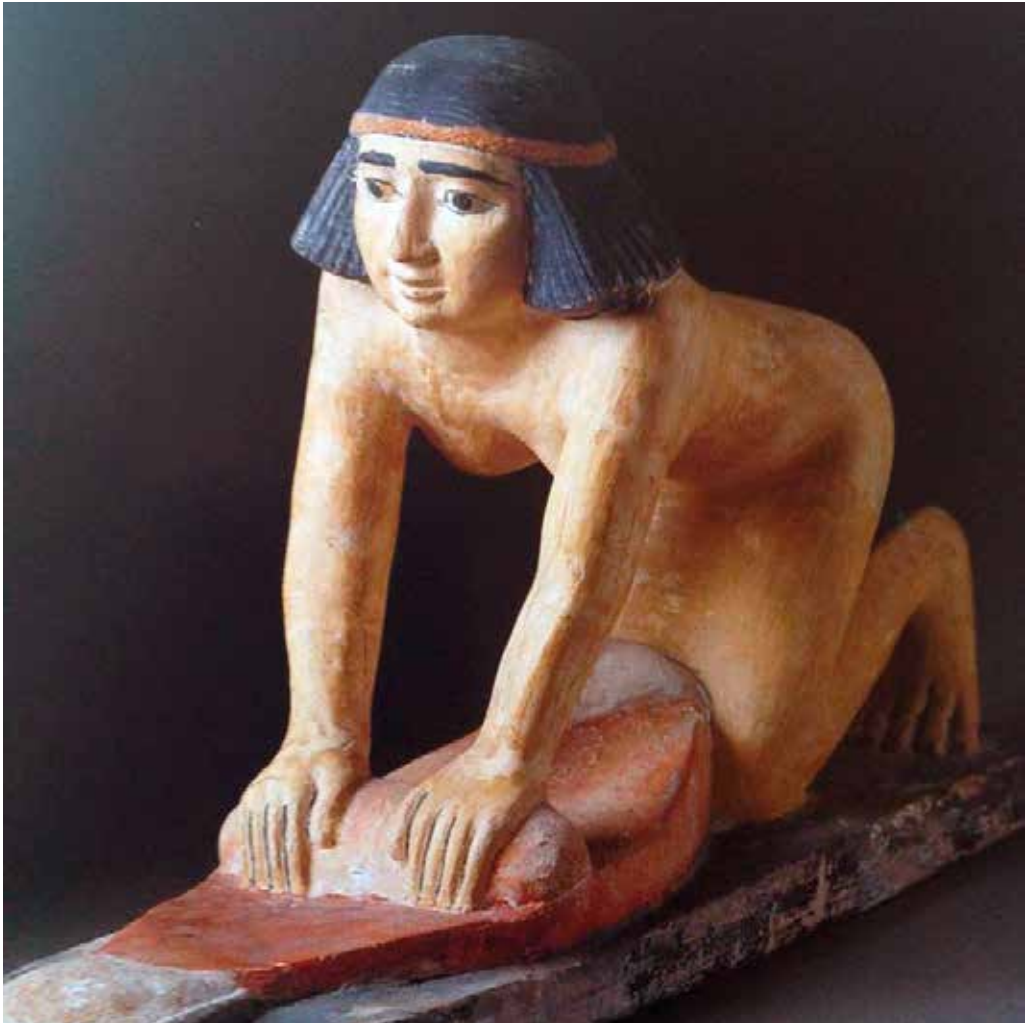
Al mercato settimanale - foto: E. Lodetti.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Andrew Curry, Archaeology: the milk revolution, *Nature* 2013, 500, 20-22.
- 2) Rings E.H., Buller G.R.J., Lactose intolerance and lactase deficiency in children, *Curr. Opin. Pediatr.* 1994, 6, 562-567.
- 3) Tian N., Wei G., Schuppan D., Helmerhost E.J., Effect of *Rothia mucilaginosa* enzymes on gliadin (gluten) structure, deamidation, and immunogenic epitopes relevant to celiac disease, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2014, 15, 769-776.
- 4) Van Berge G.P. *e Coll.*, Pioneers in the gluten-free diet: Wilhelm-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten-free diet, *Gut* 1993, 34, 1473-1475.
- 5) Van't Hoff B.W., Rings E.H., Grand R.J. Buller H.A., Lactose intolerance: current biological viewpoint, *Ned. Tijdschrift Geneesk.* 1991, 135, 746-749.
- 6) Yuval Itan, Adam Powell, Mark A. Beaumont, Joachim Burger, Mark G. Thomas, The Origins of Lactase Persistence in Europe, *PLOS* 2009, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000491
- 7) Witte J., Lloyd M., Lorenzon V., Korsman H., Olsen V., The biosynthetic basis of adult lactase deficiency, *J. Clin. Invest.* 1990, 86, 1338-1342.



# *PARTE PRIMA*



Alla pagina precedente:

*Macinatrice.*

Calcare dipinto. Antico Regno, V dinastia.

Museo Egizio, Firenze.

## **ERRATA CORRIGE**

### *Capitolo 1*

## **INTOLLERANZA AL LATTOSIO E PRODOTTI LATTIERO-CASEARI DELATTOSATI: STATO DELLE CONOSCENZE**

PAOLO AURELI

Pagina 5 Tabella 1, Titolo : sostituire con **Valori di riferimento (DRVs) per il calcio nella dieta di neonati, bambini , adulti**

Pagina 7 terz'ultima riga : eliminare ... **N-e**

Pagina 7 penultima riga : eliminare ...**una pro-lattasi che è inviata all'apparato del Golgi, dove viene ampiamente glicosilata e probabilmente dimerizzata** e sostituire con ...**una lattasi matura che viene trasferita alle membrane apicali degli enterociti**

Pagina 11 riga 8: eliminare la ripetizione... **addirittura...**

Pagina 11 sezione 2.1 secondo capoverso riga 1 ,.. invertire con ...**della citosina(C) con quello della timina (T)**...

Pagina 12 sezione 2.1. primo capoverso, penultima riga, invertire con ...**13 e 9 del gene adiacente ...**

Pagina 14 sezione 3, primo capoverso riga 2, sostituire con ... **una rapida accelerazione del tempo di transito...**

Pagina 18 sezione 6 primo capoverso riga 7: inserire...**soluzioni di natura psicologico e clinico-farmacologiche**

Pagina 23 sezione 7. terzo capoverso, riga 2: sostituire con... **'90 sempre...**

Pagina 24 sezione 7.1. primo capoverso, riga 8, sostituire con ... **nel suo aggiornamento( Regolamento UE 1056/2012)**...

Pagina 26 sezione 9 riga 7, sostituire con... **regolamento 178/2002**

Pagina 26 sezione 9 ultimo capoverso, seconda riga, sostituire con... **regolamento 234/2011**

*Capitolo 1*  
**INTOLLERANZA AL LATTOSIO E PRODOTTI LATTIERO-CASEARI  
DELATTOSATI: STATO DELLE CONOSCENZE**

PAOLO AURELI

## SOMMARIO

1. INTRODUZIONE
  - 1.1. Il lattosio
  - 1.2. La lattasi
2. LE FORME DI MALDIGESTIONE DEL LATTOSIO
  - 2.1. Le basi genetiche della tolleranza al lattosio
  - 2.2. L'intolleranza percepita
  - 2.3. L'intolleranza al lattosio del celiaco
3. LE POSSIBILI CAUSE DEI SINTOMI GASTROENTERICI DA MALDIGESTIONE DEL LATTOSIO
4. RICONOSCIMENTO DEI SOGGETTI INTOLLERANTI E MALDIGESTORI DEL LATTOSIO
5. LA QUANTITÀ DI LATTOSIO CAPACE DI SCATENARE I SINTOMI DELL'INTOLLERANZA
6. COME EVITARE I SINTOMI DELL'INTOLLERANZA AL LATTOSIO
  - 6.1. Adattamento del microbioma del colon al lattosio
7. TECNOLOGIE DI PRODUZIONE DI LATTE E DERIVATI DELATTOSATI
  - 7.1. Le  $\beta$  - galattosidasi d'interesse industriale: origine e aspetti normativi
8. LA COMMERCIALIZZAZIONE DEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI DELATTOSATI: norme di riferimento
9. ETICHETTATURA: indicazione della lattasi e la dicitura senza lattosio
10. CONCLUSIONI
11. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUZIONE

Come è noto, il latte è il primo e unico alimento dei neonati di tutti i mammiferi, che fornisce loro, immediatamente dopo la nascita, i nutrienti e l'energia necessari ad assicurare una sana e appropriata crescita. Mentre per la maggior parte dei mammiferi il consumo di latte si interrompe con lo svezzamento, nell'uomo il suo consumo continua per tutta la vita come componente di rilievo della sua dieta.

Due caratteristiche su tutte sono spesso proposte come nutrizionalmente e funzionalmente importanti per spiegare la ragione dell'inclusione del latte e derivati nella dieta di un individuo.

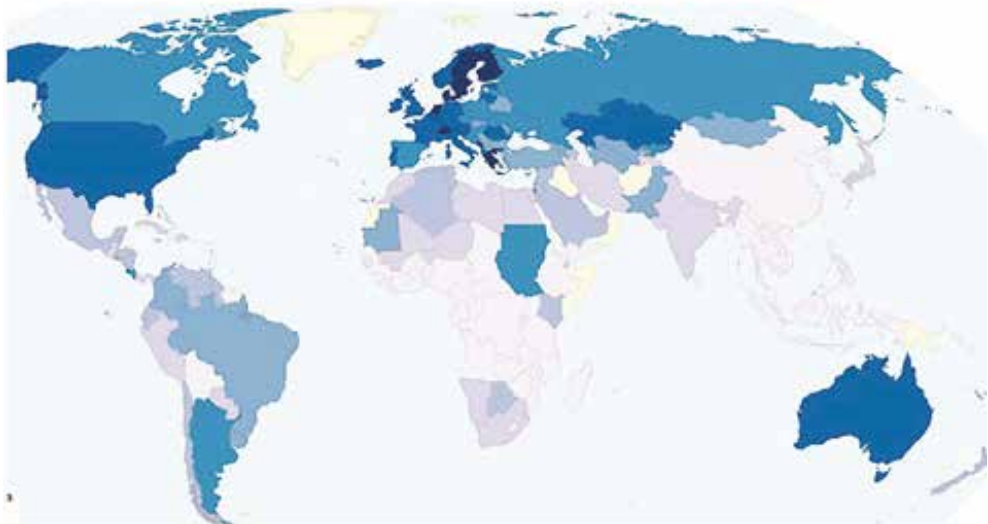
Questi alimenti, correntemente consumati nei Paesi occidentali, sono, infatti, considerati una importante fonte di proteine e di calcio (Ca), oltre che di altri nutrienti di rilievo quali



grassi (circa 400 differenti acidi grassi), vitamine (liposolubili e idrosolubili) e minerali (P, Mg, Zn, Se) tanto da essere qualificati “alimento ideale” e per questa ragione frequentemente inclusi come componenti primari di diete salubri. A questo proposito si ricorda, tra l’altro, il promettente effetto, emerso in alcuni recentissimi studi, del consumo di derivati del latte sul peso, sulla composizione corporea e, più in generale, sulla sindrome metabolica (Abarouei *et al*, 2012; Bendtsen *et al*, 2013; Chen *et al*, 2012; Dugan e Fernandez, 2014).

## CONSUMO DI LATTE NEL MONDO

IDEALDIETA.IT



La frazione proteica del latte è composta di due classi di proteine: le caseine (80%) e le sieroproteine (20%). Le prime sono proteine coniugate (fosfoproteine) che, nel caso di quelle bovine, consistono di  $\alpha(s1, 37\%)$ -,  $\alpha(s2, 10\%)$ -,  $\beta(35\%)$ -, k-caseine (12%). Esse sono disperse nel latte in forma di micelle stabilizzate proprio dalle k-caseine; i granuli di micelle caseiniche sono mantenuti come una sospensione colloidale nel latte e precipitano (coagulano) a seguito della sua acidificazione.

Le sieroproteine, invece, sono proteine che rimangono solubili anche dopo la precipitazione delle caseine e consistono di  $\beta$ -lattoglobuline (~50%),  $\alpha$ -lattalbumina (20%), albumina (10%) più lattoferrina e lattoperoxidasi (la frazione percentualmente restante, Farrel *et al*, 2004). Tanto le caseine che le sieroproteine sono proteine di alta qualità biologica per la loro composizione aminoacidica (contengono tutti gli aminoacidi essenziali), per la biodisponibilità e per la digeribilità, anche se il modo con cui sono assorbite e digerite è diverso.

Le caseine, infatti, sono considerate (Boirie *et al*, 1997) proteine “lente”; esse coagulano a contatto con l’ambiente acido dello stomaco, provocandone il ritardato svuotamento e, conseguentemente, il rallentato aumento postprandiale degli aminoacidi plasmatici. Le sieroproteine, invece, inducono un rapido, elevato e transiente aumento degli aminoacidi plasmatici.

Oltre alla qualità e al valore biologico, alle proteine del latte e, in particolare, ai biopeptidi, che da esse originano per degradazione enzimatica, si riconoscono diverse funzioni biologi-

che, che assicurano un'azione protettiva e benefica alla salute dell'uomo (attività antimicrobica, antiossidante, antipertensiva, antitrombotica, immunomodulatrice e oppioide (Koldovsky, 1989; Teschemacher e Koch, 1991; Fiat *et al*, 1993; Severin e Wenshui, 2005; Jauhiainen *et al*, 2007; Politis e Chronopoulou, 2008; Jenssen *et al*, 2009; Sisecioglu *et al*, 2010; Mills *et al*, 2011; Fekete *et al* 2013).

Per quanto riguarda il Ca, si tratta di un macroelemento naturalmente presente nel latte in elevata quantità; la sua concentrazione media è, infatti, di 1200 mg/L, distribuiti in parte nella fase micellare, in parte in quella acquosa. Nella fase micellare, esso è associato ai fosforesidui delle caseine, mentre nella fase acquosa il Ca è legato alle sieroproteine o è presente sotto forma di fosfati. Proprio l'elevata quantità di Ca presente nel latte e derivati è stata uno dei fattori vantati a favore del loro consumo perché questo è stato associato a una più alta densità ossea nel consumatore. Da lunga data, si riconosce, infatti, che il Ca, assunto durante la crescita in adeguata quantità, e in presenza di una appropriata concentrazione di vitamina D (Cranney *et al*, 2007; Ross *et al*, 2011; Rizzoli *et al*, 2013), è il fattore critico per raggiungere il picco di massa ossea. Il Ca ha un ruolo strutturale ed è necessario per conferire al tessuto osseo rigidità, solidità ed elasticità. Del tutto recentemente, l'EFSA (2015) ha fissato la quantità di Ca da assumere con la dieta (i DRVs) nelle varie età (Tabella 1).

**Tabella 1 - Valori di riferimento per la dieta (DVRS) di calcio per i neonati, i bambini e gli adulti**

| ETÀ                               | Assunzione adeguata mg/giorno | Fabbisogno medio mg/giorno | Assunzioni di riferimento per la popolazione mg/giorno |
|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--|
| 7-11 mesi                         | 280                           |                            |  |
| 1-3 anni                          |                               | 390                        | 450  |
| 4-10 anni                         |                               | 680                        | 800  |
| 11-17 anni                        |                               | 960                        | 1150   |
| Adulti: 18-24 anni <sup>(a)</sup> |                               | 860                        | 1000   |
| Adulti: ≥ 25 anni <sup>(a)</sup>  |                               | 750                        | 950  |

Legenda: (a) donne in gravidanza e in allattamento

Nel caso in cui la quantità di Ca fornita dalla dieta dovesse essere insufficiente a soddisfare le esigenze fisiologiche dell'organismo per una bassa assunzione e/o insufficiente assorbimento gastrointestinale, il Ca è riassorbito dallo scheletro in modo da mantenere la concentrazione ematica dentro valori appropriati ad assicurare le funzioni cellulari e tissutali (tra cui la trasmissione neuronale, la contrazione muscolare e vascolare, la coagulazione del sangue, il trasporto di membrana). Questo causerà la riduzione della massa ossea che, a sua volta, potrà comportare osteopenia e osteoporosi con un aumento del rischio di fratture ossee (Caroli *et al*, 2011, Rizzoli, 2014).

Il latte, però, contiene anche elevate quantità di lattosio che alcuni individui hanno una più o meno marcata incapacità di digerire. Infatti, come in tempi recenti si è scoperto, il lattosio per essere assorbito deve essere scomposto nei due monosaccaridi costitutivi, glucosio e galattosio, grazie all'azione di un enzima digestivo, la lattasi (Fig. 1) che in alcuni soggetti tende a ridursi in maniera rilevante dopo lo svezzamento. Per questa ragione, strati più o meno ampi della popolazione di vari Paesi del mondo, nonostante l'importanza nutrizionale dei prodotti lattiero-caseari, ne evitano il consumo perché intolleranti o per prevenire i disturbi che ritengono possano presentarsi dalla maldigestione di tale carboidrato, potenzialmente compromettendo l'assunzione di proteine nobili, calcio e vitamina D.

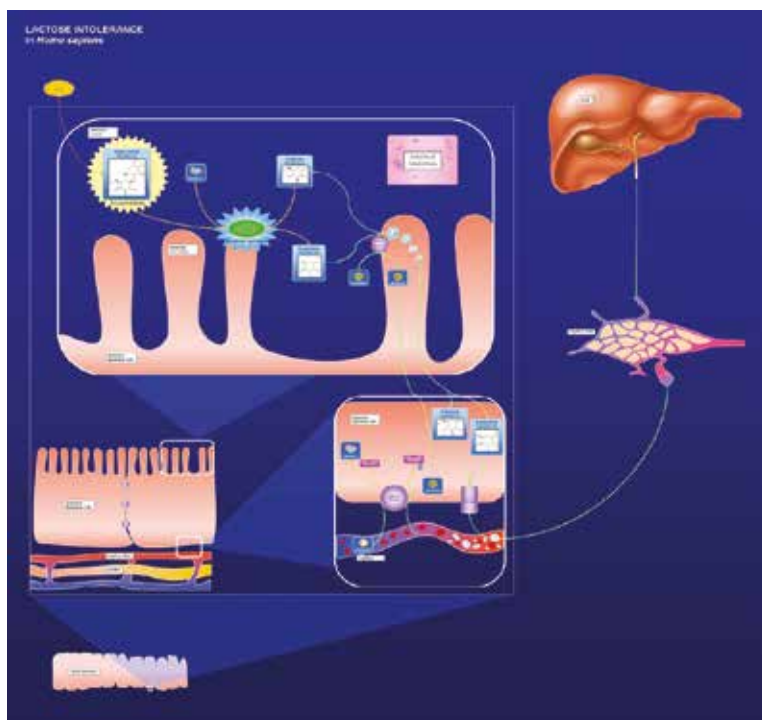


Figura 1 - Rappresentazione della localizzazione della lattasi e dell'assorbimento e metabolismo del glucosio e galattosio

Una volta compresi i meccanismi implicati nell'intolleranza al lattosio, è apparso chiaro che uno dei modi di gestire il problema era ridurre o eliminare l'assunzione del lattosio. In questi ultimi decenni, grazie agli importanti contributi conoscitivi messi a disposizione dalla ricerca, l'industria lattiero-casearia ha messo a punto e adottato alcune soluzioni tecnologiche che prevedono la degradazione del lattosio mediante l'uso della lattasi microbica o la sua rimozione mediante cromatografia o filtrazione, producendo e commercializzando, a partire già dagli anni sessanta, latte a ridotto contenuto di lattosio, per arrivare in questi ultimi anni alla produzione e commercializzazione di una ampia gamma di prodotti lattiero-caseari, compreso il latte trattato termicamente, tutti "senza lattosio".

### 1.1 Il lattosio (4-O-β-D-galattopiranosil-D-glucopiranosio, $C_{12}H_{22}O_{11}$ )

È un disaccaride, composto da una molecola di glucosio e una di galattosio, legate covalentemente con legame β1-4 glicosidico, sintetizzato nelle mammelle delle lattifere dalla lattosio-sintetasi, un complesso di due proteine, l'UDP-galattosil-transferasi (E.C.2.4.1.22) e α-lactalbumina (α-Lac) (Khun, 1983). Si può trovare in due forme isomeriche α e β che sono in equilibrio in soluzione acquosa. È idrolizzato dalla β-galattosidasi, che ha una speciale preferenza per la forma beta (Schaafsma, 2008), nei due monosaccaridi costitutivi, che nell'uomo sono assorbiti e trasportati nel fegato attraverso la vena porta, dove il galattosio è convertito in glucosio (Lomer *et al.*, 2008) (Fig. 1). È presente essenzialmente nel latte di tutti i mammiferi, dove costituisce il principale carboidrato, in concentrazione assai variabile secondo la

specie. La sua concentrazione nel latte umano è di 7,2 g/100 ml, mentre quella riscontrabile nel latte bovino è di 4,8 g/100 ml (rappresenta il 30% circa del potere calorico del latte intero).

Nel primo anno di vita, il lattosio è la più importante fonte di energia del neonato, fornendogliene quasi la metà della domanda complessiva (Vesa *et al*, 2000). Molto si è speculato sulla presenza di questo speciale zucchero nel latte: un'ipotesi lo ritiene associato alla sua solubilità che si accorda bene con la sua sintesi e secrezione nel latte, fornendo, altresì, una giusta quantità di energia senza provocare un aumento della pressione osmotica (Mustapha *et al*, 1997). Un'altra ipotesi privilegia il fatto che il lattosio offre una bilanciata quantità di glucosio, fonte energetica, e galattosio, un elemento cruciale nello sviluppo del cervello (Adam *et al*, 2004); questo monosaccaride, infatti, mediante la sua trasformazione in acetilgalattosamina, è uno dei sei carboidrati che concorrono alla formazione dei gangliosidi, importanti componenti dei ricettori di membrana e delle superfici delle cellule del sistema nervoso (Varki, 2008; Wang, 2009).

È stato a lungo dibattuto il ruolo del lattosio come fattore che aumenta l'assorbimento dei minerali, in particolare del Ca. Oggi è generalmente accettato il fatto che il lattosio ha un positivo effetto nell'assorbimento del macroelemento negli animali, mentre rimane dibattuto quello nell'uomo. Dati sperimentali indicano, però, che la concentrazione plasmatica, e, quindi, l'assorbimento di calcio dopo consumo di latte è rispettivamente il 34% (con il latte delattosato) e il 37% (con quello non delattosato) nei soggetti adulti intolleranti e il 24% (con il delattosato) e il 26% (con il latte non delattosato) nei soggetti tolleranti (Tremaine *et al*, 1986).

I soggetti adulti intolleranti al lattosio mostrano, dunque, un significativo più alto assorbimento del calcio; questo dato è stato confermato anche da uno studio successivo (Griessen *et al*, 1989). Secondo questi dati sembra potersi affermare che l'intolleranza al lattosio non sarebbe di ostacolo all'assorbimento del calcio, specialmente quando il lattosio ingerito proviene da prodotti lattiero-caseari (Suarez *et al*, 1998). Sulla questione l'EFSA *Panel Dietetic Products, Nutrition, and Allergies* (NDA) (2010) ha affermato che le evidenze disponibili non sono sufficienti per trarre conclusioni sull'assorbimento del calcio dai prodotti in cui il lattosio è stato idrolizzato; in ogni caso, continua il *Panel*, non c'è d'aspettarsi alcun effetto nutrizionalmente negativo se i prodotti delattosati differiscono dai prodotti lattiero-caseari convenzionali solo per il contenuto in lattosio. Coerentemente, l'anno successivo l'EFSA *Panel* (NDA) ha rigettato la richiesta per il *claim* "lattosio e assorbimento del calcio", perché la documentazione messa a loro disposizione non dimostrerebbe alcuna relazione di causa ed effetto tra il consumo di lattosio e l'aumento dell'assorbimento del calcio con sua conseguente ritenzione (EFSA, 2011).

## 1.2 La lattasi (lattasi florizina idrolasi, EC 3.2.1.23/26)

È una delle sette glucosidasi di cui è dotato l'orletto a spazzola (l'insieme dei microvilli, cioè di quelle sottili estroflessioni citoplasmatiche della membrana) degli enterociti dell'intestino (Hauri *et al.*, 1985) (Fig. 1).

Più precisamente, è una glicoproteina, legata alla membrana degli enterociti, a catena polipeptidica singola, con due siti catalitici: uno in grado di scindere il lattosio (la lattasi propriamente detta), l'altro responsabile della degradazione degli aril- e alchil- $\beta$ -glicosidi, quali la florizina e i 3-glicoceramidi (la florizina idrolasi, Naim *et al* 1987). La lattasi è sintetizzata (Fig. 2) prima come precursore (la pre"pro" lattasi florizina idrolasi) dall'apparente peso molecolare di 215,000 Da (Danielsen *et al*, 1984; Skovbjerg *et al*, 1984) nel reticolo endoplasmatico. Qui subisce una N- glicosilazione e dimerizzazione prima di essere trasferita all'apparato del Golgi, dove è ulteriormente N- e O- glicosilata e processata per arrivare alla molecola di 160,000 Da; si ha così una pro-lattasi che è inviata all'apparato del Golgi, dove viene ampiamente glicosilata e probabilmente dimerizzata (Naim *et al*, 1987).

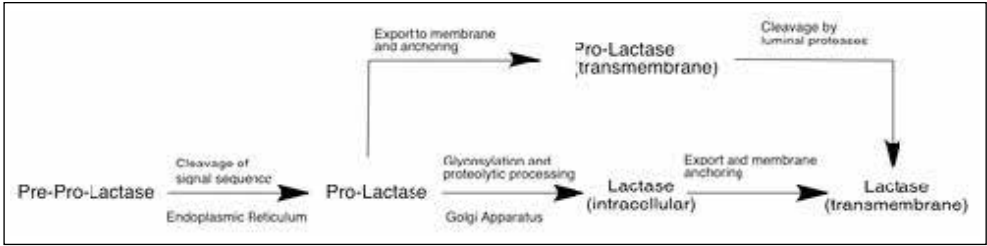


Figura 2 - Sintesi della lattasi florizin idrolasi

Il gene della lattasi umana, come si è potuto dedurre dal *cDNA sequencing*, si compone di quattro domini (Fig. 3): 1) una sequenza segnale di scissione composta da 19 amminoacidi, (2) un complesso lattasi che contiene in una singola catena polipeptidica sia la lattasi sia la florizina idrolasi, (3) un segmento idrofobico di aggancio alla membrana degli enterociti vicino al C-terminale, e (4), infine, un segmento idrofilo C-terminale di 26 amminoacidi distribuito nel citosol (Mantei *et al*, 1988).

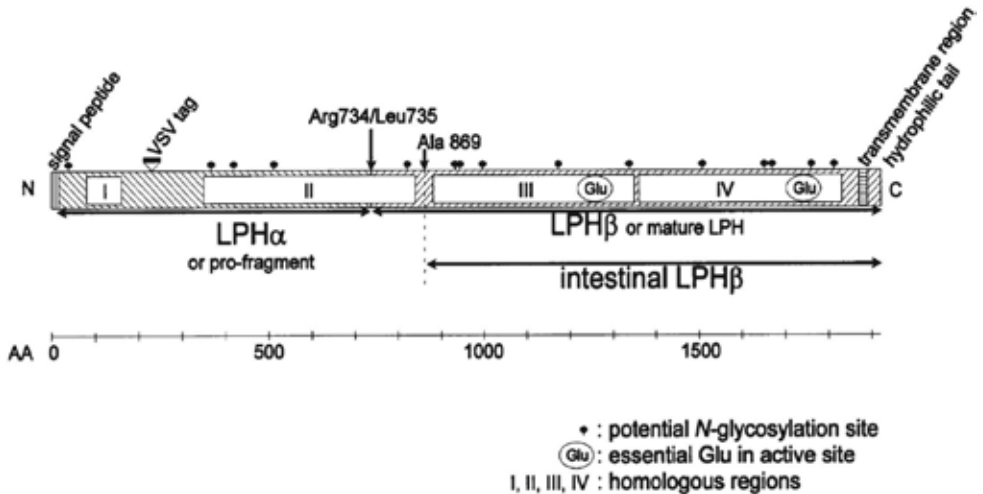


Figura 3 - I quattro domini che compongono il gene della lattasi florizin idrolasi umana

La lattasi è, dunque, l'enzima digestivo responsabile dell'idrolisi del lattosio a glucosio e galattosio per il successivo assorbimento, presente sull'orletto a spazzola degli enterociti dell'intestino, (Skovbjerg *et al*, 1981; Mantei *et al*, 1988). La produzione della lattasi presenta, però, una specifica espressione tissutale, non solo differente lungo l'asse longitudinale dell'intestino tenue (la più alta espressione si rileva nella parte intermedia del digiuno, (Fig. 4); Lomer *et al*, 2008; Leonardi *et al*, 2012) ma anche una espressione varia tra le cellule dello stesso digiuno come rilevato nei differenti enterociti localizzati alla giunzione cripta/villo (Troelsen, 2005).

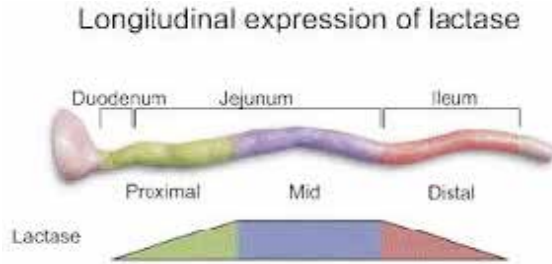


Figura 4 - Distribuzione della produzione di lattasi nell'intestino tenue

I livelli di enzima prodotto raggiungono il massimo nel neonato per poi ridursi a circa il 10 % del suo valore iniziale (Auricchio *et al.*, 1963; Dahlquist *et al.*, 1963) in maniera irreversibile dopo lo svezzamento, in tempi variabili secondo il gruppo etnico di appartenenza durante tutto lo sviluppo (Mauri *et al.*, 1991; Rossi *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002); nella maggior parte dei casi questo declino si manifesta durante l'infanzia. Il *timing* del processo di riduzione della lattasi è influenzato, oltre che da un intrinseco programma ontogenico (Duluc, 1994) e da modifiche ormonali che subentrano con lo svezzamento (Freund, 1991), anche da modifiche di tipo nutrizionale che sopravvengono proprio con lo svezzamento (Henning, 1987; Duluc *et al.*, 1992); così un prematuro o un ritardato cambiamento verso una alimentazione più complessa accelera o ritarda il declino enzimatico e la modifica della distribuzione longitudinale dell'espressione genica dell'enzima nell'intestino tenue (Lebental, 1973; Duluc, 1992). In alcuni soggetti, invece, la produzione di lattasi persiste durante tutta la vita (Enattah *et al.*, 2002; Swallow 2003; Ingram *et al.*, 2007; Tishkoff *et al.*, 2007; Enattah *et al.*, 2008). Si tratta dei discendenti di quelle popolazioni (Leonardi *et al.*, 2012; Curry, 2013) che alcune migliaia di anni fa hanno cominciato a praticare la pastorizia. Tenendo presente che l'attività lattasica è espressa in unità per g di mucosa fresca o per g di proteina (EFSA, 2010), si parla di persistenza della lattasi quando si riscontrano valori dell'enzima sopra 50 U/g. Va ricordato che in molti animali l'assunzione di lattosio o di latte può indurre la lattasi (Freund *et al.*, 1993) questo, però, non avviene nell'uomo (Gilat *et al.*, 1972). Negli animali, gli ormoni, in particolare il cortisone e la tiroxina, influenzano la lattasi intestinale, il primo aumentandone la produzione, il secondo inibendola (Koldowsky *et al.*, 1970; Malo e Menard, 1979; Raul *et al.*, 1983).

## 2. LE FORME DI MALDIGESTIONE DEL LATTOSIO

La terminologia usata per definire la maldigestione del lattosio varia in relazione alla bassa o assente attività della lattasi causata da una alterazione (nel caso del neonato) o riduzione (nel caso dell'adulto) dell'espressione del gene di tale enzima. Si parla di carenza congenita della lattasi per indicare una malattia autosomica, assai rara e presente nei neonati di differente origine etnica (in Finlandia, dove sembra essere particolarmente diffusa, si stima 1 caso/ 60.000 nuovi nati; Järvelä *et al.*, 1998) per un difetto genetico (Nose *et al.*, 1970; Savilahti *et al.*, 1983; Kuokkanen *et al.*, 2006; Tornainen *et al.*, 2009). A causa della mancanza dell'enzima alla nascita, il neonato va incontro a una profusa diarrea intrattabile (condizione assai pericolosa per la disidratazione e perdita di elettroliti) sin dalle prime poppate di latte materno o di quello adattato contenente lattosio. A tutt'oggi sono state individuate 9 mutazioni nel gene della lattasi, responsabili della CLD (*congenital lactase*

*deficiency*; OMIM 223000). Invece, la carenza della lattasi nell'adulto, detta anche lattasi non persistente, è una condizione che deriva dalla fisiologica riduzione dell'enzima cui l'uomo va incontro dopo lo svezzamento. L'ipolattasia causa una insufficiente digestione del lattosio che è indicata col termine di **maldigestione** (Swallow, 2003), mentre quando si accompagna alla comparsa di sintomi clinici (borborigmo, flatulenza, crampi addominali, gonfiore addominale, diarrea, Schaafsma, 2008; Law *et al*, 2010) prende il nome di **intolleranza al lattosio**; essa è attribuibile a uno squilibrio tra la quantità di lattosio ingerita e la capacità della lattasi (Arola e Tamm, 1994) di idrolizzare il disaccaride. La presenza di lattosio maldigerito nel colon, però, non necessariamente provoca i sintomi gastrointestinali dell'intolleranza (Vesa *et al*, 1996; de Vrese *et al*, 2001; Savaiano *et al*, 2006); la maldigestione/intolleranza è, infatti, influenzata, oltre che dalla quantità di lattasi, dalla quantità della singola assunzione, dalla frequenza e dalla quantità complessiva ingerita nella giornata, dalla quantità di lattosio maldigerito che raggiunge il colon, dal grado di fermentazione da parte della flora microbica del colon, dall'assunzione del lattosio in associazione con altri alimenti, dal tempo del transito intestinale, dal sesso, dall'età, dalla sensibilità viscerale o anomalie della peristalsi, dal grado di consumo o rimozione degli acidi grassi a catena corta e gas (Gibson *et al*, 1990; Vesa *et al*, 2000; Brown-Esters *et al*, 2012) prodotti durante la fermentazione microbica intestinale. Per effetto di ciò, secondo alcuni ricercatori solo un terzo dei soggetti maldigestori sono intolleranti al lattosio (Gasbarrini *et al*, 2009) anche se per altri la vera prevalenza degli intolleranti è sconosciuta (Shaukat *et al*, 2010) a causa della mancanza di una *gold standard definition* di intolleranza. Ad eccezione delle popolazioni del centro e nord Europa e dei loro discendenti che vivono in America e Australia (Fig. 5), il 70-100% degli adulti del pianeta è maldigestore del lattosio (Itan *et al*, 2010).

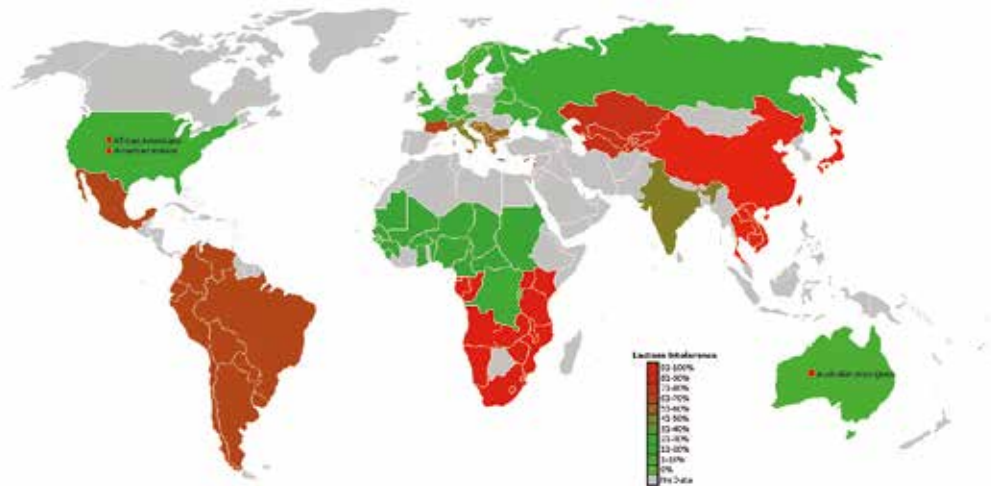


Figura 5 - Distribuzione dell'intolleranza al lattosio nei differenti Paesi

La prevalenza della non persistenza della lattasi è del 3-5% in Scandinavia, del 17% in Finlandia, del 23% in Gran Bretagna, del 4% in Danimarca, del 14% in Germania, del 17% in Finlandia, del 20% in Austria, del 23% in Gran Bretagna, del 34% in Spagna, del 37% in Polonia, del 38% in Francia, del 40% in Ungheria, del 43% in Estonia, del 46% in Grecia, del 56% nel nostro Paese, del 70-90% in Africa, dell'80% in Asia Centrale, del 90-100% nell'Asia



Orientale, del 30% nel nord e del 70% nel sud dell'India, del 15% nella popolazione bianca, del 53% in quella ispanica e dell' 80% in quella nera del Nord America e, infine, del 65-70% nell'America del sud (Sahi, 1994; Ingram *et al.*, 2009). Non sono disponibili, tuttavia, dati sulla prevalenza dell'intolleranza al lattosio valutata in base ai sintomi, correlati all'assunzione di lattosio e alla misura del H<sub>2</sub> espirato, nell'intera popolazione (Jellema *et al.*, 2010). Generalmente, la perdita dell'attività lattasica comincia tra i 2 e i 6 anni, tranne che nelle popolazioni di razza bianca con bassa prevalenza della lattasi non persistente in cui comincia più tardi e in alcuni casi addirittura addirittura a 20 anni (Seppo *et al.*, 2008). Sia la carenza congenita sia la non persistenza della lattasi sono ereditate come caratteristiche autosomiche recessive (Vesa *et al.*, 2000). Esiste anche una maldigestione secondaria conseguente a processi patologici intestinali che causano un danno alla mucosa dell'intestino tenue (enteriti, morbo di Crohn, infezioni batteriche o parassitarie, celiachia, chemioterapia). Si tratta, in genere, di una condizione che tende a scomparire con la risoluzione della patologia intestinale causale. Pertanto, nella popolazione adulta si ritrovano due distinti fenotipi, uno con la lattasi persistente e l'altro con la ipolattasia (Auricchio *et al.*, 1963, Dahlqvist *et al.*, 1963). È stata recentemente segnalata anche una carenza transitoria della lattasi per indicare la maldigestione del lattosio relativa, osservata tra i neonati pretermine di meno di 34 settimane di gestazione (Heyman, 2006).

### 2.1 Le basi genetiche della tolleranza al lattosio

Solo una decina di anni fa si sono potute chiarire le basi genetiche della tolleranza al lattosio con la dimostrazione che la persistenza di un alto livello della lattasi è dovuta a una alterazione (mutazione) del gene della lattasi presente nel braccio lungo del cromosoma 2 (Krusse *et al.*, 1988), (Fig. 6), e più precisamente a un polimorfismo a singolo nucleotide (Enattah, 2002) nella regione a monte del *locus* del gene della lattasi (LCT).

Questo polimorfismo consiste nel cambiamento del nucleotide della timina (T) con quello della citosina (C) con il risultato di avere le seguenti varianti nella popolazione: CC, CT o TT<sub>-13 910</sub>. In altre parole, l'espressione del gene che codifica per la lattasi (LCT) è dovuta a un polimorfismo, che funziona come elemento *cis-acting*, influenzando il promotore del gene lattasi (Ho *et al.*, 1982) con il risultato finale di avere gruppi di individui omozigoti per la persistenza della lattasi (alta attività della lattasi), gruppi eterozigoti con media attività della lattasi e, infine, soggetti omozigoti non persistenti con bassa attività della lattasi (Tabella 2).

**Tabella 2 - Distribuzione dei genotipi tra i soggetti lattasi persistente e non persistente \***

| Genotipi             |    | Lattasi non persistente % | Lattasi persistente % |
|----------------------|----|---------------------------|-----------------------|
| CT <sub>-13910</sub> |    |                           |                       |
|                      | CC | ~100                      | 0                     |
|                      | CT | <5                        | >95                   |
|                      | TT | 0                         | 100                   |
| GA <sub>-22018</sub> |    |                           |                       |
|                      | GG | 100                       | 0                     |
|                      | GA |                           | >90                   |
|                      | AA |                           | 100                   |

Legenda: \* Enattah *et al.*, 2002; Babu *et al.*, 2010

Nel nostro Paese gli abitanti della Sardegna presentano la stessa variante C/T-13910 diffusa tra le popolazioni del nord Europa (Schirru *et al.*, 2007). Il fenotipo lattasi persistente (LP)/lattasi non persistente (LNP) è determinato geneticamente con LP ereditato in maniera auto-



somica dominate (Enattah *et al*, 2007); mentre LNP è considerato il tipo ancestrale, LP è la conseguenza della sopradetta mutazione (Swallow, 2003).

Studi sull'inizio dell'ipolattasia hanno dimostrato che, nonostante la presenza del polimorfismo, c'è poca differenza nell'espressione della lattasi nei neonati rispetto ai soggetti che non l'hanno; questo sta a indicare che la mutazione diventa sempre più funzionale nel corso della crescita (Wang *et al*, 1998). Il meccanismo molecolare che induce la *down-regulation* degli alleli della lattasi non persistente non è stato, però, ancora chiarito (Enattah *et al*, 2007; Enattah *et al*, 2008; Ingram *et al*, 2009b); si è ipotizzato che le proteine che si legano al DNA, regolate in modo evolutivo, promuovano la trascrizione o destabilizzino gli mRNA trascritti, causando una diminuzione dell'espressione della lattasi dopo lo svezzamento (Wang *et al*, 1998; Rasinperä *et al*, 2005). Analisi del promotore del gene della lattasi hanno dimostrato che esso contiene più polimorfismi organizzati in un piccolo numero di aplotipi (Hollox *et al*, 2001). Infatti, oltre al polimorfismo C/T-13910, è stato identificato nei Finlandesi un altro polimorfismo, il G/A-22018, anche questo associato al carattere persistenza della lattasi in età adulta (Enattah, 2002). I due polimorfismi sono localizzati rispettivamente a ~14 kb e a ~22 kb a monte del gene LCT, rispettivamente all'interno degli introni (sequenze di basi non codificanti) 9 e 13 del gene adiacente MCM6 (*Mini Chromosome Maintenance 6*), un *enhancer* del promotore del gene LCT (Fig. 6) (Poulter *et al*, 2003).

Successivamente, mediante studi funzionali è stato dimostrato che la variante T è un più efficace *enhancer* dell'attività del promotore di LCT della variante C (Olds e Sibley, 2003; Troelsen *et al*, 2003). Polimorfismi diversi da quelli rilevati nelle popolazioni europee (il T/G-13915, G/C-14 010, C/G-13907 e il T/C-13913) (Fig. 6) sono, invece, stati riscontrati in molte popolazioni mediorientali e africane dedite alla pastorizia e, quindi, al consumo di latte (Ingram *et al*, 2007; Tishkoff *et al*, 2007; Enattah *et al*, 2008; Torniaainen *et al*, 2009 a).

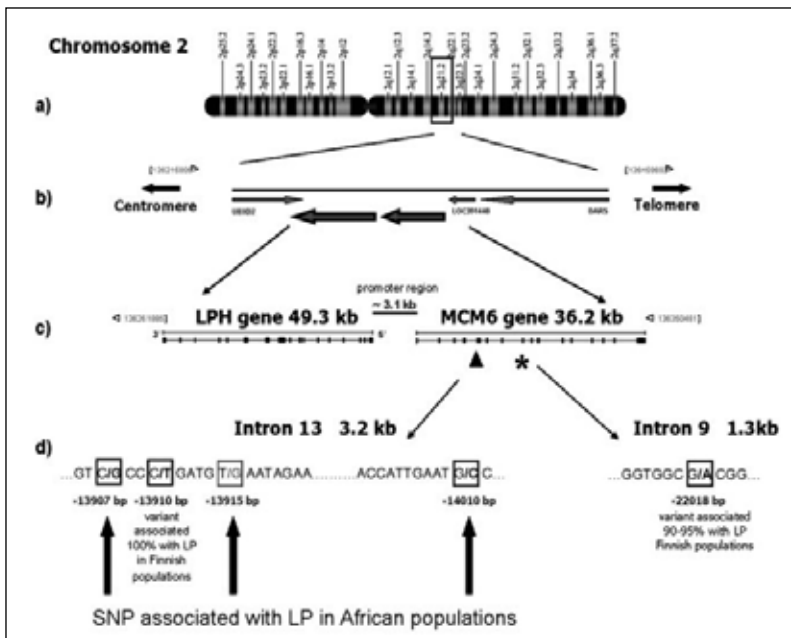


Figura 6 - Localizzazione dei polimorfismi della lattasi

Ciascuno di questi alleli presenta una diversa distribuzione geografica: ad esempio, il T/G-13915 è presente soprattutto in Medio Oriente, Arabia Saudita (Imtiaz *et al*, 2007), mentre gli altri sono riscontrabili tra le popolazioni dell’Africa orientale. La correlazione del fenotipo persistenza della lattasi nell’adulto con la pratica dell’allevamento del bestiame e della mungitura ha portato a formulare l’ipotesi che questo carattere sia il risultato di una forte selezione naturale iniziata circa 10.000 anni fa (Aoki, 1986; Holden e Mace, 1997). Questa selezione ha rappresentato per le razze che presentavano la mutazione “persistenza lattasi” un vantaggio evolutivo perché ha permesso loro di poter utilizzare il latte, “sapendo” di digerirlo, nei periodi in cui i raccolti erano scarsi (Beja-Pereira *et al*, 2003).

## 2.2 L’intolleranza percepita

Per il *National Institute of Health (NIH) consensus development panel* (2010) l’intolleranza al lattosio è la sindrome clinica caratterizzata dal manifestarsi di sintomi gastrointestinali, mentre la maldigestione del lattosio è quella condizione caratterizzata dalla produzione di H<sub>2</sub> rilevata mediante il *breath test* (Suchy *et al*, 2010). Ciò premesso, si ricorda che alcune persone avvertono sintomi dopo aver consumato piccole quantità di latte e per questo credono di essere intolleranti al latte, anche se non ci sono prove che confermano la loro convinzione e, cioè, che i sintomi siano effettivamente dovuti a intolleranza al lattosio (Scrimshaw e Murray, 1988). In effetti, le persone con intolleranza al lattosio percepita non presentano i caratteri della maldigestione (Jellema *et al*, 2010); alcuni ricercatori (Suarez *et al*, 1995) hanno verificato che la percezione di disturbi gastrointestinali dopo il consumo di piccole quantità di latte è da attribuire a cause diverse dall’intolleranza al lattosio, come la sindrome del colon irritabile (Vernia *et al*, 1995), le enteriti (Swagerty *et al*, 2002), la celiachia (Jankowiak e Ludwig, 2008). In effetti, i soggetti che si autoqualificano intolleranti al lattosio si dimostrano di poter tollerare il consumo di un bicchiere di latte senza avvertire alcun sintomo di intolleranza (Suarez *et al*, 1995). Un recentissimo studio italiano sull’argomento (Tomba *et al*, 2012) arriva ad affermare che i sintomi dell’intolleranza al lattosio riportati da alcuni soggetti dopo aver assunto 15 g dello zucchero non erano dovuti alla mal digestione, ma piuttosto a una tendenza alla somatizzazione. Quanto fin qui riassunto porta ad ammettere che l’intolleranza al lattosio sia molto individuale e influenzata da fattori fisiologici e psicologici (McBean e Miller, 1998). In proposito, si è constatato che l’intolleranza al lattosio percepita è il più rilevante fattore correlato alla riduzione dei consumi di latte (Klesges *et al*, 1999).

## 2.3 L’intolleranza al lattosio del celiaco

Nella malattia celiaca i segni clinici dell’intolleranza al lattosio sono stati frequentemente riportati in soggetti considerati insensibili a una dieta senza glutine (Lefter *et al*, 2007). La celiachia e la lattasi non persistente sono, infatti, due malattie genetiche che interessano la stessa mucosa dell’intestino tenue. La possibile conseguenza della coesistenza di queste due malattie è che i sintomi della carenza da lattasi associati alla celiachia possono essere fonte di errore per la scarsa aderenza ad una dieta senza glutine. Per contro, la mancata assunzione di latte da parte del soggetto celiaco già negativamente influenzato dalla dieta può comportare altri problemi.

## 3. LE POSSIBILI CAUSE DEI SINTOMI GASTROENTERICI DELLA MALDIGESTIONE DEL LATTOSIO

Come già anticipato, quando la lattasi prodotta è insufficiente, la porzione di lattosio non digerito raggiunge il colon (Fig. 7), dove è prima trasformato in glucosio e poi fermentato dalla flora microbica intestinale con produzione di acidi grassi a catena lineare corta (acetico,

propionico, butirrico) e gas (idrogeno, metano) solo nel 15% dei soggetti (Romagnuolo *et al*, 2012) e anidride carbonica (He *et al*, 2006).

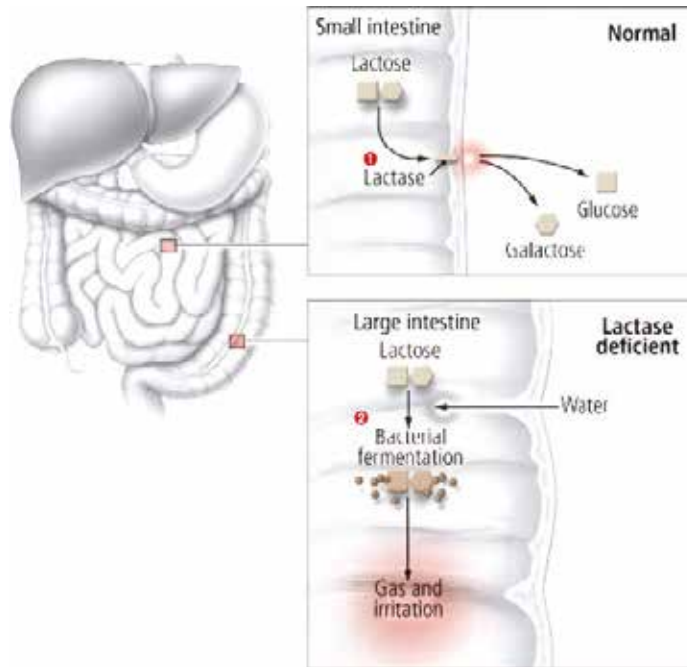


Figura 7 - Aree di idrolisi del lattosio e relativo destino

Il lattosio che arriva nel colon ha due effetti fisiologici (Ingram *et al*, 2009): l'aumento della pressione osmotica richiama elettroliti e acqua nel lume intestinale, causando un rapido aumento del tempo di transito e di conseguenza diarrea (Christopher e Bayless, 1971; Heyman, 2006); la eccessiva produzione di gas durante la fermentazione del lattosio da parte della flora intestinale può causare dolore addominale, distensione, flatulenza e crampi, aumentando il tempo di transito e la pressione all'interno del colon (He *et al*, 2006). I sintomi, in genere, si presentano dopo 30 minuti / 2 ore dal consumo dell'alimento contenente lattosio (Rusnyk e Still, 2001).

In teoria, la quantità di  $H_2$  che la flora intestinale può produrre a partire da 50 g di lattosio è <17L (Levitt *et al*, 1995); si tratta di un volume che dovrebbe causare più importanti sintomi di quelli generalmente lamentati dai soggetti, se non fosse perché la maggior parte del gas è consumata da altri batteri intestinali. Sorprendentemente, i soggetti che si lamentano per l'eccessiva presenza di gas intestinali hanno lo stesso grado di maldigestione del lattosio e la stessa produzione di gas dei soggetti che non lamentano il disturbo, anche se i primi presentano una motilità intestinale alterata e una aumentata risposta al dolore a seguito della distensione intestinale (Lasser *et al*, 1975; Hammer *et al*, 1996). La digestione del lattosio nell'intestino tenue da parte dei microrganismi sembra, però, non essere il solo fattore che influenza l'intolleranza al lattosio. Per esempio, i maldigestori del lattosio con simile tempo di transito oro-cecale e grado di digestione del lattosio manifestano sintomi di diversa gravità (Vonk *et al*, 2003). La fermentazione microbica può aggravare o ridurre i sintomi dell'intolleranza e

questo dipende dal *balance* tra la capacità di fermentare il lattosio e quella di rimuovere i metaboliti che da questa fermentazione originano (He *et al*, 2008). Risulta, comunque, il fatto che la maldigestione del lattosio causa in maniera significativa più sintomi nelle donne che negli uomini (Rao *et al*, 1994; Krause *et al*, 1996).

#### 4. RICONOSCIMENTO DEI SOGGETTI INTOLLERANTI E MALDIGESTORI DEL LATTOSIO

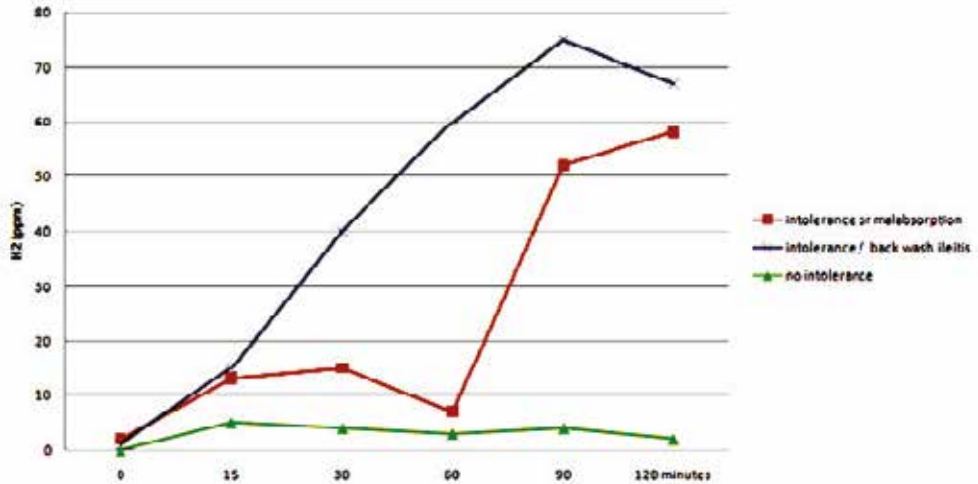
Come già sopra riportato, il termine intolleranza al lattosio sta a indicare che il lattosio maldigerito causa sintomi intestinali. Mentre la carenza di lattasi e la maldigestione del lattosio possono essere oggettivamente verificati, la dimostrazione dell'intolleranza al disaccaride si basa sulla autodichiarazione dei sintomi da parte del paziente dopo aver consumato lattosio. Si tratta di sintomi abbastanza comuni che si possono presentare anche quando non è assunto lattosio e sono molto influenzabili dall'effetto *placebo* (Wampold *et al*, 2007). I sintomi gastrointestinali che alcuni soggetti avvertono dopo il consumo di latte possono, pertanto, essere fuorvianti, perché possono portare a formulare una errata diagnosi di intolleranza al lattosio anche in soggetti perfettamente in grado di digerire lo zucchero (Moore, 2003).

Ciò premesso, la maldigestione del lattosio nei soggetti adulti e, quindi la carenza di lattasi, può essere riconosciuta con metodi diagnostici, in genere, non invasivi e sicuri (Arola, 1994; Shaw e Davis, 1999; Nilsson *et al*, 2004; Rasinperä *et al*, 2004). Tradizionalmente si utilizza il cosiddetto "test di tolleranza al lattosio" (*Lactose tolerance test*, LTT) un test che prevede la misurazione del glucosio nel sangue.

Oggi più frequentemente è utilizzata, invece, la misurazione dell'idrogeno espirato (*Lactose hydrogen breath test*, LHBT); tale test è il meno invasivo di tutti i test in uso ed è considerato da molti studiosi il *gold standard* (Levitt e Donaldson, 1971; Casellas *et al*, 2009; Gasbarrini *et al*, 2009).



Quest'ultimo test si basa sul fatto che il prodotto finale del metabolismo batterico del lattosio passa attraverso la mucosa intestinale nel sangue venoso ed è trasportato, dopo esser passato per il fegato, agli alveoli dei polmoni da dove è espirato (Arola, 1994). I due test prevedono la misurazione del glucosio o del H<sub>2</sub> in un soggetto al quale è somministrata una quantità di lattosio (50 o 25 g) dopo una notte a digiuno. Il valore di glucosio nel sangue o di H<sub>2</sub> espirato è misurato prima della somministrazione del lattosio (tempo zero) e, poi, a definiti intervalli (la prova dura complessivamente dalle 3 alle 6 ore). L'aumento del glucosio nel sangue indica la digestione del lattosio (il glucosio prodotto nell'intestino tenue dall'idrolisi del lattosio è assorbito nel torrente sanguigno), mentre il mancato aumento o una *flat line* (<20 ppm) indica il fenotipo maldigestore. Un aumento di H<sub>2</sub> espirato indica, invece, la maldigestione del lattosio e testimonia la fermentazione che lo zucchero ha subito a causa della flora microbica del colon con produzione oltre che di H<sub>2</sub>, di CO<sub>2</sub> e, in alcuni soggetti, CH<sub>4</sub> (Hodve e Farup, 2009). In entrambi i casi sono utilizzati dei *cut-off*, stabiliti in maniera arbitraria, per distinguere i due fenotipi, lattasi persistente / lattasi non persistente; va tenuto presente che entrambi questi metodi forniscono indicazioni sulla abilità del soggetto in esame di digerire il lattosio piuttosto che fornire indicazioni sulla sua capacità di esprimere la lattasi.



da [www.food-intolerance-network.com](http://www.food-intolerance-network.com)

Un *test* più diretto, ma anche più invasivo, prevede, invece, il prelievo biotico di tessuto dal digiuno e l'uso di questo materiale per misurare l'attività enzimatica della lattasi (Lau-niala *et al*, 1966; Kuokkanen *et al*, 2006); i risultati, tuttavia, possono essere influenzati dalla disomogenea distribuzione dell'enzima nell'intestino tenue. Infine, in questi ultimi anni sono stati messi a punto *test* genetici per rilevare il polimorfismo -13910 C/T, come pure quelli evidenziati successivamente, per rilevare l'ipolattasia (Stolba *et al*, 2005; Bodlaj *et al*, 2006; Bernardes-Silva *et al*, 2007; Nilsson *et al*, 2008).

Il *Quick Lactase Test* BIOHIT (Helsinki, Finland) è basato su una biopsia per la diagnosi di ipolattasia duodenale in endoscopia gastrointestinale superiore (Kuokkanen M. *e Coll.*, 2006). Il campione, incubato per 20 minuti in piastra con lattosio, sviluppa in caso di idrolisi dello zucchero (=presenza dell'enzima lattasi), un colore giallo, mentre negli individui intolleranti questo non si verifica.



Il *test* genetico è effettuato sul sangue o sulla saliva; è rapido, relativamente facile da eseguire e altamente specifico per il gene della lattasi. Esso permette di differenziare i pazienti con ipolattasia primaria da quelli affetti dalla forma secondaria. Per chiudere sulla questione diagnostica, si fa presente che c'è un grande accordo tra il *test* genetico e il *breath test* per diagnosticare la maldigestione del lattosio nelle popolazioni europee (Hogenauer *et al*, 2005; Krawczyk *et al*, 2008; Pohl *et al*, 2010).

## 5. LA QUANTITÀ DI LATTOSIO CAPACE DI SCATENARE I SINTOMI DELL'INTOLLERANZA

Oggi giorno pur avendo a disposizione gli strumenti con cui distinguere i tolleranti dagli intolleranti al lattosio, non siamo ancora in grado di indicare con ragionevole precisione se e quale crescente quantità di lattosio potrà causare a una persona sintomi via via sempre più gravi dopo il suo consumo. In effetti, come più volte riportato nelle sezioni che precedono, la gravità dei sintomi non è influenzata solo dalla mal digestione, ma anche da altri fattori.

I ricercatori che hanno sperimentalmente cercato di valutare quale potesse essere la dose minima di lattosio in grado di provocare maldigestione e i relativi sintomi clinici hanno effettuato tale valutazione in presenza di altri fattori (quali la co-assunzione di alimenti solidi, il tempo necessario per lo svuotamento gastrico, il tempo del transito nell'intestino tenue, il frazionamento della quantità da assumere nella giornata, la co-assunzione di alimenti contenenti microrganismi probiotici, la composizione della flora del colon, l'assunzione di latte crudo, etc) perché era stato affermato o ipotizzato che uno o più di essi potesse ridurre o eliminare i sintomi e, quindi, che i maldigestori non dovessero eliminare gli alimenti con lattosio dalla dieta.

Molti di questi studi, però, risentono di numerosi limiti metodologici e l'uso dei risultati risulta, pertanto, limitato. In effetti, quando i membri dell'EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) hanno dovuto elaborare lo "Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia" (EFSA, 2010), su invito della Commissione per la revisione della direttiva 2009/39/CE sui prodotti alimentari destinati a un'alimentazione particolare, hanno dovuto prendere atto che ci sono veramente pochissimi studi *dose escalation* controllati in soggetti maldigestori o intolleranti al lattosio. In particolare, gli studi prospettici non tenevano in debita considerazione la presenza o meno del polimorfismo della lattasi nei soggetti intolleranti al lattosio; inoltre, gli studi clinici evidenziavano una considerevole riposta al *placebo* dei soggetti in esame; e infine, data la difficoltà a nascondere la presenza e il sapore di prodotti contenenti lattosio, gli autori di molti studi non dichiaravano se erano riusciti o meno a mascherarne la presenza ai soggetti coinvolti.

Tra i lavori presi in considerazione dall'EFSA Panel NDA, c'è stato quello di un gruppo di ricercatori (Wilt *et al*, 2010) del Minnesota Evidence-Based Practice Centers (EPCs), dell'Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ), che ha revisionato sistematicamente per conto dell'Office of Medical Applications of Research (OMAR) del National Institutes of Health (NIH), USA, gli elementi di prova su varie condizioni dell'intolleranza al lattosio, tra cui la dose tollerabile dai soggetti clinicamente diagnosticati intolleranti (con *test* di prova).

A questo scopo i ricercatori americani hanno selezionato, tra tutti i lavori pubblicati in inglese dal 1967 al 2009, 28 studi randomizzati *cross-over*, in base a una serie di criteri. I seguenti dati caratterizzavano gli studi scelti: 1) La maldigestione del lattosio era stata diagnosticata in 25 studi (13 con il LHBT, 11 con il LTT, 1 con la misura dell'escrezione del galattosio nelle urine), mentre nei rimanenti non era fornita alcuna indicazione; 2) la maggior parte degli studi erano stati effettuati in doppio cieco, mentre 3 in cieco o senza tentare di nascondere ai soggetti il sapore delle preparazioni da esaminare; 3) nella maggior parte degli studi erano stati utilizzati meno di 30 soggetti e il numero dei soggetti arruolati oscillava tra le 6 e le 150 unità, con età compresa tra i 10 e i 77 anni; 4) in prevalenza era stata utilizzata un'unica concentrazione di lattosio e un controllo "senza lattosio", somministrato con acqua o latte senza alimenti. L'EFSA Panel (NDA), sulla base dei risultati della rassegna, è pervenuto alla seguente considerazione: sebbene siano stati descritti in alcuni soggetti sintomi di intolleranza al lattosio dopo l'assunzione di meno di 6 g, la maggior parte degli individui, cui è stata diagnosticata l'intolleranza o la maldigestione, può tollerare 12 g di lattosio con unica assunzione (soprattutto se assunto con altri alimenti) senza avere sintomi clinici o manife-

standone solo quelli meno gravi e in modesta entità; inoltre, secondo alcune evidenze, molti maldigestori del lattosio possono tollerare dosi più alte, comprese tra 20 e 24 g, purché assunte nell'arco di un'intera giornata e, comunque, sempre insieme con altri nutrienti. L'EFSA Panel NDA, però, conclude che non è possibile stabilire un'unica soglia di lattosio per tutti gli intolleranti data la grande variabilità della tolleranza individuale.

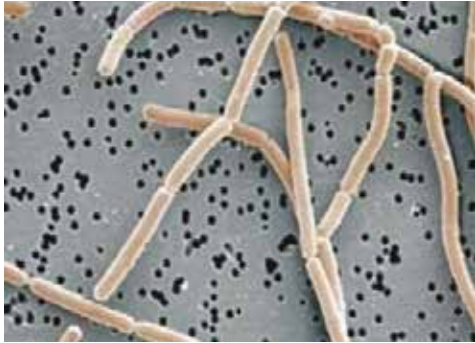
## 6. COME EVITARE I SINTOMI DELL'INTOLLERANZA AL LATTOSIO

Nel corso degli anni, sono state proposte diverse strategie per ridurre o evitare i fastidiosi sintomi gastrointestinali associati all'intolleranza al lattosio; esse prevedono il ricorso a soluzioni di natura prettamente dietetico-nutrizionali (consumo di alimenti "senza lattosio" o a ridotto contenuto, Suarez *et al*, 1995; consumo di prodotti lattiero caseari fermentati, Kolars *et al*, 1984; Brown-Esters *et al*, 2012; consumo di lattosio all'interno di un pasto, Martini e Savaiano, 1988; consumo di probiotici, Vesa *et al*, 1996a; consumo di latte crudo, Mummah *et al*, 2014) o il ricorso a soluzioni di natura clinico-farmacologiche (assunzione di compresse/granulati/capsule a base di o con lattasi, Onwulata *et al*, 1989; adattamento del microbioma del colon a dosi crescenti di lattosio, Hertzler e Savaiano, 1996; Brown-Esters *et al*, 2012; ricorso ad approcci psicologici e comportamentali, Casellas *et al*, 2010; assunzione di antibiotici, Cappello e Marzio, 2005).

Sulla validità di queste strategie, appare molto interessante la revisione sistematica della letteratura preparata dallo stesso gruppo (Shaukat *et al*, 2010) del citato *Minnesota Evidence-Based Practice Centers (EPCs)* per conto della *Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD)* e del *Office of Medical Applications of Research of the National Institutes of Health (NIH)* nell'ambito della stessa *Consensus Development Conference on Lactose Intolerance and Health*. Tra gli obiettivi dello studio c'era proprio quello di verificare quali strategie fossero efficaci nella gestione delle persone alle quali è stata diagnosticata intolleranza al lattosio, nel caso desiderassero consumare quantità di lattosio maggiori di quelle tollerate. Anche in questo caso sono stati raccolti i dati di letteratura pubblicati in inglese dal 1967 al 2009 e da questi, attraverso il lavoro di selezione di 3 indipendenti ricercatori, sono stati considerati e valutati 26 studi per verificare, in particolare, l'utilità dell'uso di: a) integratori a base di lattasi o di latte contenente lattosio idrolizzato o di latte a ridotto contenuto di lattosio; b) probiotici; c) adattamento della flora del colon; d) uso degli antibiotici. Gli elementi di contesto più rilevati erano: 1) l'età media 37 anni dei soggetti arruolati negli studi; 2) il 40% dei soggetti partecipanti agli studi era di razza bianca; 3) l'uso di integratori di lattasi o latte con lattosio idrolizzato (*range* lattosio 0-2 g) in 19 studi, quelli in cui il lattosio era stato rimosso per ultrafiltrazione o cromatografia erano 2, infine le soluzioni prive di lattosio erano 5; 4) la diagnosi di maldigestione del lattosio era stata fatta in 11 studi utilizzando il LHBT e in 13 con il LTT; 5) le dosi di lattosio utilizzate in 18 studi, in cui i soggetti arruolati presentavano i sintomi compatibili con l'intolleranza al lattosio, erano maggiori di 12 g; 6) il lattosio era consumato tutto in una volta tranne che in 6 studi in cui il lattosio è stato dato in maniera frazionata nell'arco della giornata.

I risultati, nel complesso, secondo i ricercatori dell'EPCs, hanno fornito insufficiente evidenza che il consumo di lattasi o di latte a ridotto contenuto di lattosio possa essere efficace nel ridurre i sintomi dell'intolleranza al lattosio rispetto a quanto rilevabile nei soggetti di controllo. Per quanto concerne invece l'uso di probiotici, il gruppo di valutatori EPCs ha esaminato e valutato prove sperimentali randomizzate *cross-over* (6 prove) e a gruppi paralleli (1 prova) nelle quali erano presenti i seguenti elementi di contesto: 1) il numero di soggetti arruolati negli studi era piccolo (9-28 persone); 2) quattro prove hanno valutato le seguenti specie, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. longum* addizionate al latte prima che fosse consu-

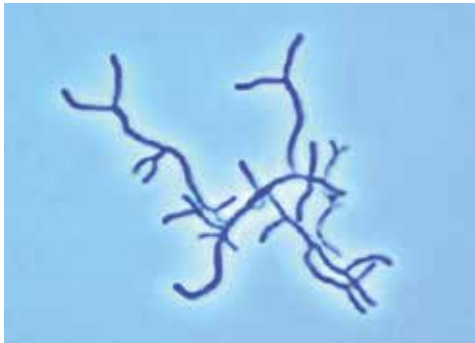
mato, 3 prove, invece, hanno utilizzato yoghurt; 3) la diagnosi di maldigestione del lattosio è stata fatta sulla base dei risultati con il LHBT. Le conclusioni del gruppo di esaminatori EPCs sono state che non c'è una sufficiente evidenza per stabilire l'efficacia dello yoghurt o dei probiotici nel migliorare/alleviare i sintomi dell'intolleranza.



*Lactobacillus delbrueckii*



*Streptococcus thermophilus*



*Bifidobacterium longum*



*Lactobacillus acidophilus*

Sulla questione l'EFSA Panel NDA è di ben altro avviso: dopo aver considerato 13 su 14 studi sull'uomo, ha riconosciuto una relazione causa/effetto tra l'assunzione di culture vive di *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* nello yoghurt e il miglioramento nella digestione del lattosio nei soggetti maldigestori (EFSA, 2010a); per inciso, il Panel afferma anche che, per poter vantare in etichetta il relativo *claim*, è necessario che lo yoghurt contenga non meno di  $10^8$  UFC per porzione. È stato, altresì, valutato dall'EPCs l'adattamento del microbioma del colon a dosi crescenti di lattosio. Anche in questo caso i ricercatori dell' *Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ) hanno trovato insufficiente evidenza sulla possibilità che questa possa alleviare i sintomi dell'intolleranza; analoga conclusione è stata fatta dagli stessi ricercatori anche sui possibili benefici derivanti dall'uso degli antibiotici (nel caso di specie la rifaximina).

### **6.1 Adattamento del microbioma del colon al lattosio**

Del tutto recentemente è stata riproposta (Szilagyi, 2015) la teoria dell'adattamento al lattosio per i soggetti LNP (lattosio non persistenti). Si sostiene che il regolare consumo di prodotti lattiero-caseari da parte di soggetti LNP può portare ad un adattamento del microbioma



del colon; questa teoria si basa sull'osservazione clinica dell'evidente miglioramento, dopo la iniziale comparsa di sintomi, registrato nei soggetti a seguito del prolungato consumo di prodotti lattiero-caseari per 4-6 settimane. Il risultato viene attribuito al ruolo "prebiotico" del lattosio che favorirebbe la proliferazione della flora acidofila non gasogena. Nella *review* di Szilagy citata vengono riportati alcuni lavori sperimentali a sostegno della teoria dell'adattamento.

## 7. TECNOLOGIE DI PRODUZIONE DI LATTE E DERIVATI DELATTOSATI

Non si è lontani dal vero affermando che gli studi sulla degradazione del lattosio, interessanti per l'applicazione industriale, si possano far risalire alla fine degli anni '60. La forte crescita della produzione di prodotti lattiero-caseari (*in primis* formaggio) fece diventare impellente lo smaltimento del siero di latte (Marwaha e Kennedy, 1988) e, conseguentemente, la ricerca di nuove alternative a quelle note (Whittier, 1925; Richmond *et al*, 1981) per l'utilizzazione del siero di latte e, soprattutto, del suo principale costituente, il lattosio. Fu grazie alla spinta propulsiva di un gruppo di esperti della *International Dairy Federation* (IDF 1993) verso la fine degli anni '70 se il problema dell'idrolisi del lattosio favorì l'avvio di progetti di ricerca nei Paesi industrializzati per trovare soluzioni idonee a una concreta applicazione industriale. Diversi approcci furono sperimentati e proposti per una loro possibile applicazione industriale (Tabella 3), ma due procedure sono state quelle alle quali i trasformatori hanno fatto ricorso: 1. la degradazione del lattosio con enzimi "liberi" (solubili nel latte) o, più raramente, con enzimi immobilizzati; 2. la separazione dello zucchero mediante cromatografia o filtrazione.

**Tabella 3 - Metodi per l'idrolisi del lattosio applicabili industrialmente**

| <b>Processo</b>                       | <b>Principio</b>  |
|---------------------------------------|---|
| <b>Idrolisi acida</b>                 | Esposizione a condizioni estremamente acide (pH < 1,5) e a T° molto alte (fino a 150°C) per tempi brevi     |
| <b>Enzima immobilizzato</b>           | La lattasi vien immobilizzata su opportuni <i>carrier</i>   |
| <b>Reattori enzimatici a membrana</b> | Gli enzimi solubili vengono separati mediante ultrafiltrazione e recuperati                                 |
| <b>Enzimi purificati in soluzione</b> | L'enzima viene disperso nella preparazione finale   |
| <b>Estratti cellulari crudi</b>       | Omogenati di colture di cellule microbiche produttrici di lattasi vengono utilizzate come fonte dell'enzima |

L'idrolisi enzimatica con  $\beta$ -galattosidasi microbica per rompere il legame  $\beta$  1-4 glicosidico del lattosio ha avuto inizio sin dagli anni '70, quando l'enzima fu messo in commercio per la prima volta dalla olandese Gist-Brocades. Da allora, diverse altre ditte, specializzate nella produzione/commercializzazione degli enzimi (Biocatalysts, Novozymes, DSM, Dupont-Danisco, Chr. Hansen), hanno immesso sul mercato a partire dagli anni '90 una ampia gamma di lattasi, diverse per origine e caratteristiche.

## Esempi di produzioni industriali di lattasi in Europa



Da sinistra e dall'alto: la sede della **Biocatalyst Ltd**, Cardiff, GB; fermentatori alla **Novozymes A/S**, Bagsvaerd, DK; una pubblicità della **DSM**, Delft, NL; la sede storica **Dupont-Danisco**, Copenhagen, DK; il fondatore (1874) della **Chr. Hansen**, Hoersholm, DK.

Il processo di idrolisi enzimatica è relativamente semplice e non richiede particolari attrezzature; occorre, tuttavia, tener presenti alcuni elementi nel caso in cui si usino enzimi monouso (enzima disperso nel prodotto), in particolare la concentrazione del substrato, il pH al quale svolgere la lavorazione, la temperatura massima utilizzata per il processo, il tempo impiegato per realizzare l'idrolisi, l'attività dell'enzima e i costi di produzione. L'influenza di questi elementi può essere ridotta aggiungendo la lattasi ai prodotti da trattare e adottando tempi di sosta a 35-45°C piuttosto lunghi; nel caso del latte, però, questo accorgimento può comportare problemi perché favorirà una importante crescita microbica. Così, in questo caso, è raccomandabile far sostare il prodotto, addizionato dell'enzima, a temperatura di refrigerazione per una notte (Harju *et al*, 2012). Se si aggiunge lattasi, sterilizzata per filtrazione, al latte UHT, la quantità di enzima necessaria a ottenere l'idrolisi è l'1% di quella necessaria se l'enzima fosse addizionato al latte da sterilizzare. Infatti, con questo accorgimento l'enzima può svolgere la sua funzione operando la completa degradazione del lattosio dall'inizio della *shelf-life* entro alcuni giorni prima di immetterlo in commercio. È opportuno aggiungere la lattasi dopo il trattamento termico del latte per evitare la indesiderata comparsa dei prodotti della reazione di Maillard (Harju *et al*, 2012). Con l'idrolisi del lattosio, per effetto della liberazione del glucosio, il prodotto è indubbiamente un po' più dolce; nel caso del latte, si può evitare che il sapore dolce sia eccessivo limitando l'idrolisi del lattosio all'80-90%. Per meglio comprendere l'entità di questa caratteristica sensoriale, può essere utile sapere che l'idrolisi del lattosio al 70% provoca la comparsa di un sapore dolce pari a quello che si percepisce assaggiando un latte addizionato di circa il 2% di saccarosio (Zadow, 1986).

Un contributo alla necessità di riduzione dei costi di produzione per l'idrolizzare il lattosio è arrivato quando furono introdotti i sistemi enzimatici immobilizzati. Immobilizzare un enzima significa legare la molecola a un supporto solido in maniera più o meno "forte". Gli enzimi

immobilizzati, pertanto, sono enzimi il cui movimento nello spazio è limitato completamente o relativamente ad una piccola regione pur mantenendo le loro attività catalitiche e la possibilità di un uso ripetuto in continuo. Questa immobilizzazione può essere ottenuta sviluppando dei legami di tipo covalente enzima-solido oppure sfruttando determinate interazioni di tipo fisico (1. legame dell'enzima a *carriers* mediante adsorbimento a un supporto minerale o organico o mediante legame covalente, anche in questo caso, a un supporto minerale o organico; 2. inclusione o microincapsulazione). Con l'immobilizzazione, la vita utile dell'enzima (la principale voce degli alti costi) non è più limitata alle pochissime ore di un ciclo di lavorazione come nel caso degli enzimi solubili, che rimangono nel prodotto e non sono recuperati, ma passa ad alcune migliaia di ore, dato che l'enzima può essere riutilizzato con evidenti abbattimenti dei costi associati alla loro produzione e purificazione (Tananaka e Kavamoto, 1999; Husain, 2010).

Nei sistemi enzimatici immobilizzati, si utilizzano di preferenza enzimi di origine fungina che hanno un pH ottimale compreso tra 3.5 e 5; poiché questo tipo di lattasi mantiene circa il 50% della sua attività quando lavora a pH 6.8, il suo impiego nel latte è stato considerato economicamente accettabile. Le prime applicazioni industriali della  $\beta$ -galattosidasi nell'industria alimentare, avviate negli anni '70, si devono alla SnamProgetti e alla giapponese Sumitomo Chemicals (Gekas e Lopez-Leiva, 1985). La ditta giapponese utilizzava una  $\beta$ -galattosidasi da *Aspergillus oryzae* molto purificata, legata covalentemente a una resina per scambio ionico macroporosa anfotera del polimero fenolo-formaldeide. La soluzione tecnologica messa a punto dalla SnamProgetti, invece, utilizzava la lattasi da *Kluiveromyces fragilis*, intrappolata su fibre di triacetato di cellulosa ottenute mediante filatura a umido.

### *Protagonisti europei nelle ricerche sul latte delattosato*



Da sinistra e dall'alto: la sede della **SnamProgetti** a Basingstoke (Inghilterra); lo stabilimento **Gist-Brocades** a Delft (Olanda); gli uffici della **Valio** a Seinäjoki, Finlandia; immagine storica della **Centrale del Latte di Milano**.

In Europa, la sola applicazione commerciale della tecnologia SnamProgetti per produrre latte delattosato fu possibile in Italia grazie a una felice collaborazione tra la SnamProgetti e la Centrale del Latte di Milano diretta dal professor Livio Leali (Pastore *et al*, 1974) e in Olanda tra la SnamProgetti e la Gist-Brocades. Il processo prevedeva un trattamento a pH neutro per produrre latte UHT delattosato. Nei lotti sperimentali preparati c'era un abbattimento della concentrazione del lattosio del 75%.

Nello stesso periodo un'altra impresa, la finlandese Valio, avviava la produzione di prodotti lattiero-caseari delattosati, in primo luogo latte in polvere e, poi, latte liquido e tutta una serie di prodotti lattiero-caseari, con la tecnica dell'enzima immobilizzato, impiegando come *carrier* una speciale resina e l'enzima accoppiato al reagente *cross-linked* alla glutaraldeide (Harju, 1987).

Una applicazione industriale di grande successo è stata messa a punto alla fine degli anni '80 sempre dalla Valio, uno dei gruppi industriali più impegnati nello studio di soluzioni innovative per l'idrolisi del lattosio; il processo prevedeva la rimozione di una parte del lattosio mediante cromatografia seguita da idrolisi del lattosio rimanente mediante trattamento con la lattasi dispersa nel latte (Jelen e Tossavainen, 2003; Harju, 2004). Il prodotto che ne risultava presentava una concentrazione residua di lattosio <0,01% e un sapore quasi completamente sovrapponibile a quello del prodotto di partenza. Una variante più avanzata di questo sistema prevede, invece, la parziale riduzione del lattosio mediante un processo di filtrazione (ultrafiltrazione, nanofiltrazione) combinata al trattamento enzimatico; anche in questo caso il prodotto finale presenta una bassissima concentrazione di lattosio e un sapore prossimo al latte di partenza (Harju *et al*, 2012).

### 7.1 Le $\beta$ -galattosidasi di impiego industriale: aspetti normativi



*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*



*Pyrococcus furiosus*



*Bifidobacterium bifidum*

Le lattasi correntemente utilizzate dall'industria per l'idrolisi enzimatica del lattosio sono delle  $\beta$ -galattosidasi appartenenti alla famiglia delle glucosidi idrolasi 2 (GH2) e delle glicosidi idrolasi 35 (GH35). Gli enzimi della famiglia GH2 sono soprattutto isolati da microrganismi (batteri, lieviti e muffe), mentre quelli della famiglia GH35 dalle piante (in particolare, mandorle, albicocche, pesche, fragole, avocado, mele, Richmond *et al* 1981; Pritzwald-Stegman, 1986; Husain, 2010). Le lattasi più largamente utilizzate dalla industria lattiero-casearia sono quelle prodotte da funghi (genere *Aspergillus*) e da lieviti (genere *Kluyveromyces*). Quelle di origine fungina hanno l'*optimum* di pH in ambiente acido (2.2- 5.0) e, pertanto, sono particolarmente indicate per l'idrolisi del lattosio in matrici alimentari acide; si tratta di enzimi termostabili ma sensibili all'azione inibente del galattosio. Quelle di origine batterica sono state largamente utilizzate per l'elevata attività e stabilità; tuttavia, hanno suscitato riserve per possibili problemi legati alla sicurezza d'uso del ceppo produttore; non così nel caso

di quelle da batteri lattici, oggi qualificati QPS dall'EFSA. Grande interesse hanno suscitato le lattasi isolate da alcuni Bifidobatteri (Hsu *et al*, 2005) o quelle termostabili identificate in *Bacillus stearothermophilus* (Chen *et al*, 2008), *Pyrococcus furiosus* (Kengen *et al*, 1993) e *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Park e Oh, 2010). Le lattasi isolate dai lieviti, invece, presentano un *optimum* di attività nel *range* di pH 6.0-7.0; quella da *Kluyveromyces lactis* è senz'altro considerata la più importante. Si tratta di un enzima che per la sua elevata attività è stato ampiamente utilizzato per la produzione di latte "senza lattosio". Nella Tabella 4 sono schematicamente riportate le lattasi microbiche di maggior interesse industriale e le relative proprietà (Harju, 2012).

**Tabella 4 - Lattasi microbiche**

| Origine                      | Peso molecolare | pH ottimale | Temperatura range (°C) | Attivatori     | Inibitori ionici |
|------------------------------|-----------------|-------------|------------------------|----------------|------------------|
| <i>Aspergillus niger</i>     | 124.000         | 3.0-4.0     | 55-60                  | Non necessario | Nessuno          |
| <i>A. oryzae</i>             | 90.000          | 5.0-6.2     | 50-55                  | Non necessario | Nessuno          |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>  | 228.000         | 6.5-7.3     | 35                     | K, Mg, Mn      | Ca, Na           |
| <i>K. fragilis</i>           | 201.000         | 6.6         | 37                     | K, Mg, Mn      | Ca, Na           |
| <i>Bacillus circulans</i>    | 240.000         | 6.0         | 60                     | Non necessario | non disponibile  |
| <i>B. subtilis</i>           | 88.000          | 6.5-7.0     | 50                     | Non necessario | non disponibile  |
| <i>B. stearothermophilus</i> | 116.000         | 5.8-6.4     | 65                     | Mg             | non disponibile  |
| <i>E. coli</i>               | 464.000         | 7.2         | 40                     | Na, K, Mg      | non disponibile  |
| <i>L. acidophilus</i>        | 540.000         | 6.2-6.6     | 55                     | Mg             | non disponibile  |
| <i>S. thermophilus</i>       | 464.000         | 7.1         | 55                     | Na, K, Mg      | Ca               |

Gli enzimi possono essere industrialmente utilizzati nei prodotti alimentari, destinati al consumo umano, solo se tecnologicamente giustificati, ma soprattutto se ne è stata valutata dall'autorità competente l'innocuità. Così le lattasi utilizzate o utilizzabili dalle industrie lattiero-casearie devono essere conformi al regolamento (CE) 1332/2008 che specificatamente disciplina l'impiego degli enzimi negli alimenti per svolgere una funzione tecnologica nelle fasi di fabbricazione e trasformazione. La procedura autorizzativa da seguire è specificata nel Regolamento (CE)1331/2008 (attuato secondo quanto stabilito nel Regolamento (UE)234/2011 e dal suo aggiornamento (Regolamento UE 526/2012). Essa prevede la sottomissione della documentazione dagli interessati all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) per il parere di competenza. Tutte le molecole enzimatiche di cui è stata autorizzata la immissione sul mercato, come indica la normativa, saranno riportate in uno specifico elenco, aggiornato dalla Commissione, contenente tra l'altro informazioni sulla funzione, origine, criteri di purezza. La costituzione di questo elenco da parte della Commissione europea, però, avverrà in un'unica fase, dopo che l'EFSA avrà trasmesso i suoi pareri che si riferiscono a tutte le domande di autorizzazione di enzimi alimentari pervenute entro il 2015. La valutazione del rischio degli enzimi alimentari è stata affidata al gruppo di esperti scientifici dell'EFSA sui materiali a contatto con gli alimenti, gli enzimi, gli aromatizzanti e i coadiuvanti tecnologici (CEF). Il gruppo CEF, per questo scopo, ha pubblicato una guida destinata ai richiedenti che illustra le prescrizioni riguardanti i dati necessari a consentire la valutazione della sicurezza degli stessi (EFSA, 2009). Il documento, accompagnato da note esplicative, specifica il tipo di informazioni e studi che l'interessato deve fornire; in particolare, la descrizione della composizione chimica, delle proprietà, degli usi, delle concentrazioni di impiego e i *test* tossicologici.



## 8. LA COMMERCIALIZZAZIONE DEI PRODOTTI LATTIERO CASEARI DELATTOSATI: NORME DI RIFERIMENTO

Attualmente la commercializzazione del latte trattato per ridurre il contenuto di lattosio e renderlo quindi idoneo al consumo dei maldigestori è assoggettata al Dlgs 111/1992 emanato per il recepimento della direttiva 89/398/CEE (poi sostituita con la direttiva di rifusione 2009/39/CE), relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti i prodotti alimentari destinati a un'alimentazione particolare.

In virtù di questa norma, possono essere commercializzati quei prodotti realizzati per rispondere a particolari esigenze nutrizionali di individui, tra cui quelli con turbe del metabolismo o comunque che si trovano in condizioni fisiologiche particolari (nel nostro caso i maldigestori del lattosio), che pertanto possono trarre benefici dalla loro assunzione. Si tratta, dunque, di prodotti che per il loro particolare processo di fabbricazione sono adatti a soddisfare un obiettivo nutrizionale particolare (nel caso dei prodotti delattosati, la prevenzione dei sintomi dell'intolleranza al lattosio nei soggetti che non si vogliono privare dell'assunzione di latte e derivati) nettamente distinti dagli alimenti di uso corrente. In base alle norme vigenti, però, gli impianti adibiti alla produzione di tali alimenti devono essere preventivamente autorizzati (art 6, comma 3 lettera a) del regolamento 852/2004). All'autorizzazione, in forma di riconoscimento, provvedono le Regioni in virtù del decreto-legge 158/2012, recante "Disposizioni urgenti per promuovere lo sviluppo del Paese mediante un più alto livello di tutela della salute", convertito con la Legge 189/2012.

Il riconoscimento dell'impianto prevede il preventivo accertamento della sussistenza delle condizioni igienico-sanitarie e dei requisiti tecnici previsti dai Regolamenti (CE) 852/2004 e (CE) 853/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari, dal D.M. 23 febbraio 2006 "Requisiti tecnici e criteri generali per l'abilitazione alla produzione e al confezionamento di integratori alimentari, nonché della disponibilità di un idoneo laboratorio per il controllo dei prodotti" ai sensi dell'art. 10 del decreto legislativo 111/92.

Inoltre, quando un prodotto a ridotto tenore di lattosio sta per essere immesso sul mercato per la prima volta, il produttore (o l'importatore) deve procedere alla sua notifica al Ministero della Salute (art 7 Dlgs 111/1992) perché ne possa valutare la conformità alla normativa vigente al fine di garantire la sicurezza e la corretta informazione ai consumatori, allegando una copia dell'etichetta conforme a quella usata per la commercializzazione. Per tutti gli adempimenti amministrativi da seguire e la relativa modulistica si rimanda alla consultazione del sito del Ministero della Salute all'indirizzo: [http://www.salute.gov.it/portale/ministro/p4\\_8\\_0.jsp?lingua=italiano&label=servizionline&idMat=APINF&idAmb=PD&idSrv=PDNN&flag=P](http://www.salute.gov.it/portale/ministro/p4_8_0.jsp?lingua=italiano&label=servizionline&idMat=APINF&idAmb=PD&idSrv=PDNN&flag=P).



## 9. ETICHETTATURA: INDICAZIONE DELLA LATTASI E LA DICITURA SENZA LATTOSIO

Due aspetti dell'etichettatura degli alimenti delattosati meritano su tutti di essere approfonditi:

- a) **L'indicazione o meno della lattasi in etichetta** (in altre parole: quando l'enzima è da considerare un ingrediente, quando un coadiuvante tecnologico?). Come è noto, gli enzimi alimentari sono secondo il regolamento 178/2004 a tutti gli effetti "alimenti". Pertanto, quando sono utilizzati negli alimenti e rimangono nel prodotto finito, devono essere indicati come ingredienti nell'etichettatura dell'alimento conformemente al regolamento 1169/2011. Questo obbligo, però, viene meno quando occorrono due specifiche condizioni (art 20 comma b e c del regolamento 1169/2011):
- l'enzima è presente nell'alimento esclusivamente per effetto del *carry-over* da parte di un ingrediente ed è accertato che non svolge alcuna funzione tecnologica nel prodotto finito (la presenza come *carry-over* è a sua volta autorizzata dall'art 18 comma 1 lettera b del regolamento 1333/2008)
  - l'enzima è utilizzato come coadiuvante tecnologico.



Per opportuna memoria si ricorda che in base al regolamento 1333/2008 (art 3 comma 2 lettera b) per «coadiuvante tecnologico» si deve intendere *...ogni sostanza che:*

- non è consumata come un alimento in sé;*
- è intenzionalmente utilizzata nella trasformazione di materie prime, alimenti o loro ingredienti, per esercitare una determinata funzione tecnologica nella lavorazione o nella trasformazione;*
- può dar luogo alla presenza, non intenzionale ma tecnicamente inevitabile, di residui di tale sostanza o di suoi derivati nel prodotto finito, a condizione che questi residui non costituiscano un rischio per la salute e non abbiano effetti tecnologici sul prodotto finito.*

Ciò premesso, in base ai dati sulla funzione tecnologica e sull'effetto dell'enzima (di cui al regolamento 239/2011 art 9 comma 2 lettere b e c), è possibile stabilire se l'enzima è un ingrediente da indicare in etichetta o un coadiuvante tecnologico.

A questo scopo è assai utile il ricorso all'albero delle decisioni di cui alla **FIGURA 8**.

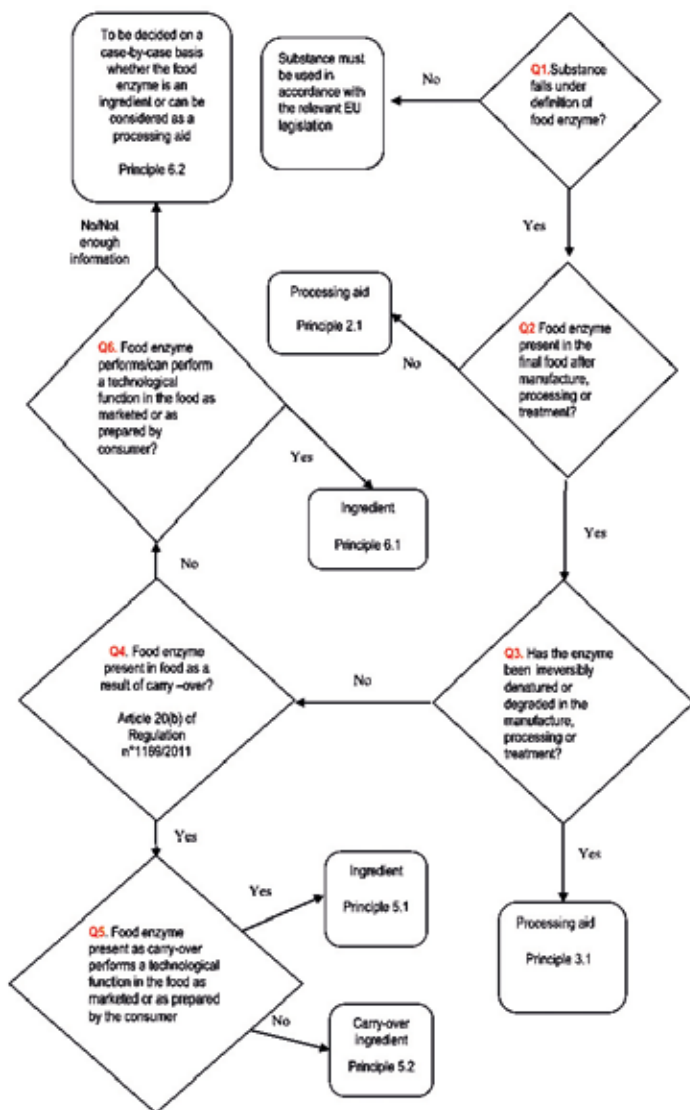


Figura 8 - Decision tree-identifying food enzymes as ingredients or as processing aids

b) **La dicitura senza lattosio.** Come è noto, il regolamento 1169/2011 stabilisce che i consumatori siano sempre adeguatamente informati, in modo da consentire loro di identificare la natura e le caratteristiche dell'alimento, di farne un uso adeguato e di sceglierlo in base alle proprie esigenze dietetiche, in particolare per quel che concerne i potenziali allergeni presenti. L'Annesso II di questo regolamento elenca le sostanze o i prodotti alimentari in grado di causare allergie o intolleranze.



La lista comprende anche il latte e i prodotti a base di latte (compreso il lattosio), mentre l'articolato specifica i criteri con cui etichettare gli allergeni. Attualmente, le norme sulla dicitura "senza..." (seguita dal nome dell'allergene o della sostanza a effetto di intolleranza) sono specificate solo nel Regolamento (CE) 41/2009 che armonizza le informazioni fornite ai consumatori sulla assenza o presenza ridotta di glutine. Per contro, mancano norme armonizzate che indicano l'assenza di lattosio e la presenza in quantità ridotta negli alimenti correnti. Per la verità, la dicitura "senza lattosio" era già stata stabilita a livello comunitario per le formule per lattanti e per i latti di proseguimento dalla direttiva 2006/141/CE. L'allegato IV di questo regolamento stabiliva, infatti, che per utilizzare l'indicazione nutrizionale "assenza di lattosio" doveva essere soddisfatta la condizione di un tenore di lattosio non superiore a 10 mg/100 kcal.

In alcuni Paesi dell'Unione sono stati indicati da organismi vari agli operatori i limiti che andavano rispettati, sia per i prodotti con la dicitura "senza lattosio" che per quelli con la dicitura "a ridotto tenore di lattosio". Così, ad esempio nei Paesi Nordici (Svezia, Norvegia, Finlandia e Danimarca) già dal 1993 sono in uso i valori limite definiti nel *Nordic Seminar and Working Reports 1993:557* (alimenti senza lattosio: contenuto di lattosio inferiore a 10 mg/100 ml o 100 g; alimenti a ridotto contenuto di lattosio: contenuto di lattosio inferiore a 1 g/100 g o 100 ml); mentre in Germania l'associazione tedesca dei chimici degli alimenti (GDCh, *Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.*) ha pubblicato nel 2005 un *policy statement* (*Positionspapier der Lebensmittelchemischen Gesellschaft zu den Angaben "laktosefrei" und "laktosearm" erarbeitet durch die Arbeitsgruppe "Fragen der Ernährung"*, (Lebensmittelchemie 2005, 59, 45) sul contenuto di lattosio per le varie etichette legate al contenuto di lattosio residuo (1. prodotti senza lattosio: contenuto di lattosio  $\leq$  a 10 mg/100 g o ml di prodotto; 2. prodotti a ridotto tenore di lattosio: contenuto di lattosio  $\leq$  1 g/100 g o ml di prodotto; 3. prodotti a bassissimo tenore di lattosio: contenuto di lattosio  $\leq$  100 mg/100 g o ml di prodotto).



Nel nostro Paese, le imprese nazionali di prodotti lattiero-caseari a ridotto contenuto di lattosio hanno immesso sul mercato i loro prodotti con la dicitura "senza lattosio o a ridotto contenuto", quando il tenore residuo di lattosio era inferiore a 0,1%-0,01% seguendo il considerando 21 del Regolamento 1924/2006, in linea con le indicazioni della direttiva 2009/39/CE sugli alimenti destinati a una alimentazione particolare. Del tutto recentemente, la Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione, considerato il parere espresso dalla Commissione unica sulla dietetica e la nutrizione del 12 giugno 2015, ha diffuso una nota nella quale precisa, tra l'altro, che l'indicazione "senza lattosio" può essere impiegata per latti e prodotti lattiero-caseari con un residuo di lattosio inferiore a 0,1 g per 100 g o ml, in attesa che la questione venga armonizzata a livello europeo.

Per utilizzare la predetta indicazione, i prodotti in questione devono riportare l'informazione in etichetta sulla specifica soglia residua di lattosio con modalità del tipo "meno di...". La soglia indicata deve risultare comunque inferiore a 0,1 g per 100 g o 100 ml. Solo per i latti e i latti fermentati può essere impiegata l'indicazione "a ridotto contenuto di lat-

tosio” se il residuo del disaccaride è inferiore a 0,5 g per 100 g o ml. Sulle etichette di tali prodotti va riportato che il tenore di lattosio è “meno di 0,5 g per 100 g o ml”. Tutto ciò in attesa di una armonizzazione comunitaria raccomandata dal considerando 42 del regolamento 609/2013, che comprenda anche l’etichettatura dei prodotti lattiero-caseari naturalmente privi di lattosio.

## 10. CONCLUSIONI

La storia evolutiva dell’uomo ci dice che l’uso alimentare del latte anche dopo lo svezzamento, alternativo/complementare a quello delle carni, risale solo a qualche migliaio di anni fa, quando l’agricoltura e l’allevamento di pecore, capre e vacche diventarono le strategie di sopravvivenza dominanti. Due fattori hanno permesso all’uomo di superare le limitazioni associate alla indigeribilità del lattosio: la mutazione, che si riscontra nel genoma di alcune popolazioni, grazie alla quale si mantiene durante tutta la vita l’attività enzimatica con cui rompere il legame glicosidico e separare i due monosaccaridi costituenti il lattosio; e la produzione di derivati del latte nei quali per effetto di fermentazioni microbiche spontanee si riduce fortemente il contenuto del disaccaride.

Oggi un terzo elemento si è aggiunto a questi due: la produzione e la commercializzazione degli alimenti delattosati, in virtù del quale si stanno riavvicinando strati sempre più ampi di popolazione LNP di varie parti del pianeta al consumo di latte e derivati, fonti nutrizionalmente riconosciute benefiche per la salute e il benessere dell’uomo.

In questo senso, gli alimenti delattosati possono essere a ragione considerati “alimenti del futuro”. Tuttavia, i gastroenterologi ritengono ancora oggi che sia stato sovrastimato il significato clinico del malassorbimento al lattosio, sia dagli stessi consumatori che dai medici di base, in quanto è accertato ed accettato che le dosi di lattosio comunemente assunte (quale quella presente in una tazza di latte) ai pasti non provocano sintomi percettibili. Sempre secondo i gastroenterologi, i sintomi si manifesterebbero, invece, solo quando si superano i valori di lattosio riscontrabili in una tazza di latte o quando il lattosio (o i prodotti che lo contengono) vengono ingeriti senza altri nutrienti.

In conclusione, essi ritengono che nella stragrande maggioranza dei maldigestori siano sufficienti semplici indicazioni dietetiche piuttosto che ricorrere all’uso degli alimenti delattosati. È ipotizzabile che una uniformità di vedute potrebbe essere raggiunta se si riuscisse a risolvere i punti di incertezza che caratterizzano l’intera materia dell’intolleranza al lattosio. In particolare: la mancanza di una definizione condivisa di maldigestori e intolleranti, la mancata conoscenza della vera prevalenza degli intolleranti (dato che gli operatori sanitari non la controllano di *routine*), la mancata identificazione delle dosi-soglia per gli intolleranti/maldigestori (non solo per la grande variabilità delle dosi tollerati riscontrabile tra i consumatori).

Non si può negare che la crescente espansione dei prodotti a ridotto contenuto di lattosio testimoni il favore dei consumatori intolleranti, o che si ritengono tali, per i possibili benefici riflessi sulla riduzione dei rischi al sistema scheletrico. Per l’industria lattiero-casearia, alla quale gli analisti avevano pronosticato una stagnazione dei mercati nel quinquennio 2011-2016 (con poca o nessuna crescita in volume o in valore economico), i prodotti delattosati hanno rappresentato una inaspettata e piacevole sorpresa per i risultati economici, valutati per il 2012 in 2,8 miliardi di dollari, il 70% dei quali a favore delle imprese operanti nell’Europa occidentale e in Nord America. Anche in termini di volume, le stime sono piuttosto ottimistiche, in quanto pronosticano un tasso di crescita annuale del 6% per il periodo 2012-2017. L’Europa è riconosciuta come il più grande mercato dei delattosati al mondo, nel quale si prevede un aumento delle vendite nel periodo 2012-2016 (Prescott, 2012; Valio, 2013).

È auspicabile che le favorevoli prospettive degli analisti economici e il riscontro dei risultati annualmente raggiunti possano essere un importante incentivo a continuare lo sviluppo

tecnologico con l'offerta di un crescente numero di nuovi prodotti per i consumatori mal digerenti/intolleranti a prezzi via via sempre più contenuti, prossimi se non uguali a quelli dei corrispondenti tradizionali. In effetti, sebbene si sia potuto accertare che i soggetti intolleranti, o che ritengono di esserlo, siano disposti a pagare un prezzo più alto (Prescott, 2012), secondo una ricerca americana (Lopez e Lopez, 2009) sono le famiglie a più alto reddito le principali consumatrici di latte delattosato e derivati, mentre molti altri consumatori sono, invece, poco propensi a farlo.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- 1) Abarouei AS, Janghorbani M, Salehi-Marzijarani M, Esmailzadeh A. Effect of dairy consumption on weight and body composition in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:1485–93.
- 2) Adam, A. C., Rubio-Teixeira, M., & Polaina, J. Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004; 44, 553-557.
- 3) Aoki K. A stochastic model of gene-culture coevolution suggested by the culture-historical hypothesis. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:2929–2933.
- 4) Arola, H., Tamm, A. Metabolism of lactose in the human body. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1994; 202, 21-25.
- 5) Arola H. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994; 202: 26-35.
- 6) Auricchio S, Rubino A, Landolt M, Semenza G, Prader A. Isolated intestinal lactase deficiency in the adult. *Lancet* 1963; 2:324-326.
- 7) Babu J, Kumar S, Babu P, Prasad JH, Ghoshal UC. Frequency of lactose malabsorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 140–146.
- 8) Beja-Pereira, A., Luikart, G., England, P. R., Bradley, D. G., Jann, O. C., Bertorelle, G., Chamberlain AT, Nunes TP, Metodiev S, Ferrand N, Erhardt G. . Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature Genetics*, 2003; 35: 311-313.
- 9) Bendtsen, LQ, Lorenzen, JQ, Bendtsen, NT, Rasmussen, C, Astrup, A. Effect of Dairy Proteins on Appetite, Energy Expenditure, Body Weight, and Composition: a Review of the Evidence from Controlled Clinical Trials. *Adv. Nutr.* 2013; 4: 418-438.
- 10) Bernardes-Silva CF, Pereira AC, de Fátima Alves da Mota G, Krieger JE, Laudanna AA. Lactase persistence/non-persistence variants, C/T\_13910 and G/A\_22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients. *Clin Chim Acta* 2007; 386 (1-2): 7-11.
- 11) Bodlaj G, Stöcher M, Hufnagl P, et al. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clin Chem* 2006; 52 (1): 148-51.
- 12) Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrere B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:14930–5.
- 13) Brown-Esters O, McNamara C, Savaiano D. Dietary and biological factors in influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal* 2012; 22: 98-103.
- 14) Caroli A, Poli A, Ricotta D, Banfi G, Cocchi D. Invited review: Dairy intake and bone health: a viewpoint from the state of the art. *J Dairy Sci*, 2011;94:5249–62.

- 15) Casellas F, Aparici A, Casaus M, Rodríguez P, Malagelada JR. Subjective perception of lactose intolerance does not always indicate lactose malabsorption. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8(7):581-586.
- 16) Casellas, F., Varela, E., Aparici, A., Casaus, M., & Rodriguez, P. Development, validation, and applicability of a symptoms questionnaire for lactose malabsorption screening. *Digestive Diseases and Sciences*, 2009;54: 1059-1065.
- 17) Chen M, Pan A, Malik VS, Hu FB. Effects of dairy intake on body weight and fat: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2012;96:735–47.
- 18) Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, Atkinson S, Ward L, Moher D, Hanley D, Fang M, Yazdi F, Garrity C, Sampson M, Barrowman N, Tsertsvadze A, Mamaladze V. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep).* 2007; (158):1-235.
- 19) Christopher NL, Bayless TM. Role of the small bowel and colon in lactose-induced diarrhoea. *Gastroenterology* 1971;60:845-52.
- 20) Curry A. The milk revolution, *Nature* 2013; 500: 20-22
- 21) Dahlqvist A, Hammond JD, Crane RK, Dunphy JV, Littman A. Intestinal lactase deficiency and lactose intolerance in adults: preliminary report. *Gastroenterology* 1963; 45: 488-491.
- 22) Danielsen EM, Skovbjerg H, Noren O, Sjostrom H, Biosynthesis of intestinal microvillar proteins: intracellular processing of lactase-phlorizin hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:82-90.
- 23) Dugan CE, Fernandez ML. Effects of dairy on metabolic syndrome parameters: a review. *Yale J Biol Med.* 2014;87(2):135-47.
- 24) Duluc I, Galluser M, Raul F, Freund JN. Dietary control of the lactase mRNA distribution along the rat small intestine. *Am J Physiol* 1992;262:G954-61.
- 25) Duluc I, Freund JN, Leberquier C, Keding M. Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. *J Cell Biol* 1994;126:211-21.
- 26) de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. Probiotics - compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001;73:421S-429S.
- 27) EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for calcium. *EFSA Journal* 2015;13(5):4101.
- 28) EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lactose and increase in calcium absorption leading to an increase in calcium retention (ID 668) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011;9(6):2234.
- 29) EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. *EFSA Journal* 2010;8(9):1777.
- 30) EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2010(a);8(10):1763.
- 31) EFSA Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids Guidance on the Submission of a Dossier on Food Enzymes. *The EFSA Journal* 2009; 1305: 1-26.
- 32) Enattah NS, Jensen TG, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, El-Shanti H, Seo JK, Alifrangis M, Khalil IF, Natah A, Ali A, Natah S, Comas D, Mehdi SQ, Groop

- L, Vestergaard EM, Imtiaz F, Rashed MS, Meyer B, Troelsen J, Peltonen L. Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *Am J Hum Genet.* 2008; 82:57-72.
- 33) Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet.* 2002; 30:233–237.
  - 34) Enattah NS, Trudeau A, Pimenoff V, Maiuri L, Auricchio S, Greco L, Rossi M, Lentze M, Seo JK, Rahgozar S, Khalil I, Alifrangis M, Natah S, Groop L, Shaat N, Kozlov A, Verschubskaya G, Comas D, Bulayeva K, Mehdi SQ, Terwilliger JD, Sahi T, Savilahti E, Perola M, Sajantila A, Jarvela I and Peltonen L., Evidence of still-on-going convergence evolution of the lactase persistence T-13910 alleles in humans. *Am J hum Genet* 2007; 81: 615-25.
  - 35) Farrell HM, Jr., Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *J Dairy Sci.* 2004;87:1641-74.
  - 36) Fekete AA, Givens DI, Lovegrove JA. The impact of milk proteins and peptides on blood pressure and vascular function : a review of evidence from human intervention studies. *Nutr Res Rev.* 2013 ;26(2):177-90.
  - 37) Freund JN, Foltzer-Jourdainne C, Duluc I, Galluser M, Gossé F, Raul F. Rat lactase activity and mRNA expression in relation to the thyroid and corticoid status. *Cell Mol Biol,* 1991;37:463-6.
  - 38) Fiat A-M, Migliore-Samour D, Jolles P, Drouet L, Sollier CBD, Caen J. Biologically Active Peptides from Milk Proteins with Emphasis on Two Examples Concerning Antithrombotic and Immunomodulating Activities. *J Dairy Sci* 1993;76:301-10.
  - 39) Freund JN, Boukamel R, Duluc I. Levels and factors of control of small intestinal lactase expression in the laboratory rat. In: Auricchio S, Semenza G, eds. *Common Food Intolerances 2: Milk in Human Nutrition and Adult-Type Hypolactasia.* Basel: Karger, 1993: 132-45.
  - 40) Gasbarrini A, Corazza GR, Gasbarrini G, Montalto M, Di Stefano M, Basilisco G, Parodi A, Usai-Satta P, Vernia P, Anania C, Astegiano M, Barbara G, Benini , Bonazzi P, Capurso G, Certo M, Colecchia A, Cuoco L, Di Sario A, Festi D, Lauritano C, Miceli E, Nardone G, Perri F, Portincasa P, Riscicato R, Sorge M, Tursi A; 1st Rome H2-Breath Testing Consensus Conference Working Group. Methodology and indications of H2-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 ; 1:1-49.
  - 41) Gekas V., Lopez-Leiva M. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochemistry,* 1985; 20: 2-12.
  - 42) Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT, Allison C, Segal I, Vorster HH, Walker AR. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut* 1990;31:679-83.
  - 43) Gilat T, Russo S, Gelman-Malachi E and Aldor TA. Lactase in man: a nonadaptable enzyme. *Gastroenterology,*1972; 62: 1125-1127.
  - 44) Griessen, M., Speich, P. V., Infante, F., Bartholdi, P., Cochet, B., Donath, A., Courvoisier B, Bonjour JP.. Effect of absorbable and nonabsorbable sugars on intestinal calcium absorption in humans. *Gastroenterology,* 1989;96: 769-775.
  - 45) Harju M, Kallioinen H, Tossavainen O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal* 2012;22: 104-109.
  - 46) Harju, M. Lactose hydrolysis. *IDF Bulletin,* 212, 50-55, 1987, IDF, Brussels, Belgium.
  - 47) Harju, M. Chromatographic and enzymatic removal of lactose from milk. *IDF Bulletin,* 389, 4-8, 2004.

- 48) Hammer HF, Petritsch W, Pristautz H, Krejs GJ. Evaluation of the pathogenesis of flatulence and abdominal cramps in patients with lactose malabsorption. *Wien Klin Wochenschr* 1996;108: 175-9.
- 49) Hauri, H.P., Sterchi, E.E. Bienz, D. Fransen, J.A. Marxer, A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 1985, 101: 838-851.
- 50) He, T., Venema, K., Priebe, M. G., Welling, G. W., Brummer, R. J., & Vonk, R. J. The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *European Journal of Clinical Investigation*, 2008; 38: 541-547.
- 51) Heyman, M.B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, 2006;118 (3): 1279-1286.
- 52) Henning SJ. Functional development of the gastrointestinal tract. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2nd ed. New York: Raven, 1987:285-330.
- 53) Hertzler SR, Savaiano DA. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr.* 1996;64(2):232-236.
- 54) Ho MW, Povey S, Swallow DM. Lactase polymorphism in adult British natives: estimating allele frequencies by enzyme assays in autopsy samples. *Am J Hum Genet*, 1982; 34:650-657.
- 55) Hovde O, Farup PG. A comparison of diagnostic tests for lactose malabsorption - which one is the best? *BMC Gastroenterology* 2009;9:82-89.
- 56) Hogenauer C, H. F. Hammer, K. Mellitzer, W. Renner, G. J. Krejs, and H. Toplak, "Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactose non-persistence," *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2005; 17(3) 371-376.
- 57) Holden C, Mace R . Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Hum Biol*, 1997;69:605-628.
- 58) Husain, Q. Beta-galactosidases and their potential applications: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010; 30:41-62.
- 59) IDF. (1993). *Lactose hydrolysis. Bulletin 289*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 71pp.
- 60) Imtiaz F, Savilahti E, Sarnesto A, Trabzuni D, Al-Kahtani K, Kagevi I, Rashed MS, Meyer BF, Järvelä I. The T/G 13915 variant upstream of the lactase gene (LCT) is the founder allele of lactase persistence in an urban Saudi population. *J Med Genet.* 2007;44(10):e89.
- 61) Ingram CJ, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG and Swallow DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genetics*, 2009; 124, 579-591.
- 62) Ingram CJ, Elamin MF, Mulcare CA, Weale ME, Tarekegn A, Raga TO, Bekele E, Elamin FM, Thomas MG, Bradman N, Swallow DM. A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence? *Hum Genet.* 2007; 120:779-788.
- 63) Ingram CJ, Raga TO, Tarekegn A, Browning SL, Elamin MF, Bekele E, Thomas MG, Weale ME, Bradman N and Swallow DM,. Multiple Rare Variants as a Cause of a Common Phenotype: Several Different Lactase Persistence Associated Alleles in a Single Ethnic Group. *Journal of Molecular Evolution*, 2009b; 69: 579-588.
- 64) Itan Y, Jones B, Ingram C, Swallow D, Thomas M. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evol Biol.* 2010;10:36.
- 65) Järvelä, I., Enattah, N.S., Kokkonen, J., Varilo, T., Savilahti, E., Peltonen, L. Assignment of the locus for congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998; 63: 1078-1085.

- 66) Jankowiak, C., Ludwig, D. Frequent causes of diarrhea: celiac disease and lactose intolerance. *Med Klin (Munich)*,2008;103: 413-422
- 67) Jauhainen T, Korpela R. Milk peptides and blood pressure. *J Nutr* 2007;137:825–9.
- 68) Jelen, P., & Tossavainen, O. Low lactose and lactose-free milk and dairy products e prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2003;58: 161-165
- 69) Jellema P, Schellevis FG, van der Windt DA, Kneepkens CM, van der Horst HE. Lactose malabsorption and intolerance: a systematic review on the diagnostic value of gastrointestinal symptoms and self-reported milk intolerance. *QJM*. 2010;103(8):555-572.
- 70) Jenssen H, Hancock REW. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 2009;91:19–29
- 71) Klesges, R. C., Harmon-Clayton, K., Ward, K. D., Kaufman, E. M., Haddock, C. K.,Talcott, G. W., Iando HA. Predictors of milk consumption in a population of 17- to 35-year-old military personnel. *Journal of the American Dietetic Association*, 1999; 99: 821-826
- 72) Kolars JC, Levitt MD, Aouji M, Savaiano DA. Yogurt—an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med*. 1984;310(1):1-3.
- 73) Koldovský O. Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. *J Nutr*. 1989 ;119(11):1543-51.
- 74) Koldovsky O, Sunshine P. Effect of cortisone on developmental pattern of neutral and acid b-galactosidase of the small intestine of the rat. *Biochem J* 1970; 117: 467–71.
- 75) Krawczyk M, Wolska M, Schwartz S, Gruenhage F, Terjung B, Portincasa P, Sauerbruch T, Lammert F. Concordance of genetic and breath tests for lactose intolerance in a tertiary referral centre. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 2008; 17( 2) 135–139
- 76) Krause J, Kaltbeitzler I, Erckenbrecht JF. Lactose malabsorption produces more symptoms in women as in men. *Gastroenterology* 1996; 110:A339 .
- 77) Kruse TA, Bolund L, Grzeschik L, Mantei N, Semenza G. The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. *Eur Biol Soc* 1988; 240: 123–6.
- 78) Kuhn NJ. The biosynthesis of lactose. In : Mepham TB, ed.*Biochemistry of Lactation*. NY, Amsterdam: Elsevier, 1983:159-76.
- 79) Kuokkanen M, Kokkonen J, Enattah NS, Ylisaukko-Oja T, Komu H, Varilo T, Peltonen L, Savilahti E, Jarvela I. Mutations in the translated region of the lactase gene (LCT) underlie congenital lactase deficiency. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 339-344
- 80) Kuokkanen M, Myllyniemi M, Vauhkonen M, Helske T, Kääriäinen I, Karesvuori S, Linnala A, Härkönen M, Järvelä I, Sipponen P. A biopsy-based quick test in the diagnosis of duodenal hypolactasia in upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy*. 2006 ;38(7):708-12
- 81) Launiala K, Kuitunen P & Visakorpi JK . Disaccharidases and histology of duodenal mucosa in congenital lactose malabsorption. *Acta Paediatr Scand* 1966; 55: 257–263.
- 82) Lasser RB, Bond JH, Levitt M. The role of intestinal gas in functional abdominal pain. *N Engl J Med* 1975;293:524–6.
- 83) Law D, Conklin J, Pimentel M. Lactose intolerance and the role of the lactose breath test. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(8):1726-1728.
- 84) Lebenthal E, Sunshine P, Kretchmer N. Effect of prolonged nursing on the activity of intestinal lactase in rats. *Gastroenterology* 1973;64:1136-41.
- 85) Lee SY, Wang Z, Lin CK, Contag CH, Olds LC, Cooper AD, Sibley E. Regulation of intestine-specific spatiotemporal expression by the rat lactase promoter. *J Biol Chem*. 2002; 277:13099–13105.

- 86) Leffler DA, Dennis M, Hyett B, Kelly E, Schuppan D, Kelly CP. Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease. *Clinic Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 445–450.
- 87) Leonardi M, Gerbault P, Thomas MG, Burger J. The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence *International Dairy Journal* 2012; 22 : 88-97
- 88) Levitt MD, Donaldson RM. Use of respiratory hydrogen (H<sub>2</sub>) excretion to detect carbohydrate malabsorption. *J Lab Clin Med* 1970; 75: 937–45
- 89) Levitt MD, Gibson GR, Christl SU. Gas metabolism in the large intestine. In: Gibson GR, MacFarlane GT, eds. *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology, and pathology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995:136.
- 90) Lomer MCE, Parkes GC, Sanderson JD. Review article: lactose intolerance in clinical practice—myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008;27:93–103.
- 91) Lopez, E., R. A. Lopez. Demand for differentiated milk products: Implications for price competition. *Agribusiness* 2009; 25:453–465.
- 92) Malo C, Menard D. Opposite effects of one and three injections of cortisone or thyroxine on intestinal lactase activity in suckling mice. *Experientia* 1979; 35: 493–4.
- 93) Mantei N, Villa M, Enzler T, Wacker H, Boll W, James P, Hunziker W, Semenza G: Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J* 1988; 7(9):2705–2713.
- 94) Maiuri L, Raia V, Potter J, Swallow D, Ho MW, Fiocca R, Finzi G, Cornaggia M, Capella C, Quaroni A, Auricchio S. Mosaic pattern of lactase expression by villous enterocytes in human adult-type hypolactasia. *Gastroenterology* 1991; 100: 359–69
- 95) Marwaha SS, Kennedy JF. Whey—pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science & Technology* 1988;23:323-336
- 96) Martini MC, Savaiano DA. Reduced intolerance symptoms from lactose consumed during a meal. *Am J Clin Nutr*. 1988;47(1):57-60.
- 97) McBean LD, Miller GD. Allaying fears and fallacies about lactose intolerance. *J Am Diet Assoc*. 1998 Jun;98(6):671-6.
- 98) Mills S, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF, Stanton C. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int Dairy J*, 2011;21:377–401.
- 99) Moore, B. J. Dairy foods: are they politically correct? *Nutrition Today*, 2003;38: 82-90.
- 100) Mummah S, Oelrich B, Hope J, Vu Q, Gardner CD. Effect of raw milk on lactose intolerance: a randomized controlled pilot study. *Ann Fam Med*. 2014 ;12(2):134-41
- 101) Mustapha, A., Hertzler, S. R., & Savaiano, D. A. (1997). Lactose: nutritional significance. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry. Lactose, water, salts and vitamins*, Vol. 3. London, UK: Chapman and Hall.
- 102) Naim HY, Sterchi EE, Lentze MJ. Biosynthesis and maturation of lactase-phlorizin hydrolase in the human small intestinal epithelial cells. *Biochem J*, 1987; 241:427-434
- 103) Naim HY & Naim H (1996) Dimerization of lactase-phlorizin hydrolase occurs in the endoplasmic reticulum, involves the putative membrane spanning domain and is required for an efficient transport of the enzyme to the cell surface. *Eur J Cell Biol* 1996;70, 198-208.
- 104) Nilsson TK, Olsson LA. Simultaneous genotyping of the three lactose tolerance-linked polymorphisms LCT -13907C/G, LCT -13910C>T and LCT -13915T>G with Pyrosequencing technology. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46 (1): 80-4.
- 105) Nilsson TK, Johansson CA. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the -13910 C/T polymorphism with Pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 287-290



- 106) Nose, O., Iida, Y., Kai, H., Harada, T., Ogawa, M. & Yabuuchi, H. Breath hydrogen test for detecting lactose malabsorption in infants and children. Prevalence of lactose malabsorption in Japanese children and adults. *Arch. Dis. Child.*, 1979; 54: 436-440.
- 107) Olds, L. C., Sibley, E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Human Molecular Genetics*, 2003;12, 2333e2340.
- 108) Onwulata CI, Rao DR, Vankineni P. Relative efficiency of yogurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed-lactose milk, and a commercial lactase tablet in alleviating lactose maldigestion. *Am J Clin Nutr.* 1989;49(6):1233-1237.
- 109) Pastore, M., Morisi, F., & Zaccardelli, D. (1974). Reduction of lactose content of milk using entrapped  $\beta$ -galactosidase III. Pilot-plant experiments. In M. Salmons, C. Saronio, & S. Garattini (Eds.), *Insolubilized enzymes* (pp. 211-216). New York, NY, USA: Raven Press.
- 110) Prescott, R. (2012) Lactose-free dairy market is booming, says new report. <http://www.foodbev.com/news/lactose-free-dairy-market-is-booming-say>
- 111) Politis I, Chronopoulou R. Milk peptides and immune response in the neonate. *Adv Exp Med Biol* 2008;606:253-69.
- 112) Pohl D, Savarino E., Hersberger M, Behlis Z., Stutz B., Goetze O., Eckardstein A. v., Fried M, Tutuian R. Excellent agreement between genetic and hydrogen breath tests for lactase deficiency and the role of extended symptom assessment," *British Journal of Nutrition*. 2010; 104(6): 900–907.
- 113) Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare C, Peuhkuri K, Kajander K, Sarner M, Korpela R, Swallow DM .The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann Hum Genet* 2003; 67:298-311.
- 114) Pritzwald-Stegman BF. Lactose and some of its derivatives *J Soc Dairy Technol* 1986; 39:91-96.
- 115) Raul F, Noriega R, Nsi-Emvo E, Doffoel M, Grenier JF. Lactase activity is under hormonal control in the intestine of adult rat. *Gut* 1983; 24: 648–52.
- 116) Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Tötterman N, Lindahl H, Järvelä I, Kolho KL. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 2004; 53: 1571-1576.
- 117) Rasinperä H, Kuokkanen M, Kolho KL, Lindahl H, Enattah NS, Savilahti E, Orpana A and Järvelä I. Transcriptional downregulation of the lactase (LCT) gene during childhood. *Gut* 2005; 54 (11): 1660-1.
- 118) Rao DR, Bello H, Warren AP, Brown GE. Prevalence of lactose maldigestion. Influence and interaction of age, race, and sex. *Dig Dis Sci* 1994;39:1519–24.
- 119) Richmond ML, Gray JI, Stine CM.  $\beta$  galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *J Dairy Sci* ,1981; 64: 1759–1771.
- 120) Rizzoli R, Boonen S, Brandi ML, Bruyère O, Cooper C, Kanis JA, Kaufman JM, Ringe JD, Weryha G, Reginster JY. Vitamin D supplementation in elderly or postmenopausal women: a 2013 update of the 2008 recommendations from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Curr Med Res Opin.* 2013 ;29(4):305-13.
- 121) Romagnuolo J, Schiller D, Bailey RJ. Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1113-1126.
- 122) Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ, Shapses

- SA. The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: what dietetics practitioners need to know. *J Am Diet Assoc.* 2011;111(4):524-7.
- 123) Rossi M, Maiuri L, Fusco MI, Salvati VM, Fuccio A, Auricchio S, Mantei N, Zecca L, Gloor SM, Semenza G. Lactase persistence versus decline in human adults: multifactorial events are involved in down-regulation after weaning. *Gastroenterology* 1997; 112: 1506-14.
  - 124) Rusynyk, R. A., Still, C. D. . Lactose intolerance. *Journal of the American Osteopathic Association*, 2001; 101: S10-S12.
  - 125) Sahi T . Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994; 202: 7-20.
  - 126) Savaiano DA, Boushey CJ, McCabe GP. Lactose intolerance symptoms assessed by meta-analysis: a grain of truth that leads to exaggeration. *J Nutr.* 2006;136(4):1107-1113.
  - 127) Savilahti, E., Launiala, K. & Kuitunen, P. Congenital lactase deficiency. A clinical study on 16 patients. *Arch. Dis. Child.*, 1983; 58: 246-252.
  - 128) Schaafsma G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *Int Dairy J* 2008;18:458-65.
  - 129) Scrimshaw, N.S., Murray, E.B. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1988; 48: 1079-1159.
  - 130) Skovbjerg H, Danielsen EM, Noren O, Sjostrom H. Evidence for biosynthesis of lactase phlorizin-hydrolase as a single-chain high-molecular weight precursor. *Biochim Biophys Acta* 1984; 789:247-251.
  - 131) Semenza G. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. *Annu Rev Cell Biol* 1986; 2:255-313.
  - 132) Seppo L, Tuure T, Korpela R, Järvelä I, Rasinperä H, Sahi T. Can primary hypolactasia manifest itself after the age of 20 years? A two-decade follow-up study. *Scand J Gastroenterol.* 2008; 43 (9): 1082-7.
  - 133) Severin S, Wenshui X. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45:645-56.
  - 134) Shaw AD, Davies GJ. Lactose intolerance: problems in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol* 1999; 28: 208-216.
  - 135) Shaikat A, Levitt MD, Taylor BC, MacDonald R, Shamliyan TA, Kane RL, Wilt TJ. Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance. *Ann Intern Med.* 2010;152(12):797-803.
  - 136) Sisecioglu M, Kirecci E, Cankaya M, Ozdemir H, Gulcin I, Atasever A. The prohibitive effect of lactoperoxidase system (LPS) on some pathogen fungi and bacteria. *African J Pharm Pharmacol* 2010;4:671-7.
  - 137) Skovbjerg H, Sjostrom H, Noren O: Purification and characterisation of amphiphilic lactase/phlorizin hydrolase from human small intestine. *Eur J Biochem* 1981;114(3): 653-661.
  - 138) Stolba R, Rezanka E, Eckhard U, et al. (2005) Genotyping of the LCT (T/C 2 13910) polymorphism on the LightCycler using fluorescent hybridisation probes. *Laboratoriums Medizin* 2005; 29: 194-197.
  - 139) Suarez FL, Adsheed J, Furne JK, Levitt MD. Lactose maldigestion is not an impediment to the intake of 1500 mg calcium daily as dairy products *Am J Clin Nutr.* 1998;68(5):1118-22.
  - 140) Suarez, F. L., Savaiano, D. A., Levitt, M. D. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *New England Journal of Medicine*, 1995;333: 1-4.

- 141) Suchy FJ, Brannon PM, Carpenter TO, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on lactose intolerance and health. *Ann Intern Med.* 2010;152(12):792-796.
- 142) Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet.* 2003; 37:197-219.
- 143) Swagerty, D. L., Jr., Walling, A. D., & Klein, R. M. Lactose intolerance. *American Family Physician*, 2002; 65: 1845-1850.
- 144) Tanaka A, Kawamoto T. 1999. Cell and enzyme immobilization. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* (Demain, A. L., Davies, J. E., Atlas, R. M., Cohen, G., Hershberger, C. L., Hu, W. S., Sherman, D. H., Willson, R. C., Wu, J. H. D. Eds.). Washington DC: ASM Press. 94-102.
- 145) Teschemacher H, Koch G. Opioids in the milk. *Endocr Regul.* 1991; 25(3):147-50.
- 146) Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, Powell K, Mortensen HM, Hirbo JB, Osman M, Ibrahim M, Omar SA, Lema G, Nyambo TB, Gori J, Bumpstead S, Pritchard JK, Wray GA, Deloukas P. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet.* 2007; 39:31-40.
- 147) Tomba C, Baldassarri A, Coletta M, Cesana BM, Basilisco G. Is the subjective perception of lactose intolerance influenced by the psychological profile? *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36(7):660-9.
- 148) Torniainen, S., Savilahti, E., Järvelä, I. Congenital lactase deficiency-a more common disease than previously thought? *Duodecim.* 2009; 125 (7): 766-770.
- 149) Torniainen S, Parker MI, Holmberg V, Lahtela E, Dandara C, Jarvela I. Screening of variants for lactase persistence/non-persistence in populations from South Africa and Ghana. *BMC Genet.* 2009;10:31.
- 150) Tremaine, W. J., Newcomer, A. D., Riggs, B. L., & McGill, D. B. Calcium absorption from milk in lactase-deficient and lactase-sufficient adults. *Digestive Diseases and Sciences*, 1986; 31: 376-378.
- 151) Troelsen, J. T. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1723, 19-32.
- 152) Troelsen, J. T., Olsen, J., Møller, J., & Sjöström, H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology*, 2003; 125: 1686-1694.
- 153) Valio (2013) Lactose-free products. <http://www.valio.com/solutions/valio-zero-lactose>
- 154) Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 2008; 14(8):351–60.
- 155) Vernia P, Ricciardi MR, Frandina C, Bilotta T, Frieri G. Lactose malabsorption and irritable bowel syndrome. Effect of a long-term lactose-free diet. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1995;27:117-21.
- 156) Vesa, T. H., Marteau, P., Korpela, R. Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*, 2000; 19, 165S-175S.
- 157) Vesa TH, Marteau P, Zidi S, Briet F, Pochart P, Rambaud JC. Digestion and tolerance of lactose from yoghurt and different semi-solid fermented dairy products containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria* in lactose maldigesters - is bacterial lactase important? *Eur J Clin Nutr.* 1996 a;50(11):730-733.
- 158) Vesa TH, Korpela RA, Sahi T. Tolerance to small amounts of lactose in lactose maldigesters. *Am J Clin Nutr.* 1996;64(2):197-201.
- 159) Vonk, R. J., Priebe, M. G., Koetse, H. A., Stellaard, F., Lenoir-Wijnkoop, I., Antoine, J. M., Zhong Y, Huang CY. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. *European Journal of Clinical Investigation*, 2003;33: 70-75.

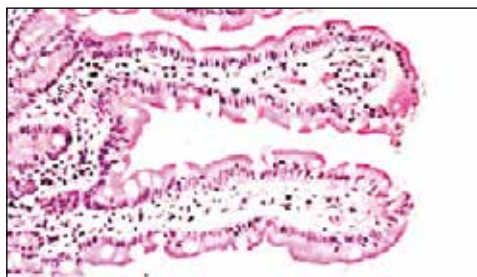
- 160) Wang Y, Harvey CB, Hollox E, Phillips A, Poulter M, Clay P, Walker-Smith J, Swallow D et al. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 1998; 114: 1230-6.
- 161) Wang B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu Rev Nutr.* 2009; 29:177-222.
- 162) Wampold BE, Imel ZE, Minami T. The story of placebo effects in medicine: evidence in context. *J Clin Psychol.* 2007;63:379-90;
- 163) Whittier, E. O. Lactose. *Chemical Reviews*, 1925; 2: 85-125.
- 164) Wilt TJ, Shaukat A, Shamliyan T, Taylor BC, MacDonald R, Tacklind J, Rutks I, Schwarzenberg SJ, Kane RL, Levitt M. Lactose intolerance and health. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2010; (192):1-410.
- 165) Zadow, J. G. (1986). Lactose hydrolysed dairy products. *Food Technology in Australia*, 1986; 38: 460-462, 471.



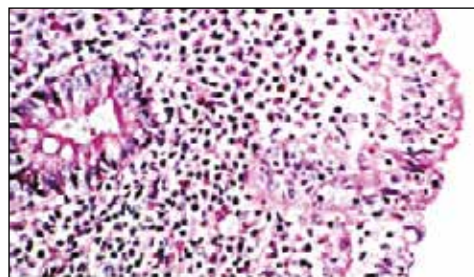
La malattia celiaca (MC) è un'enteropatia autoimmune permanente al glutine, scatenata in soggetti geneticamente predisposti (Ludvigsson *et al.*, 2013; Losowsky 2008; Troncone *et al.*, 2008).

Il glutine è una proteina complessa che si origina dall'unione, in presenza di acqua e di energia meccanica, di 2 frazioni proteiche, *gliadina* e *glutenina*, presenti in alcuni cereali quali grano, segale ed orzo.

La predisposizione genetica alla MC consiste nella presenza degli alleli DQ2 e/o DQ8 nel genoma che codifica per il sistema maggiore di istocompatibilità di tipo II (Silano *et al.*, 2010; Koning, 2014). I peptidi derivati dalla digestione gastro-intestinale del glutine attivano sequenzialmente nella mucosa duodenale del soggetto celiaco i meccanismi molecolari e cellulari dell'immunità innata e adattativa. Questo processo infiammatorio, indotto dall'aumentata produzione delle citochine infiammatorie interleuchina-15 ed interferon - gamma, determina la distruzione e il successivo riarrangiamento del tessuto mucosale e il quadro istologico, diagnostico della MC: atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e infiltrazione linfocitaria (Ciccocioppo *et al.*, 2006; Abadie & Jabri, 2014).



*Mucosa duodenale normale.*



*Assenza di villi, mucosa infiltrata da cellule mononucleate.*

La MC è una delle patologie permanenti più frequenti, in quanto colpisce circa l'1% della popolazione generale su scala nazionale e mondiale. La MC è più frequente nel genere femminile (1.5-2 volte rispetto ai maschi), nelle popolazioni di origine indo-europea ed in alcuni gruppi a rischio. La frequenza delle diagnosi è in aumento, soprattutto grazie alla crescente applicazione dei *test* diagnostici nella pratica clinica. Ciò nonostante, circa il 70-80% dei casi sfuggono tuttora alla diagnosi (parte sommersa dell' "iceberg celiaco"), constatazione che potrebbe suggerire per il futuro l'opportunità di uno *screening* sierologico di massa (Jabri *et al.*, 2005; Catassi & Fasano, 2008; Meresse *et al.*, 2012) (Fig. 1).



Figura 1 – L’“iceberg celiaco”: i numerosi casi che ancora oggi sfuggono alla diagnosi.

Fonte: [http://www.drshaer-institute.com/smarteredit/documents/download/dsif\\_03-2014\\_it\\_internet\\_artikel1\\_14-12-17.pdf](http://www.drshaer-institute.com/smarteredit/documents/download/dsif_03-2014_it_internet_artikel1_14-12-17.pdf)

La patogenesi della MC dipende da una complessa reazione innescata dal glutine a livello della mucosa intestinale, che coinvolge meccanismi immunologici di tipo sia adattativo che innato. La distruzione dell’epitelio intestinale è causata dalla attivazione sia dei linfociti CD4 nella lamina propria, con conseguente rilascio di citochine proinfiammatorie quali IFN-II, che dei linfociti intraepiteliali (IEL), attivazione, quest’ultima mediata soprattutto dalla IL-15. A parte la predisposizione genetica e l’ingestione di glutine, altri fattori ambientali sembrano giocare un ruolo nel modulare il rischio di sviluppare celiachia, quali la tipologia del microbioma intestinale, specie nelle prime epoche della vita, la nutrizione infantile e le infezioni (Jabri & Sollid, 2009; Sollid & Jabri, 2013).

La presentazione della MC è estremamente variabile, tanto che questa condizione è stata definita “un camaleonte clinico” di cui si distinguono le seguenti forme:

- a) CLASSICA (o tipica). Nel bambino si manifesta tipicamente durante i primi 3 anni di vita, dopo una latenza di alcuni mesi dalla introduzione di cereali contenenti glutine col divezzamento. Compaiono gradualmente inappetenza, cambiamento dell’umore, diarrea cronica, arresto/calò di peso e distensione addominale. Nell’adulto la presentazione della MC classica è quella della tipica sindrome da malassorbimento intestinale con diarrea cronica, perdita di peso ed anemia sideropenica;
- b) NON CLASSICA (o atipica). Questa forma è frequente sia nel bambino più grande che nell’adulto. È caratterizzata da sintomatologia intestinale aspecifica (es. dolori addomi-

- nali ricorrenti, quadro di colon irritabile, stomatite aftosa ricorrente, stipsi cronica) e/o manifestazioni extra-intestinali, quali anemia sideropenica resistente alla terapia marziale *per os*, stanchezza cronica, bassa statura, ritardo (più raramente anticipo) puberale, ipertransaminasemia isolata o dermatite erpetiforme (dermatite eritemato-polfoide pruriginosa, considerata come “celiachia della pelle”);
- c) SILENTE. Tale forma, nella quale è assente una chiara sintomatologia, viene occasionalmente individuata a seguito di *screening* sierologico in soggetti a rischio, es. familiari di primo grado di celiaci o pazienti affetti da altre patologie autoimmuni. Nella MC silente sono presenti le stesse alterazioni sierologiche ed istologiche dei casi tipici;
  - d) POTENZIALE. È caratterizzata da un *pattern* sierologico tipico, in presenza di un quadro istologico intestinale normale o solo lievemente alterato. Il quadro clinico può essere silente o aspecifico (es. dolore addominale ricorrente). Con il passare del tempo la forma potenziale può evolvere in una MC conclamata sul piano istologico (Fasano, 2003).

## EPIDEMIOLOGIA DELLA CELIACHIA

La celiachia è una malattia nota da molti anni, ma solo in tempi recenti viene riconosciuta come un problema piuttosto comune e quindi riceve una maggiore attenzione anche da parte dei produttori di alimenti e dei ristoratori. La stima della prevalenza della celiachia, a livello mondiale, è dell'1%.

Secondo recenti studi americani, la malattia è ampiamente sottostimata negli Stati Uniti, dove interessa una persona su 133. La diagnosi invece viene effettuata mediamente solo sul 3% dei malati. Ci sarebbero quindi più di due milioni di celiaci non diagnosticati nei soli Stati Uniti. Tra le persone che hanno un parente di primo grado celiaco, la percentuale sale moltissimo, con una incidenza della malattia di 1 caso su 22 persone. Studi epidemiologici recenti stanno rilevando la presenza notevole di celiachia anche in aree del mondo nelle quali non si riteneva fosse molto presente, dall'Africa al Sudamerica e all'Asia.

In Europa, la celiachia sarebbe la più comune malattia di origine genetica. In Italia, ad esempio, il *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* statunitense stima l'incidenza di MC in un caso su 250.

Secondo l'Associazione Italiana Celiachia (AIC), invece, l'incidenza di questa intolleranza in Italia si aggira su un caso ogni 100-150 persone.

I celiaci quindi potrebbero essere circa 400 mila, ma ne sono stati diagnosticati solo 35 mila. Ogni anno, sostiene sempre l'AIC, vengono effettuate 5.000 nuove diagnosi ed ogni anno nascono 2.800 nuovi celiaci, con un incremento annuo del 9%.

Uno studio (Corrao *et al.*, 2001, pubblicato sulla rivista *The Lancet* da un gruppo di ricercatori italiani) ha analizzato il tasso di mortalità tra più di 1.000 malati di celiachia, diagnosticati tra il 1962 e il 1994, e su oltre 3.300 loro parenti di primo grado. Lo studio ha permesso di evidenziare che il tasso di mortalità è significativamente in eccesso rispetto all'atteso (53 i morti contro i 26 attesi), soprattutto nei primi tre anni dopo la diagnosi, nei pazienti che presentano sintomi di malnutrizione e non in quelli con sintomi minori.

La mortalità appare correlata al ritardo con cui viene effettuata la diagnosi (e quindi il cambiamento di dieta) e la causa principale di morte è lo sviluppo di linfoma. L'eccesso di mortalità non riguarda invece i parenti di primo grado.





## LA FREQUENZA DI CELIACHIA NEL MONDO

La celiachia è la più frequente intolleranza alimentare a livello globale. La prevalenza in Europa nella popolazione adulta è pari all'1%, con un intervallo di variabilità che va dallo 0.2% della Germania al 2-3 % della Finlandia e della Svezia. Stesso dato interessa anche altri Paesi del Mondo, come ad esempio l'India. Negli Stati Uniti la prevalenza si assesta intorno all'1% (come in Europa), scende intorno allo 0.6% e 0.8% , rispettivamente in Centro America e in Sud America, per fermarsi allo 0.5% del continente oceanico.

Un'area geografica del Pianeta caratterizzata da forte disomogeneità è l'Africa: i dati della prevalenza variano tra lo 0.5% dell'Egitto e l'1% della Libia, ma troviamo anche la popolazione con la più alta prevalenza di celiachia al mondo, i *Saharawi* (5-6% nell'area di confine tra Mauritania, Marocco e Algeria). Ciò può essere attribuito sia all'elevato consumo di alimenti contenenti glutine (*cous-cous*), sia a una genetica favorevole con alta prevalenza in questa popolazione di geni HLA predisponenti, associati all'isolamento forzato. I *Saharawi* vivono da più di trent'anni nei campi dei rifugiati. Per molto tempo la celiachia risultava essere un problema esclusivo dei paesi occidentali, ma oggi, come dimostrano i dati esposti, sappiamo che non è più così. Alcuni fattori - e in particolare la globalizzazione dei consumi alimentari, un fattore ambientale - hanno reso la celiachia una delle patologie croniche più diffuse, con frequenza in tutto il Mondo (Fig. 2).

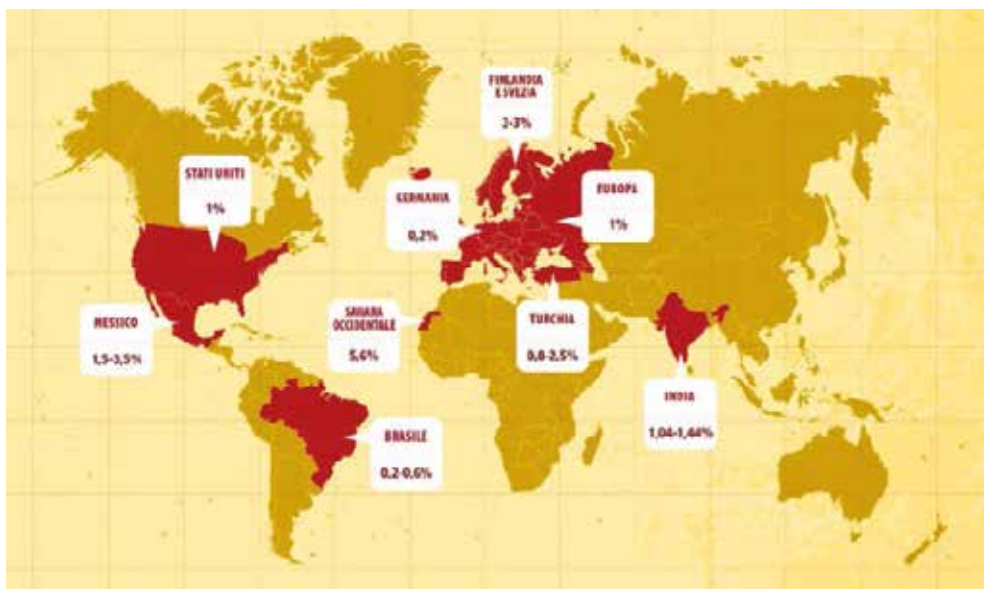


Figura 2 – Mappatura della dell'epidemiologia della malattia celiaca nel mondo.

Fonte: [http://www.drshaer-institute.com/smardedit/documents/download/dsif\\_03-2014\\_it\\_internet\\_articell\\_14-12-17.pdf](http://www.drshaer-institute.com/smardedit/documents/download/dsif_03-2014_it_internet_articell_14-12-17.pdf)

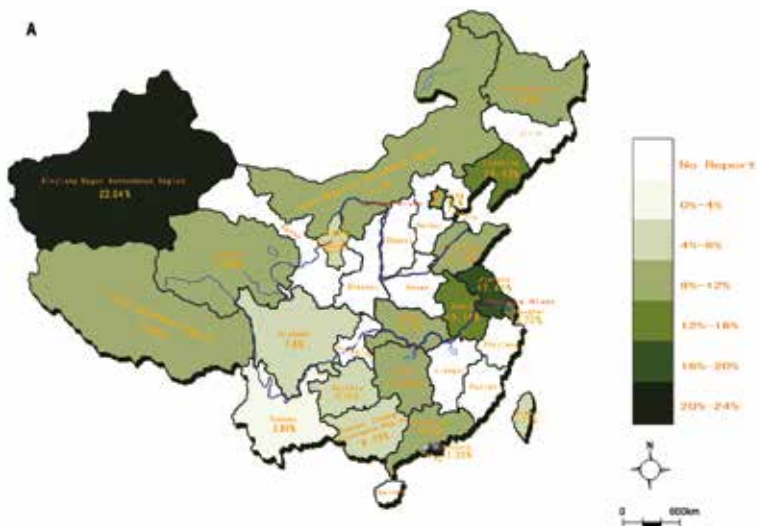
La celiachia continua ad aumentare nella popolazione globale, ma non in maniera omogenea. Questo il risultato di uno studio, recentemente pubblicato, che fa il punto sull'incidenza della celiachia in tutto il mondo, evidenziando le differenze a livello geografico (Catassi *et al.*, 2014).

Il lavoro specifica innanzitutto che l'aumento della malattia celiaca potrebbe in realtà essere dovuto al miglioramento delle tecniche di diagnosi e alla maggiore consapevolezza dell'esistenza di questa patologia: insomma, rispetto a due decenni fa, è probabile che siano aumentati solo i diagnosticati, ma che la celiachia abbia conservato all'incirca la stessa incidenza. Questo potrebbe essere il caso soprattutto dell'Europa del Nord e degli Stati Uniti, dove la celiachia è storicamente presente, ma dove si registra un aumento della sua presenza.

Lo studio esamina la diversa presenza anche in macro-aree geografiche: in Europa la celiachia colpisce in media l'1% della popolazione, ma in Svezia e Finlandia arriva fino al 3%, mentre in Germania appena allo 0,2%. L'aumento maggiore delle diagnosi è però avvenuto in Scozia, dove dal 1990 al 2009 i celiaci diagnosticati a livello pediatrico sono aumentati di 6 volte. Per quanto riguarda gli USA, nel 1975 solo lo 0,2% della popolazione era diagnosticata come celiaca, mentre nel nuovo millennio la quantità è quintuplicata.

Le ragioni di questi cambiamenti non sono chiare, ma giocano un ruolo importante le componenti ambientali: variazioni nella quantità e qualità del glutine ingerito, modelli di alimentazione nei bambini, spettro di infezioni intestinali, colonizzazione del microbiota intestinale, eccetera.

Più difficile da spiegare, invece, l'aumento di celiaci in Asia. Qui la causa potrebbe essere il cambiamento significativo delle abitudini alimentari: tradizionalmente gli asiatici hanno sempre seguito una dieta naturalmente povera di glutine, ma l'occidentalizzazione del loro cibo (con l'introduzione di pasta e pizza *in primis*, al posto del riso) ha certamente aumentato l'utilizzo di cereali contenenti glutine, soprattutto nell'alimentazione infantile, e questo potrebbe spiegare la nuova tendenza. Ricordiamo, infatti, che la celiachia si può presentare in una persona già geneticamente predisposta all'intolleranza al glutine.



Yuan J. et al., *The Tip of the “Celiac Iceberg” in China: A Systematic Review and Meta-Analysis*, Plos One 2013, DOI: 10.1371

La conoscenza dell'epidemiologia della celiachia in Asia è ancora limitata e per lo più confinata in India, dove questo disturbo viene più frequentemente riconosciuto, sia nei bambini che negli adulti. La frequenza in India sembra essere maggiore nella parte settentrionale del paese, definita “cintura celiaca”, si presume per la diversa distribuzione della coltivazione

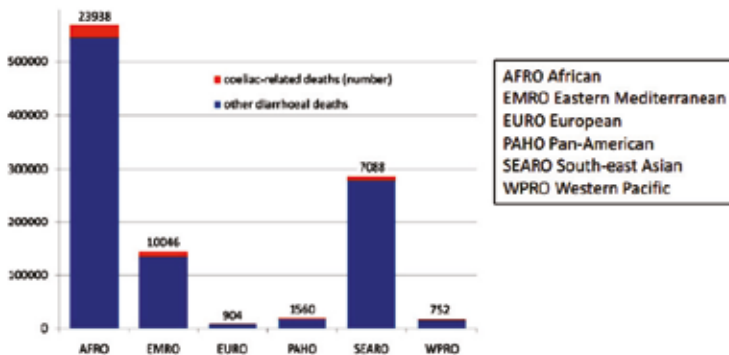
del grano e del riso tra nord e sud. Le stime parlano di 5-8 milioni di persone che dovrebbero essere affette da questa malattia in India. Infine, in paesi come Giappone, Indonesia, Corea, Filippine e molte piccole isole del Pacifico questo disturbo dovrebbe essere raro, visto il basso consumo di frumento e la bassa frequenza di genotipi predisponenti.

Per quanto riguarda l’Africa del nord e i paesi del Medio Oriente, la celiachia è presente con un tasso diagnostico ancora molto basso, soprattutto a causa della scarsa disponibilità di strutture mediche e di consapevolezza quasi inesistente. Unica eccezione in *Saharawi*, una popolazione araba che vive nel Sahara occidentale, dove la prevalenza di celiachia è eccezionalmente elevata (5.6%) per ragioni che sono finora poco chiare.

Attualmente nessun paese effettua *screening* di massa per la malattia celiaca, fatta eccezione per la piccola Repubblica di San Marino. Le principali limitazioni allo *screening* sierologico di massa sono la difficoltà di stabilire la corretta età di *screening*, la variabilità nella storia naturale di sensibilizzazione al glutine e le questioni etiche nel trattamento di soggetti con malattia celiaca clinicamente silente.

Al momento si stima dunque che oltre il 50% dei casi di celiachia rimanga per ora non diagnosticato. È tuttavia indiscutibile che i gruppi con un’alta frequenza della malattia dovrebbero essere regolarmente testati per la malattia celiaca. In questo contesto, sarà importante valutare l’efficienza di uno *screening* basato sulla determinazione rapida degli autoanticorpi o dei geni predisponenti. In conclusione, i dati disponibili suggeriscono che l’incidenza della celiachia sta aumentando e che la malattia è attualmente molto più comune in alcune aree in cui in passato era inesistente. Servono ulteriori studi anche per chiarire il ruolo dell’alimentazione nell’infanzia sullo sviluppo della malattia celiaca.

**The Global Burden of Childhood Coeliac Disease:  
A Neglected Component of Diarrhoeal Mortality?**  
Byass P et al. *PLoS ONE*. 2011;6(7): e22774.



## LA CELIACHIA IN ITALIA

La celiachia è l’intolleranza alimentare più frequente e la sua prevalenza stimata si aggira intorno all’1%. Partendo da questo dato si calcola che nella popolazione italiana il numero teorico di celiaci si aggiri intorno ai 600.000 contro i 164.492 effettivamente diagnosticati al 31.12.2013. Il Ministero della Salute redige ogni anno una relazione al Parlamento sulla celiachia (Fig. 3).

I dati di seguito riportati si riferiscono al 2013 e sono stati pubblicati nel 2014 (Ministero della Salute, 2014). I celiaci censiti in Italia al 31.12.2013 sono 164.492, solo il 27% di quelli stimati sulla base della prevalenza. Dei 164.492 celiaci, 47.837 sono maschi e 115.933 sono femmine, con un rapporto tra i sessi di 1:2. Il dato regionale è comunque molto variabile, sia come proporzione tra i sessi (che in alcuni casi può arrivare anche a 1:3) che quantitativamente in senso assoluto. Infatti le Regioni che ospitano più celiaci sono: la Lombardia con 28.611, il Lazio con 16.576 e la Campania con 15.509, registrando rispettivamente il 17,4%, il 10,1% e il 9,4%.

La popolazione celiaca sul territorio italiano nel 2013 risulta così distribuita:

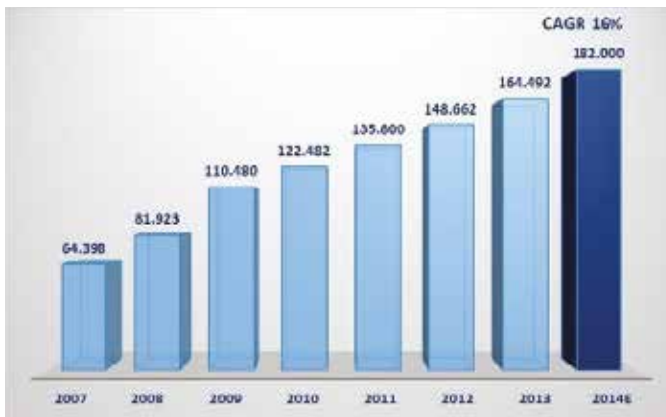
- il 46% al NORD con 76.064 celiaci
- il 22% al CENTRO con 35.955 celiaci
- il 19% al SUD con 31.873 celiaci
- il 13% nelle ISOLE con 20.600 celiaci.

Dal confronto dei dati relativi alle annualità 2011, 2012 e 2013 emerge un costante incremento del numero di celiaci in tutte le Regioni d'Italia.



Figura 3 – Relazione annuale al Parlamento sulla celiachia – anno 2013

Fonte: [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_publicazioni\\_2306\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_publicazioni_2306_allegato.pdf)



Casi di intolleranza al glutine in Italia

Fonte: [www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)

## LA DIETA DEL CELIACO

L'unico trattamento attualmente disponibile per la MC è l'esclusione totale e per tutta la vita del glutine dalla dieta (pertanto anche di prodotti integrali contenenti glutine).

La dieta senza glutine (DSG), sebbene limiti notevolmente la qualità della vita sociale del-

le persone celiache, è necessaria per ottenere la remissione dei sintomi e segni associati alla MC e prevenirne le gravi complicanze.

La DSG si compone di alimenti naturalmente senza glutine (frutta, verdura, legumi, carne, pesce, patate e altri tuberi) e alimenti appositamente formulati per celiaci con materie prime deglutinate o prive di glutine, alimenti che sono succedanei di prodotti che contengono glutine quando destinati al consumo da parte della popolazione generale (pasta, pane, prodotti da forno, *crackers*, biscotti, cereali da colazione e *snacks*).

Il contenuto di glutine di questa categoria di prodotti, che può riportare in etichetta l'indicazione nutrizionale "senza glutine", deve essere inferiore a 20 ppm (equivalente a mg/kg). In letteratura non vi è evidenza di carenze nutrizionali specifiche nei soggetti celiaci a dieta senza glutine, rispetto alla popolazione generale (Saturni *et al.*, 2010; Theethira *et al.*, 2014).

I cereali permessi nella dieta senza glutine sono mais, riso, sorgo, miglio e *teff*, accanto a pseudo-cereali quali *quinoa*, grano saraceno e manioca (Fig. 4).



Figura 4 - Esempi di cereali naturalmente privi di glutine

Fonte: <http://senzaebuono.altervista.org/celiachia-orto-del-bimbo-intollerante/>

Numerosi studi clinici hanno dimostrato che l'avena è tollerata dalla maggior parte dei soggetti celiaci in dieta senza glutine da almeno due anni e con avvenuta negativizzazione degli anticorpi anti-transglutaminasi e guarigione delle lesioni della mucosa duodenale. Tuttavia, al momento l'inclusione dell'avena nella DSG non è consigliata, in considerazione della variabilità della risposta immunitaria individuale a questo cereale e per l'incertezza che tuttora esiste riguardo la tossicità delle diverse varietà di avena (Richman, 2012; Anderson, 2014; Maglio *et al.*, 2014; Silano *et al.*, 2014).



Una scrupolosa e permanente dieta senza glutine (DSG) è l'unico trattamento ad oggi disponibile per la MC. La DSG è efficace nel determinare la remissione dei sintomi e segni dipendenti dalla malattia, la normalizzazione dei livelli plasmatici degli autoanticorpi glutine-dipendenti e delle lesioni della mucosa duodenale. La DSG inoltre, è uno strumento efficace nel prevenire le complicanze associate.

Quindi i soggetti celiaci devono evitare cibi a base di **grano, segale ed orzo**. I cereali che non contengono glutine (e inseriti in una DSG) sono **mais, riso, sorgo, miglio e teff**. Sono ugualmente privi di glutine alcuni pseudo-cereali, quali **amaranto, quinoa, grano saraceno e manioca (tapioca)**.

Inoltre, **sono naturalmente privi di glutine: verdure ed ortaggi, frutta, tuberi, legumi, carne, pesce e uova**. La *compliance* alla DSG deve essere rigorosa: va evitata l'assunzione volontaria di glutine anche saltuariamente e in piccole dosi, nonché in assenza di sintomi e/o segni propri della MC subito dopo l'assunzione di glutine.

Riguardo alle contaminazioni (presenza non voluta di tracce di glutine in alimenti che ne sono naturalmente privi in seguito al passaggio accidentale durante processi di conservazione e preparazione domestica e/o nella ristorazione collettiva), l'atteggiamento da tenere deve essere di attenzione, evitando comportamenti troppo restrittivi.

#### Cereali e pseudo-cereali senza glutine



*Manioca esculenta*  
(Manioca o Tapioca)



*Zea mays*  
(Mais)



*Fagopyrum esculentum*  
(Grano saraceno)



*Chenopodium quinoa*  
(Quinoa)



*Amarantus tricolor*  
(Amaranto)



*Oryza sativa*  
(Riso)



*Sorghum vulgare*  
(Sorgo)



*Panicum miliaceum*  
(Miglio)



*Eragrostis teff*  
(Teff)

La DSG prevede il consumo, oltre che di alimenti naturalmente privi di glutine, di prodotti alimentari appositamente formulati per celiaci. Questi sono succedanei di alimenti per l'uso comune, in cui la presenza di cereali contenenti glutine è caratterizzante e prevalente, se non esclusiva e che sono stati prodotti con materie prime prive di glutine o private del glutine. Questi ultimi possono riportare in etichetta l'indicazione nutrizionale volontaria "senza

glutine”. La stessa dicitura è permessa per gli alimenti confezionati e/o lavorati che, pur non essendo caratterizzati dalla sostituzione di cereali contenenti glutine con quelli che ne sono privi, non contengono glutine come ingrediente.

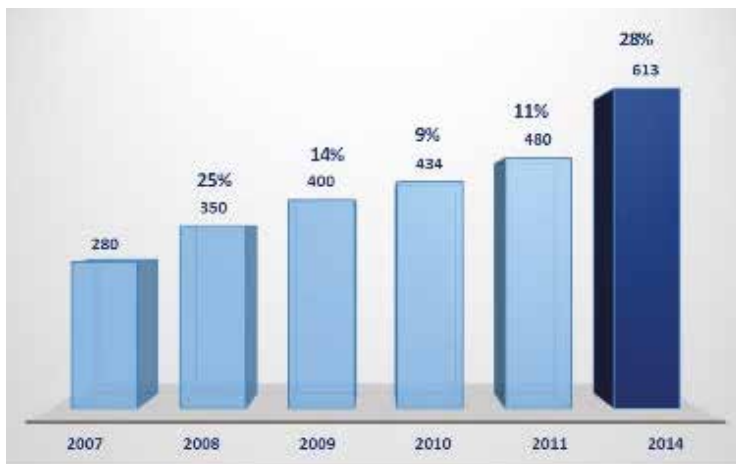
**Per poter riportare l’indicazione “senza glutine” in etichetta, un prodotto alimentare deve avere un contenuto di glutine inferiore a 20 parti per milione (ppm).**

Il limite di 20 ppm per i prodotti per celiaci permette un consumo di questi prodotti in quantità rilevanti, senza che si superi il limite giornaliero di sicurezza di 10 mg/die (Catasì *et al.*, 2007; Gibert *et al.*, 2013). I prodotti con contenuto di glutine inferiore a 100 ppm sono qualificati come prodotti “a basso contenuto di glutine”. Nonostante le limitazioni che influenzano la qualità di vita delle persone celiache, la DSG può fornire un apporto vario, bilanciato e completo di nutrienti, vitamine e minerali.

Gli individui celiaci in trattamento dietetico presentano a regime un’assunzione inferiore alle quantità raccomandate di fibre, calcio, folati e vitamina B<sub>12</sub>, mentre non ci sono evidenti differenze tra la dieta libera e la DSG riguardo all’apporto di energia e di macronutrienti. La carenza di fibre è dovuta alla difficoltà di inserire nella dieta cereali integrali. Non è comunque necessario assumere integratori di particolari nutrienti, se si segue una DSG varia ed equilibrata (Theethira *et al.*, 2014).

L’elevato indice glicemico degli alimenti senza glutine (e il fatto che spesso, nei prodotti in commercio, la privazione del glutine viene compensata da un maggior quantitativo di zuccheri, grassi e proteine) se in eccesso può risultare problematico soprattutto nelle situazioni di necessità di controllo del peso.

Non è infrequente, quindi, che il paradigma malattia celiaca che corrisponde a magrezza e malnutrizione sia invece declinato anche con la compresenza di sovrappeso, soprattutto in età pediatrica (Diamanti *et al.*, 2014). Diventa perciò fondamentale associare alla dieta priva di glutine per la gestione della MC anche un *follow up* nutrizionale adeguato, che favorisca la riduzione della sintomatologia, unitamente alla normalizzazione del peso.



*Aziende che producono alimenti gluten-free in Italia*

[www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)

Il Registro Nazionale dei prodotti senza glutine erogati gratuitamente dal Servizio Sanitario Nazionale sotto forma di assistenza sanitaria integrativa, di cui all’art. 7 del DM 8 giugno 2001, comprende una lista di alimenti con un residuo massimo di glutine inferiore a 20 mg/

kg. Tale diritto spetta ai soggetti intolleranti al glutine previa diagnosi di celiachia effettuata secondo i criteri e le modalità indicati dallo stesso DM del 2001.

Gli stabilimenti e/o i laboratori nazionali che producono e/o confezionano alimenti senza glutine devono essere preventivamente autorizzati. L'autorizzazione in forma di riconoscimento, secondo quanto previsto dall'art. 6 comma 3 lettera a) del Regolamento (CE) 852/2004, è demandata alle Regioni ai sensi del DL 13 settembre 2012, n. 158, recante "Disposizioni urgenti per promuovere lo sviluppo del Paese mediante un più alto livello di tutela della salute", convertito successivamente con Legge 8 novembre 2012, n.189.

Tale riconoscimento richiede il preventivo accertamento della sussistenza delle condizioni igienico-sanitarie e dei requisiti tecnici previsti dai Regolamenti (CE) 852/2004 e (CE) 853/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari, dal DM 23 febbraio 2006 "Requisiti tecnici e criteri generali per l'abilitazione alla produzione e al confezionamento di integratori alimentari", nonché della disponibilità di un idoneo laboratorio per il controllo dei prodotti" ai sensi dell'art. 10 del decreto legislativo 111/92.

I prodotti senza glutine erogati dal S.S.N. possono essere contraddistinti in etichetta dal logo verde qui riportato solo dopo aver terminato l'iter di riconoscimento e di notifica dell'etichetta.

È possibile consultare il Registro dei prodotti senza glutine direttamente sul sito del Ministero della salute all'indirizzo:

[http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?id=3667&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=registri](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=3667&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=registri).



## CELIACHIA E "GLUTEN SENSITIVITY"

Fino a pochi anni fa la quasi totalità del mondo scientifico che si occupava di gastroenterologia era convinta che il glutine avesse effetti negativi solo nella MC. Pertanto, accadeva che se una persona lamentava problemi addominali, meteorismo, diarrea, ecc..., ma i valori delle transglutaminasi erano negativi e i villi integri, gli veniva detto che non era celiaca e che poteva continuare ad assumere glutine senza problema.

Negli ultimi anni stiamo assistendo a numerose ricerche volte a considerare la tossicità del glutine anche in soggetti non celiaci. In poche parole, una vera e propria intolleranza al glutine, diversa dalla Malattia Celiaca. In realtà, sarebbe più corretto chiamarla "ipersensibilità al glutine" o *Gluten Sensitivity* (GS), come la definiscono i ricercatori.

Lo spettro dei disordini correlati al glutine si è arricchito negli ultimi tempi di questa nuova condizione morbosa che va ad aggiungersi alla celiachia ed all'allergia al grano, conosciute da tempo (Fig. 5).

A differenza dell'allergia al grano e della celiachia, che sono malattie ben definite con criteri diagnostici universalmente accettati, la "*Gluten Sensitivity*" rappresenta una nuova entità, i cui criteri diagnostici sono ancora oggetto di definizione e discussione (Sapone *et al.*, 2012).

La "*Gluten Sensitivity*" si caratterizza sul piano clinico per una sintomatologia che si manifesta in seguito all'assunzione di glutine, caratterizzata da sintomi gastrointestinali (meteorismo, dolori addominali, diarrea o stipsi (o alvo alterno) ed extraintestinali (sonnolenza, difficoltà di concentrazione, annebbiamento mentale, cefalea, artromialgie, parestesie degli arti, rash cutanei tipo eczema, depressione, anemia, stanchezza cronica). Tale quadro clinico va in remissione con l'eliminazione del glutine dalla dieta. La risposta alla sottrazione del glutine è in genere rapida e porta ad un significativo miglioramento clinico nel giro di pochi giorni (Sapone *et al.*, 2011).



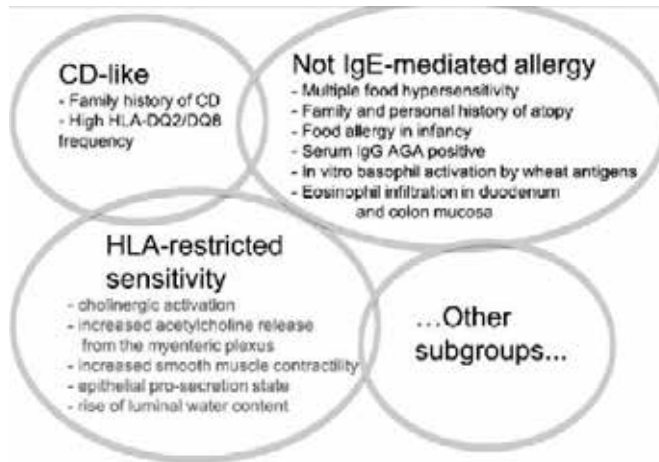


Figura 5 - Gruppi di pazienti con ipersensibilità al glutine non riconducibile alla malattia celiaca

Fonte: Mansueto et al., 2014

La *Gluten Sensitivity* si manifesta dall'età adolescenziale all'età adulta, mentre è estremamente rara in età pediatrica. A parte il quadro clinico appena descritto con sintomi, che, ad onor del vero, sono spesso molto simili a quelli dell'allergia al grano e della celiachia, la diagnosi di *Gluten Sensitivity* è al momento una diagnosi di esclusione, caratterizzata dalla negatività dei *test* immunologici per l'allergia al grano, dalla negatività per la sierologia tipica per celiachia e da una biopsia intestinale normale o con alterazioni minime. L'ipersensibilità al glutine non dispone al momento di marcatori anticorpali specifici atti ad identificare questa condizione e l'unica alterazione immunologica che è possibile ritrovare nei pazienti con sensibilità al glutine è la positività per anticorpi antigliadina di prima generazione (gli AGA), che vengono ritrovati positivi nel 40-50% dei pazienti con *Gluten Sensitivity* (Biesiekierski JR *et al*, 2011).

Da tempo gli studiosi delle patologie da glutine si erano accorti dell'esistenza di una condizione di sensibilità al glutine in assenza di criteri diagnostici compatibili con una condizione di allergia al grano o di celiachia, ma questi pazienti sono rimasti per molti anni in un vero e proprio limbo, venendo spesso considerati dei pazienti affetti da sindrome dell'intestino irritabile o con problematiche di tipo psicologico ed ansioso-depressivo oppure pazienti da sorvegliare per il possibile sviluppo in futuro di celiachia.

La differenza sostanziale è che nei soggetti celiaci il glutine attiva un meccanismo autoimmune, mentre nella "sensibilità al glutine" la risposta alla ingestione di glutine determina un meccanismo immune innato, senza alcun coinvolgimento di una risposta del sistema immunitario adattativo.

Lo sviluppo di queste nuove conoscenze consente di caratterizzare ulteriormente la *Gluten Sensitivity* come un'entità nosologica ben definita. È chiaro che c'è ancora sicuramente molto lavoro da fare per una definizione corretta di tutti i parametri clinici, immunologici e genetici della *Gluten Sensitivity*.

L'interesse per la *Gluten Sensitivity* è in continuo aumento, come testimoniato dalla "First International Consensus Conference on Gluten Sensitivity" tenutasi a Londra nel 2011, dove un *Panel* di esperti internazionali ha cercato di fare chiarezza.

Il Panel di esperti ha redatto come documento conclusivo della conferenza: “*Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification*”. Gli Autori con questo documento hanno dato una definizione a tutte le situazioni cliniche note correlate al glutine, hanno analizzato i dati epidemiologici, gli aspetti clinici e l’iter diagnostico corretto.



Negli USA è stato osservato negli ultimi tre anni un netto aumento di vendita di prodotti industriali senza glutine, in buona parte sostenuto da una autoprescrizione da parte di soggetti che hanno autonomamente stabilito di avere necessità di una dieta senza glutine.

Questo incremento è stato misurato fra il 15% ed il 25% e suggerisce alcune riflessioni, vista anche la grande pressione pubblicitaria che si sta osservando in Italia sulla vendita dei prodotti senza glutine destinati alla popolazione generale. Infatti è vero che molto di più si sta scoprendo sulle reazioni avverse al glutine e che sono aumentate le diagnosi sia di malattia celiaca che di *Gluten sensitivity*, rendendo molto più variegato e complesso il mondo delle reazioni avverse al glutine. Però sta aumentando un uso inappropriato di alimenti speciali, prevalentemente su base autoprescrittiva senza alcun iter diagnostico a priori che lo giustifichi.

Vale la pena ribadire che la dieta senza glutine non è una moda. La dieta senza glutine non è “più leggera” né dimagrante: è l’unica terapia oggi riconosciuta per la celiachia, una malattia sistemica cronica scatenata dall’ingestione di cereali contenenti glutine in chi è geneticamente predisposto.

## CELIACHIA, ALLATTAMENTO AL SENO E PRATICHE DI ALIMENTAZIONE INFANTILE

Le pratiche di alimentazione infantile, unitamente all’allattamento al seno prolungato, sono state sempre considerate un fattore di protezione per l’insorgenza della malattia celiaca. Pastine e biscotti dovevano infatti essere introdotti nelle pappe dei bambini gradualmente dopo i 6 mesi, possibilmente continuando a somministrare il latte materno.



Due grossi lavori (Lionetti *et al.*, 2014; Vriezinga *et al.*, 2014) hanno recentemente rivisto questi assunti, dando una lettura un po’ diversa della relazione tra celiachia e pratiche di alimentazione infantile.

I dati rivelano che la predisposizione genetica è il fattore principale per la celiachia: i bambini con due copie del gene HLA-DQ2 hanno il doppio della probabilità di sviluppare l’intolleranza rispetto a quelli che non le possiedono. Sono solo questi i bambini nei quali il glutine si deve introdurre il più tardi possibile; il termine di introduzione di glutine in questi casi è molto dilatato e arriva fino a 12 mesi.

L'introduzione molto tardiva di glutine nei bambini ad alto rischio aiuta a prevenire la celiachia specificatamente in questo gruppo di popolazione. Invece nei bambini senza una predisposizione genetica forte alla celiachia, il momento in cui il glutine entra nella pappa non influisce sulla probabilità di ammalarsi.

Gli studi (e questo è un dato abbastanza sorprendente) ci dicono anche che l'allattamento al seno - che pure è protettivo per molte altre ragioni - non dà una protezione aggiuntiva per la malattia celiaca. Questo dunque può rassicurare chi non può o non vuole allattare in quanto l'allattamento artificiale non è un fattore di rischio specifico che influenza in qualche modo la possibilità di diventare celiaci.

È evidente dunque che, tra i diversi fattori studiati, il *background* genetico è di gran lunga l'elemento più importante nel determinare quali bambini potrebbero sviluppare la condizione autoimmune che determina la malattia celiaca.

Perciò sarebbe molto utile riuscire a individuare precocemente questi bambini. In effetti, basterebbe un semplice *test* del sangue per l'identificazione del genotipo HLA, che permetterebbe rapidamente di evidenziare i bambini "ad alto rischio". La diagnosi precoce risulta estremamente utile per l'attuazione di strategie mirate di prevenzione primaria, che possono partire dall'introduzione tardiva del glutine (seguita da *screening* successivo per scongiurare possibilmente la comparsa della patologia), ma anche diagnosticare il problema molto presto, quando non si sono avuti effetti negativi sullo sviluppo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Abadie V, Jabri B., IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology, *Immunol. Rev.* 2014, 260(1), 221-34.
- 2) Anderson OD., The spectrum of major seed storage genes and proteins in oats (*Avena sativa*), *PLoS One* 2014, 23, 9.
- 3) Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM, Barrett JS, Haines M, Doecke JD, Shepherd SJ, Muir JG, Gibson PR., Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial, *Am. J. Gastroenterol.* 2011, 106, 508-514.
- 4) Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F, Mandolesi A, Bearzi I, Fasano A., A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 85, 160-166.
- 5) Catassi C, Fasano A., Celiac disease, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008, 24, 687-691.
- 6) Catassi C, Gatti S, Fasano A, "The New Epidemiology of Celiac Disease", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014, Jul 59, Suppl 1:S 7-9.
- 7) Ciccocioppo R, Finamore A, Ara C, Di Sabatino A, Mengheri E, Corazza GR., Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease, *Am. J. Clin. Pathol.* 2006, 125(4), 502-511.
- 8) Corrao G, Corazza GR, Bagnardi V, Brusco G, Ciacci C, Cottone M, Sategna Guidetti C, Usai P, Cesari P, Pelli MA, Loperfido S, Volta U, Calabró A, Certo M; Club del Tenue Study Group, Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study, *Lancet* 2001, 4, 358 (9279):356-61.
- 9) Diamanti A, Capriati T, Basso MS, Panetta F, Di Ciommo Laurora VM, Bellucci F, Cristofori F, Francavilla R., Celiac disease and overweight in children: an update, *Nutrients* 2014, 2, 6 (1):207-20.
- 10) Fasano A. Celiac disease-how to handle a clinical chameleon, *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 2568-70.

- 11) Gibert A, Kruizinga AG, Neuhold S, Houben GF, Canela MA, Fasano A, Catassi C., Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population-based probabilistic approach to risk estimation, *Am. J. Clin. Nutr.* 2013, *97*, 109-116.
- 12) Jabri B, Kasarda DD, Green PH., Innate and adaptive immunity: the yin and yang of celiac disease, *Immunol. Rev.* 2005, *206*, 219-231.
- 13) Jabri B, Sollid LM., Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease, *Nat. Rev. Immunol.* 2009, *9*, 858-70.
- 14) Koning F, Pathophysiology of celiac disease, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014, *59* Suppl. 1:S1-4.
- 15) Lionetti E, Castellanea S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, Barbato M, Barbera C, Barera G, Bellantoni A, Castellano E, Guariso G, Limongelli MG, Pellegrino S, Polloni C, Ughi C, Zuin G, Fasano A, Catassi C; SIGENP (Italian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) Working Group on Weaning and CD Risk, Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children, *N. Engl. J. Med.* 2014, *2*, 371(14):1295-303.
- 16) Losowsky MS (2008), A history of coeliac disease, *Dig. Dis.* 2008, *26* (2).
- 17) Ludvigsson JF, Pathak J, Murphy S, Durski M, Kirsch PS, Chute CG, Ryu E, Murray JA, Use of computerized algorithm to identify individuals in need of testing for celiac disease, *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 2013, *20*, 306-310.
- 18) Maglio M, Mazzarella G, Barone MV, Gianfrani C, Pogna N, Gazza L, Stefanile R, Camarca A, Colicchio B, Nanayakkara M, Miele E, Iaquinto G, Giardullo N, Maurano F, Santoro P, Troncone R, Auricchio S., Immunogenicity of two oat varieties, in relation to their safety for celiac patients, *Scand. J. Gastroenterol.* 2011, *46*, 1194-205.
- 19) Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N., Celiac disease: an immunological jigsaw, *Immunity* 2012, *36*, 907-919.
- 20) Ministero della Salute (2014), Relazione annuale al Parlamento sulla celiachia Anno 2013, [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2306\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2306_allegato.pdf)
- 21) Richman E, The safety of oats in the dietary treatment of coeliac disease, *Proc. Nutr. Soc.* 2012, *71*(4), 534-537.
- 22) Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A., Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification, *BMC Medicine* 2012, *10*, 13.
- 23) Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, Stefanile R, Mazzarella G, Tolone C, Russo MI, Esposito P, Ferraraccio F, Carteni M, Riegler G, De Magistris L, Fasano A, Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitività, *BMC Med.* 2011, *9*, 23.
- 24) Saturni L, Ferretti G, Bacchetti T., The gluten-free diet: safety and nutritional quality, *Nutrients* 2010, *2* (1),16-34.
- 25) Silano M, Agostoni C, Guandalini S., Effect of the timing of gluten introduction on the development of celiac disease. *World J. Gastroenterol.* 2010, *28*,16(16):1939-42.
- 26) Silano M, Pozo EP, Uberti F, Manferdelli S, Del Pinto T, Felli C, Budelli A, Vincentini O, Restani P., Diversity of oat varieties in eliciting the early inflammatory events in celiac disease, *Eur. J. Nutr.* 2014, *53*, 1177-86.
- 27) Sollid LM, Jabri B., Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease, *Nat. Rev. Immunol.* 2013, *13*, 294-302.
- 28) Theethira TG, Dennis M, Leffler DA., Nutritional consequences of celiac disease and the gluten-free diet, *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, *8*, 123-9.

- 29) Theethira TG, Dennis M, Leffler DA., Nutritional consequences of celiac disease and the gluten-free diet, *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, 8(2):123-9.
- 30) Troncone R, Auricchio R, Granata V., Issues related to gluten-free diet in coeliac disease, *Curr. Opin. Clin. Nutr Metab. Care* 2008, 11(3):329-33.
- 31) Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, Castillejo G, Chmielewska A, Crespo Escobar P, Kolaček S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mummert E, Polanco I, Putter H, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Szajewska H, Werkstetter K, Greco L, Gyimesi J, Hartman C, Hogen Esch C, Hopman E, Ivarsson A, Koltai T, Koning F, Martinez-Ojinaga E, te Marvelde C, Pavic A, Romanos J, Stoopman E, Villanacci V, Wijmenga C, Troncone R, Mearin ML, Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease, *N. Engl. J. Med.* 2014. 2; 371(14):1304-15.

*Capitolo 3*  
**LATTOSIO E GLUTINE. FONDAMENTI**

GIOVANNI BANDI

In questi ultimi anni si sta notando una sempre maggior diffusione delle intolleranze alimentari, o quantomeno della consapevolezza delle stesse, riguardanti molte molecole fra le quali premezzano **Lattosio** e **Glutine**.

Questo comporta delle limitazioni negli stili di vita alimentari e spesso obbliga a rinunce verso cibi graditi al palato e consumati con piacere.

### 1. IL LATTOSIO

#### *Aspetti Chimici*

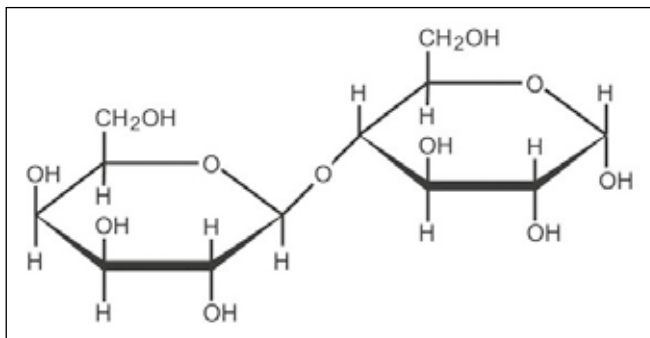
Il lattosio è un disaccaride rispondente alla formula grezza  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , costituito da una molecola di beta-D-galattosio e una di D-glucosio, legate fra di loro mediante un legame glicosidico interessante il carbonio n 1 del galattosio e il carbonio n 4 del glucosio.

Il galattosio risulta sempre beta, mentre il glucosio può essere alfa oppure beta, con maggior diffusione della forma beta; quindi la formazione dell' alfa o beta lattosio è determinata dalla forma anomeric del glucosio.

Esso può esistere in forma cristallina oppure amorfa. Ai fini della tecnologia alimentare la forma cristallina risulta dotata di migliori proprietà (ad esempio la solubilità). Nei latt in polvere questo risulta di notevole importanza ai fini di una miglior solubilità durante l'allestimento della soluzione, evitando la formazione di grumi e di galleggianti di particelle.

Inoltre sono possibili due strutture: la monoidrata e la anidra.

La monoidrata si forma per riscaldamento del latte a temperatura inferiore a  $90^{\circ}C$ , mentre l'anidra si ottiene per successivo riscaldamento.



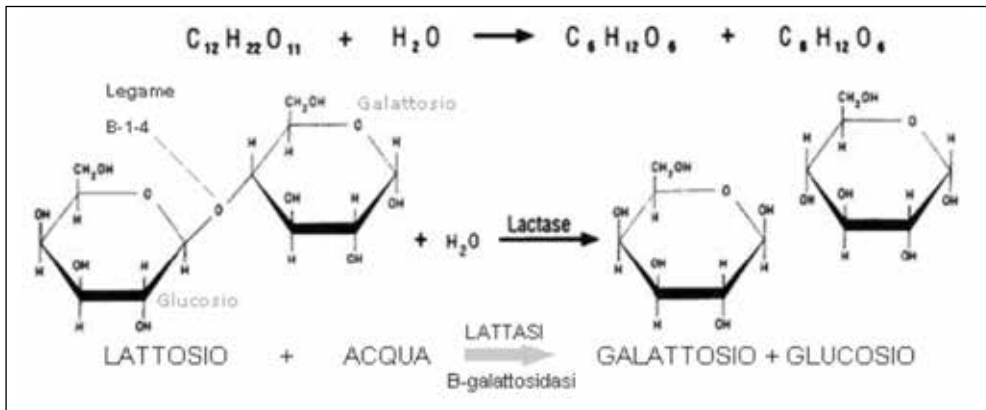
*Il Lattosio*

## Il Lattosio nella digestione

Il lattosio, al pari degli altri disaccaridi (saccarosio e maltosio), non è assorbito dai villi della mucosa intestinale; pertanto viene a prodursi una elevata pressione osmotica a livello intestinale che richiama acqua nel lume, provocando sintomi simil-lassativi. Inoltre, la presenza di disaccaridi non assorbiti provoca fermentazioni anomale con formazione di gas (anidride carbonica e idrogeno), che provocano tensione e gonfiore addominale, borborigmi e crampi; a lungo andare può manifestarsi anche dimagrimento a causa della mancata energia apportata dallo zucchero.

I soggetti intolleranti quindi sono privi dell'enzima lattasi (una beta-galattosidasi) presente sulla superficie dell'orletto a spazzola degli enterociti.

In teoria l'approccio terapeutico sarebbe quello di somministrare l'enzima lattasi con gli alimenti ed infatti attualmente sono a disposizione integratori a tal riguardo.



Azione dell'enzima lattasi ([mypersonaltrainer.it](http://mypersonaltrainer.it))

Molto diffusi negli Stati Uniti e nel Centro Europa – non ancora particolarmente in Italia - sono dunque alcuni integratori alimentari a base di lattasi, che possono essere assunti dai soggetti intolleranti al lattosio in concomitanza con l'assunzione di alimenti contenenti lo stesso.

Si tratta di polveri, capsule o compresse a base di lattasi in varie forze (normalmente tra le 3.000 e le 15.000 unità LaCU - FCC (unità dall'americano *Food Chemical Codex*). Il dosaggio è particolarmente soggettivo e viene determinato *ex adiuvantibus*, ovvero in base alla reazione del soggetto (si procede per dosi progressive o regressive fino a determinare il giusto bilancio per quantità di lattosio ingerita).



L'industria dei prodotti lattiero-caseari, invece, tratta direttamente il latte con suddetto enzima, il che provoca l'idrolisi del lattosio nei suoi due componenti monosaccaridi glucosio e galattosio entrambi assorbibili; un particolare degno di nota è il fatto che il latte così trattato risulta più dolce poiché il potere dolcificante dei monosaccaridi è superiore a quello del lattosio.

I latti così trattati assumono la denominazione "HD", dall'inglese *High Digeribility*, ovvero ad Alta Digeribilità.





## IL GLUTINE

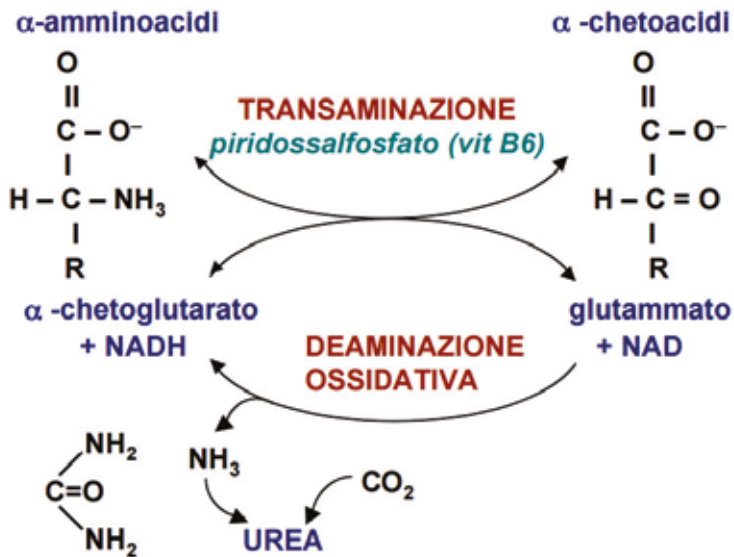
Il frumento possiede la seguente composizione:

- Amido 70%
- Lipidi 1,9%
- Fibra 2,5%
- Ceneri 1,4%
- Proteine 12%

Le gliadine e le glutenine rappresentano circa l'80% delle proteine totali.

Nei cereali in generale esse prendono il nome rispettivamente di prolamine e gluteline.

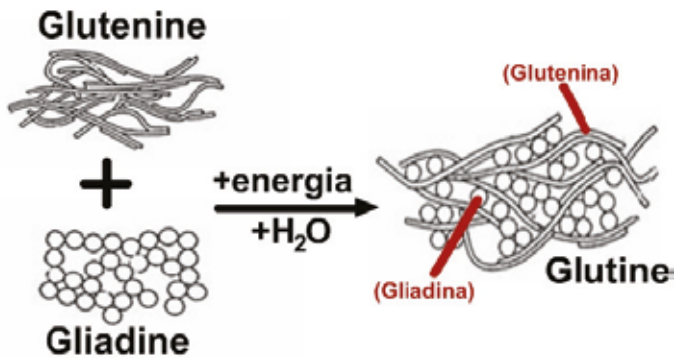
A livello biochimico nutrizionale le proteine del glutine seguono la stessa via metabolica delle altre proteine: gli aminoacidi costituenti vengono deaminati e il gruppo amminico viene trasferito all'acido alfa-chetoglutarico trasformandolo in acido glutammico; si verificano poi reazioni di transaminazione e il catabolita ammoniacale, dotato di tossicità, viene convertito in urea, eliminata con le urine.



Le proteine dei cereali sono comunque a basso valore biologico, essendo scarse o prive di aminoacidi essenziali, in particolare lisina.

| Cereale       | Tipo di prolamina | Composizione (in aminoacidi) |         |          |           | Tossicità nella celiachia |
|---------------|-------------------|------------------------------|---------|----------|-----------|---------------------------|
|               |                   | Alanina                      | Leucina | Prolina  | Glutamina |                           |
| <b>Grano</b>  | a-Gliadina        |                              |         | 17 - 23% | 36%       | ++++                      |
| <b>Orzo</b>   | Ordeina           |                              |         | 17 - 23% | 36%       | ++                        |
| <b>Segale</b> | Secalina          |                              |         | 17 - 23% | 36%       | ++                        |
| <b>Avena</b>  | Avenina           |                              |         | < 5%     | <30%      | +                         |
| <b>Mais</b>   | Zeina             | alto                         | alto    | --       | basso     | --                        |
| <b>Miglio</b> | --                | alto                         | alto    | --       | basso     | --                        |
| <b>Riso</b>   | --                | alto                         | alto    | --       | basso     | --                        |

A rigore di logica il glutine non è presente nei cereali, bensì si forma durante l'impasto dall'unione delle gliadine e glutenine; nella terminologia medica e nutrizionistica, comunque, per glutine si intendono queste proteine.



### Glutine e prodotti per celiachia



Negli alimenti destinati ai celiaci si effettua la determinazione chimica del glutine mediante il metodo ELISA all'immunofluorescenza.

Principio del metodo: il glutine è un antigene che viene riconosciuto da un anticorpo specifico; quando le due entità si incontrano, si forma un complesso stabile che può essere marcato con una sostanza fluorescente in grado di produrre una certa quantità di luce, misurando la quale si può risalire alla quantità di glutine.

Il regolamento CE 41/2009, entrato in vigore nel 2012, prevede che i prodotti riportanti la dicitura “senza glutine “ o “ *gluten free*” devono possedere un limite massimo di glutine pari a 20 mg /Kg e possono essere consumati dai celiaci in assoluta sicurezza; gli alimenti invece riportanti la dicitura “a contenuto di glutine molto basso” prevedono un limite massimo di 100 mg /Kg. I pazienti celiaci hanno diritto alla fornitura dei prodotti dieto-terapeutici da parte delle ASL di appartenenza.

In risposta a queste richieste, la ditte produttrici commercializzano pane, grissini, *crakers*, torte, biscotti e pasta utilizzando miscele di farine provenienti da cereali ammessi (riso, *mais*, grano saraceno, ecc).

La struttura dei prodotti da forno, però, a causa dell’assenza del glutine che trattiene aria e dona porosità alla pasta, risulterebbe meno soffice e meno gradevole al palato; pertanto si ovvia a questo inconveniente aggiungendo alle farine sostanze colloidali come carragenine, pectine, gomma arabica, carbossimetilcellulosa, che sostituiscono le proprietà del glutine e ritardano la *shelf-life* (letteralmente la vita del prodotto sullo scaffale, pane non rafferma).

### ***Cereali contenenti glutine***

- Frumento
- Segale
- *Kamut*<sup>®</sup> (in certi casi tollerato)
- Orzo
- Avena\*
- Farro

Un cereale risulta tanto più “tossico” per i celiaci quanto più è ricco in prolamina.

### ***Cereali e prodotti permessi ai celiaci***

- Riso
- Grano saraceno
- Miglio
- Fecola
- *Mais*
- Tapioca (manioca)
- Amaranto
- Patate
- In ricerca: Farine di grano Geneticamente Modificate (con enzima “spento”)

### ***Glutine e farine***

A livello tecnologico di panificazione, il glutine è molto importante. Infatti esso definisce la “forza“ di una farina, cioè l’attitudine a formare un reticolo tridimensionale a struttura visco-elastica atta a trattenere l’anidride carbonica che si forma durante la lievitazione ad opera degli enzimi, i quali trasformano il glucosio proveniente dall’amido in alcool etilico e anidride carbonica. La forza delle farine viene indicata con la lettera W; farine forti e ricche di glutine possiedono alti valori di W.



\* Secondo recenti studi l’avena risulta essere un cibo ammesso ai celiaci per le esigue quantità di prolamine, ma soprattutto perché la proteina avenina (prolammina) risulta contenere basse dosi di prolina e di glutamina, responsabili dell’intolleranza.

## Capitolo 4 IL PROBLEMA DELLE INTOLLERANZE AL LATTOSIO E AL GLUTINE\*

CLAUDIO MACCA

### 1. INTOLLERANZA AL LATTOSIO

Il Lattosio, un disaccaride naturale che costituisce il principale zucchero del latte, viene idrolizzato nella mucosa intestinale, durante i normali processi digestivi, nei suoi due monosaccaridi costituenti, cioè il galattosio e glucosio, che verranno poi assorbiti e metabolicamente utilizzati come fonti energetiche.

Nell'intolleranza al lattosio, sono ridotti i livelli di attività dell'enzima chiave idrolitico intestinale, noto come  $\beta$ -galattosidasi o lattasi.<sup>1,2</sup>

In tale condizione, il lattosio non idrolizzato in galattosio e glucosio, non può essere assorbito nel piccolo intestino; il lattosio indigerito quindi passa nel colon dove un gran numero di batteri della flora intestinale del colon metabolizzano il lattato a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , e  $\text{H}_2\text{O}$ .<sup>1</sup>

Da ciò derivano i sintomi tipici dell'intolleranza al lattosio: crampi addominali, flatulenza e diarrea schiumosa.<sup>1,2</sup>

I sintomi variano di intensità a seconda della quantità di lattosio ingerita, delle caratteristiche individuali e dei livelli intestinali di attività di  $\beta$ -galattosidasi.

L'intolleranza al lattosio colpisce molte persone nel mondo; mentre solo il 6-12% dei caucasici ne è affetto.<sup>4</sup>

L'intolleranza al lattosio è molto più diffusa in altri gruppi etnici e razze, colpendo dal 60 al 90% di greci, arabi, ebrei, afro-americani, ispanici, giapponesi ed asiatici.<sup>1,2</sup>

Sebbene l'intolleranza al lattosio tenda a peggiorare con l'avanzare dell'età e sia spesso più comune e più grave tra gli anziani, può avere il suo esordio a qualsiasi età, con manifestazioni cliniche già presenti a soli tre anni di vita.<sup>2,3</sup>

Il livello di attività della  $\beta$ -galattosidasi è solitamente sufficiente alla nascita per permettere la digestione del lattosio contenuto nel latte materno.<sup>1</sup> Tuttavia, gli individui nati con deficienza ereditaria di  $\beta$ -galattosidasi subiscono un calo nell'attività dell'enzima man mano che invecchiano. Ad un certo punto, i sintomi cominciano a svilupparsi in seguito al consumo di prodotti lattiero-caseari contenenti lattosio a livelli che superano il punto di saturazione della attività enzimatica.

L'intolleranza al lattosio si può anche manifestare dopo un'infezione o un'altra malattia intestinale, come, per esempio, una gastroenterite virale. In questo caso l'intolleranza al lattosio è una malattia a breve termine, perché i livelli di attività enzimatica possono recuperare fino ai livelli originali precedenti la malattia.<sup>4</sup>

Il test di tolleranza al lattosio (LTT) è solitamente usato come base per una diagnosi clinica di intolleranza. LTT prevede la somministrazione *per os* di 50 g di lattosio nel soggetto a digiuno con il monitoraggio dei livelli di glucosio nel sangue o respirando idrogeno dopo una



\* I numeri in apice sono riferiti ai lavori citati in bibliografia.

prova per determinare se il lattosio viene assorbito, controllando anche i sintomi gastrointestinali.<sup>1,5</sup>

Se con LTT viene stabilita con certezza l'intolleranza al lattosio, la dose somministrata è tuttavia abbastanza alta al punto da non permettere di stabilire il grado di intolleranza al lattosio. Infatti, pochi individui potrebbero ingerire 50 g di lattosio in un solo pasto sulla base di questa osservazione.

Newcomer ha concluso che in realtà solo il 19% degli individui con *deficit* di lattasi sarebbe intollerante all'ingestione di circa 240 ml di latte contenente 12 g di lattosio.<sup>18</sup>

Conseguentemente, alcuni medici hanno sostenuto l'importanza dell'uso di dosi più basse di lattosio nella diagnosi di intolleranza. L'uso di dosi progressivamente crescenti di lattosio, mentre da un lato rappresenterebbe forse una procedura diagnostica noiosa, contribuirebbe tuttavia a chiarire il grado di intolleranza a varie dosi di lattosio; ciò anche in considerazione del fatto che l'intolleranza al lattosio ha una certa variabilità nel corso della vita: infatti l'intolleranza al lattosio peggiora con l'età in soggetti affetti da *deficit* di  $\beta$ -galattosidasi.<sup>5</sup>

Una diagnosi differenziale accurata è importante nella valutazione dell'eventuale intolleranza al lattosio; infatti, poiché il lattosio non può essere responsabile di tutti i casi di intolleranza al latte, un'altra possibilità è l'intolleranza al latte vaccino.

Vi sono soggetti che, pur individuati con normale capacità di tolleranza al lattosio, come dimostrato da LTT, tuttavia sperimentano gli stessi sintomi di soggetti intolleranti al lattosio quando testati con 8-12 ml di latte vaccino.

In tali casi si è ipotizzato che sostanze diverse dal lattosio del latte possano essere responsabili di alcuni casi di intolleranza al latte.<sup>6</sup>

Una possibile spiegazione potrebbe essere l'intolleranza alle proteine del latte vaccino, una malattia ben definita e caratterizzata da allergia al latte vaccino IG mediata, in cui i sintomi si evidenziano con un inizio ritardato di alcune ore.<sup>7,8</sup>

Molti individui con intolleranza al lattosio sono in grado di controllare i loro sintomi evitando l'assunzione di prodotti lattiero-caseari contenenti lattosio; tuttavia le modalità con cui evitare i prodotti lattiero-caseari dipendono molto dal grado individuale di tolleranza al lattosio.

Infatti alcuni individui intolleranti al lattosio possono essere intolleranti all'assunzione dei 50 g di lattosio contenuto nel LTT, ma poi essere tolleranti a quantità inferiori di lattosio presente nella maggior parte dei prodotti lattiero-caseari.

Esistono quindi anche delle alternative dietetiche per i soggetti con i più alti gradi di intolleranza al lattosio: alcuni di loro saranno infatti in grado di tollerare piccole quantità latte, ma in dosi refratte.





Nella grande distribuzione commerciale è disponibile latte con lattosio idrolizzato. Questo prodotto è efficace, ma spesso il suo sapore è dolce e oltre i limiti di accettabilità.<sup>9</sup>

In alternativa l'aggiunta di  $\beta$ -galattosidasi al latte prima del consumo sembra essere efficace poiché, verosimilmente, l'enzima mantiene la sua attività e idrolizza il lattosio ingerito nell'intestino.<sup>10</sup>

Martini e Savaiano hanno dimostrato che la tolleranza per il lattosio aumenta quando il lattosio è consumato con un pasto. Poiché lo yogurt e il latte con batteri acidofili contengono colonie attive con attività  $\beta$ -galattosidasi, soggetti intolleranti sembrano essere più sensibili di altri a questi prodotti lattiero-caseari.<sup>11,12</sup>

Il livello di attività della lattasi varia da una marca ad un'altra di yogurt, in maniera tale che alcuni marchi sono meglio tollerati di altri.<sup>15</sup>

Dal momento che i latticini sono un'importante fonte di calcio oltre che di importanti sostanze con caratteristiche nutrizionali, è estremamente consigliabile l'introduzione di latte e latticini anche nella dieta di soggetti ad essi intolleranti. Infatti Bing *et al.*, hanno dimostrato che diete con l'esclusione di latte e latticini possono determinare osteoporosi.<sup>5</sup>



L'obiettivo principale dovrebbe dunque essere quello di determinare il livello di tolleranza al lattosio per ogni individuo sensibile e costruire una dieta che permetta di ottenere il massimo beneficio e godimento dei prodotti lattiero caseari, onde evitare carenze dal punto di vista nutrizionale.

**Manifestazioni cliniche** - I sintomi di intolleranza al lattosio comprendono dolore addominale, gonfiore, flatulenza e diarrea.<sup>15,16</sup> Inoltre, gli adolescenti possono avere sintomi di vomito. Il dolore addominale può essere di tipo crampiforme ed è spesso localizzato nella zona periombelicale o ai quadranti inferiori. Le feci sono di solito abbondanti, schiumose e/o acquose. L'esame obiettivo evidenzia borborigmi, suscitati dalla palpazione, e avvertiti anche dal paziente.



Vi è, tuttavia, una notevole variabilità di sintomi tra pazienti intolleranti al lattosio<sup>14</sup>. Pasti ad alto contenuto in grassi e con elevata osmolalità rallentano lo svuotamento gastrico e riducono la gravità dei sintomi lattosio-indotti. Gli individui con più rapido transito di lattosio al cieco sono generalmente più sintomatici, e il quadro clinico è influenzato dalla sensibilità individuale alla distensione addominale causata da gas o da afflusso di acqua nel lume dell'intestino tenue per la presenza di lattosio non digerito.<sup>17</sup>

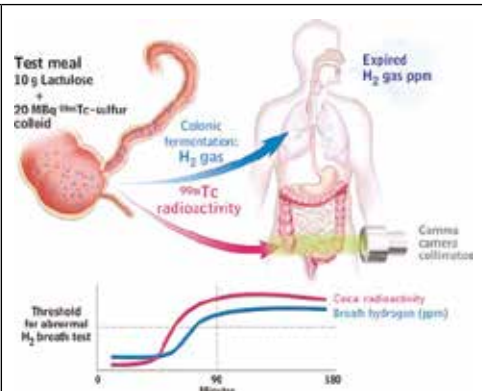
**I risultati di laboratorio** - Pazienti con intolleranza al lattosio hanno feci con *gap* osmotico superiore a 125 mOsm/kg per la presenza di carboidrati non assorbiti nel lume intestinale e un pH fecale < 6 da fermentazione batterica del lattosio nel colon; si deve peraltro rammentare che questi risultati non sono tuttavia specifici per un malassorbimento di lattosio.

### Approccio diagnostico

La diagnosi di intolleranza al lattosio dovrebbe essere presa in considerazione nei pazienti con gonfiore, flatulenza, dolore addominale, e/o diarrea cronica. Una diagnosi presuntiva di intolleranza al lattosio si può fare in pazienti con sintomi lievi che si verificano con una significativa ingestione di lattosio (ad esempio, > 2 porzioni di latticini / giorno o > 1 dose in dose unica non associata ad un pasto) e risolvere dopo cinque a sette giorni di evitamento di alimenti contenenti lattosio, con significativa recidiva al *re challenge*.<sup>17</sup> Si deve quindi eseguire un *Breath Test* del lattosio con idrogeno espirato per stabilire la diagnosi di intolleranza in soggetti che dovrebbero tenere una dieta priva di latte e latticini, specie se hanno bassa probabilità di essere lattasi-privi su base etnica (per esempio, caucasica); i soggetti con sintomi gravi o che persistono nonostante una dieta priva di lattosio dovrebbero sottoporsi a una valutazione per escludere altre cause.

#### Breath Test al lattosio

È semplice da eseguire, non invasivo, e ha sensibilità e specificità superiori al *test* dell'assorbimento<sup>18,19</sup>, rispettivamente del 78 e 98 per cento.<sup>20</sup> Si esegue somministrando lattosio *per os* a digiuno alla dose di 2 g/kg (dose massima 25 g). L'idrogeno nel respiro viene campionato ad intervalli di 30 minuti dopo l'ingestione di lattosio per un periodo di tre ore, confrontando poi i valori post-lattosio e di base. Generalmente si considera normale un valore idrogeno espirato di 10 ppm (parti per milione). Valori compresi tra 10 e 20 ppm possono essere definiti non significativi a meno che non siano accompagnati da sintomi, mentre valori superiori a 20 ppm sono considerati diagnostici di malassorbimento del lattosio. Nella maggior parte dei pazienti, il picco si verifica tra 90 e 120 minuti, quindi il *test* può essere ridotto se necessario, senza raggiungere le tre ore di durata. Il fumo di sigaretta o esercizio fisico sufficiente a produrre iperventilazione possono influenzare l'accuratezza del *test* e dovrebbero essere evitati per due ore prima del *test*. Risultati falsi-positivi si osservano con un inadeguato digiuno prima della prova, mentre falsi negativi si osservano dopo uso recente di antibiotici, in pazienti con malattia polmonare, o in circa l'1% di soggetti non produttori di idrogeno.



### Test di Tolleranza al Lattosio

La capacità di assorbimento del lattosio può essere misurata con un *test* di assorbimento lattosio, ma il *test* è lungo, richiede tempo, ed è stato ampiamente sostituito con il *Breath Test* al lattosio. Dopo somministrazione orale di una dose prova di 50 g negli adulti (o 2 g/kg nei bambini), i livelli di glucosio nel sangue sono misurati a 0, 60, e 120 minuti. Un aumento del glucosio nel sangue inferiore a 20 mg/dL (1,1 mmol/L) più lo sviluppo dei sintomi sono diagnostici. Falsi-negativi si osservano in pazienti con diabete o eccesso di proliferazione batterica intestinale, mentre un alterato svuotamento gastrico può portare a risultati spuri, poiché il glucosio nel sangue può essere relativamente più elevato con un rapido svuotamento e ridotto con ritardato svuotamento gastrico. Negli adulti, il *test* di tolleranza al lattosio ha una sensibilità e una specificità rispettivamente del 75 e del 96%.<sup>18</sup>

### Altri Test

Altri *test* per malassorbimento del lattosio, se disponibili, hanno dei limiti e sono raramente eseguiti.

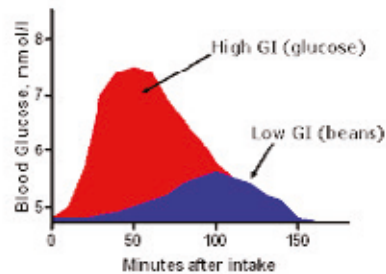
#### Biopsia dell'intestino tenue

- La biopsia digiunale consente di valutare l'attività dell'enzima lattasi, e può essere utilizzata per distinguere intolleranza al lattosio primaria da quella secondaria tramite l'istologia del piccolo intestino. Mentre il dosaggio della attività della lattasi è considerato il *gold standard* per la diagnosi di malassorbimento del lattosio, la biopsia del piccolo intestino è di fatto effettuata raramente, a causa della necessità di effettuare una endoscopia alta dell'intestino e vista ormai la disponibilità di *test* diagnostici non invasivi. Inoltre, una bassa attività lattasi indotta da una lesione intestinale può essere misconosciuta se la lesione è focale o a chiazze.

#### Test genetico per il malassorbimento primario del lattosio

- Per la diagnosi sono stati sviluppati diversi metodi per rilevare il genotipo C/T-13910, tra cui *minisequencing*, digestione enzimatica, *Polymerase Chain Reaction-rflp* (PCR-RFLP) *-genotyping* e *-pyrosequencing*. Il sequenziamento è il metodo più affidabile per rilevare tutte le varianti conosciute finora in pazienti da popolazioni multietniche. L'età dovrebbe essere presa in considerazione nelle interpretazioni dei risultati nei bambini. I *test* genetici hanno una sensibilità e specificità per la non persistenza della lattasi del 93 e 100 per cento, rispettivamente, il che è paragonabile alla precisione dei *test* di prova di tolleranza e del *Breath Test* al lattosio. Tuttavia i *test* genetici sono costosi e possono non essere utili per pazienti di origine africana.<sup>23,24</sup>

### Glycemic Index



Il *Quick Lactase Test* BIOHIT (Helsinki, Finland) è basato su una biopsia per la diagnosi di ipolattasi duodenale in endoscopia gastrointestinale superiore (Kuokanen M. e Coll., 2006). Il campione, incubato per 20 minuti in piastra con lattosio, sviluppa in caso di idrolisi dello zucchero (= presenza dell'enzima lattasi), un colore giallo, mentre negli individui intolleranti questo non si verifica.



### Esclusione di altre cause

Sovente è necessario, per la comparsa di sintomi gastrointestinali dopo assunzione di latte, escludere una causa secondaria. I bambini con intolleranza al lattosio dovrebbero essere valutati per escludere una causa di secondarietà (*overgrowth* batterico, infezione enteritica, giardiasi, danno della mucosa intestinale da celiachia, malattia infiammatoria cronica intestinale, enterite da farmaci o radiazioni). Tuttavia, la scelta dei *test* diagnostici deve essere deciso sulla base del quadro clinico complessivo del paziente.

**Diagnosi differenziale** - I sintomi di intolleranza al lattosio non sono specifici.<sup>16,18,25</sup> La diagnosi differenziale della diarrea con altre cause che non la intolleranza al lattosio comprende la diarrea osmotica e l'intolleranza ad altri componenti nel latte.

La diarrea osmotica può essere causata da maldigestione di carboidrati semplici (ad esempio, sorbitolo, mannitolo), l'ingestione di grandi quantità di zuccheri con limitata capacità di assorbimento (ad esempio, fruttosio), e inibitori terapeutici dell'assorbimento dei carboidrati (ad esempio, acarbose). Il sospetto diagnostico, posto sulla base di una dettagliata anamnesi alimentare, viene confermato, o meno, dal *BreathTest* in grado di identificare specifiche forme di malassorbimento dei carboidrati (come il fruttosio o saccarosio), non standardizzati e quindi non routinariamente eseguiti nella pratica clinica.

Farmaci contenenti magnesio e l'uso abituale di lassativi possono causare diarrea osmotica. La diagnosi può essere stabilita dall'anamnesi. Nei pazienti con uso occulto di lassativi, l'esame delle feci può rivelare elevata quantità di magnesio fecale, pH elevato, e la presenza di lassativi.

L'allergia al latte vaccino (CMA) dovrebbe inoltre essere sempre tenuta in considerazione nei neonati e nei bambini con sintomi persistenti malgrado la dieta con restrizione lattosio. Non esiste tuttavia un *test* diagnostico per CMA non IgE mediata; la gestione clinica implica l'eliminazione completa dalla dieta delle proteine del latte.

**GESTIONE** - L'obiettivo della gestione è quello di eliminare i sintomi, pur mantenendo l'assunzione di calcio e vitamina D. Nei pazienti affetti da malassorbimento di lattosio secondaria, il trattamento del disturbo primario può portare al ripristino della attività della lattasi. Tuttavia, l'intolleranza al lattosio può persistere per mesi dopo l'inizio della guarigione e in ritardo rispetto al ritorno della normale morfologia intestinale.

**Diete con restrizione di lattosio** - I pazienti devono essere informati per limitare e, se possibile, non eliminare completamente il lattosio alimentare. Si suggerisce che le persone con intolleranza al lattosio limitino l'assunzione di lattosio a non più di due tazze di latte (o il suo equivalente al lattosio) al giorno in due dosi divise con i pasti. Ovviamente, la dose somministrata può essere anche minore. L'assunzione di alimenti contenenti lattosio è generalmente molto meno gravata da sintomi se tali alimenti sono assunti durante i pasti.

È opportuno consigliare ai pazienti che ingeriscono più di due tazze di latte al giorno (o il suo equivalente) o prodotti lattiero-caseari, senza altri nutrienti, di utilizzare prodotti con ridotto contenuto di lattosio o integratori lattasi.



Di gran lunga la più alta concentrazione di lattosio per porzione è presente nel latte e nel gelato, ma l'alto contenuto in grassi e la conseguente riduzione della velocità di svuotamento gastrico può consentire un'assunzione di gelato senza sintomi.

I formaggi contengono generalmente quantità molto modeste di lattosio. Soggetti con malassorbimento di lattosio possono tollerare i latticini in quantità limitate.<sup>26,16,27,28</sup>

Poiché la quantità di lattosio nei farmaci è probabilmente troppo bassa per produrre sintomi, i farmaci contenenti lattosio non dovrebbero essere evitati. In uno studio randomizzato, *crossover*, in doppio cieco che valuta la produzione di idrogeno espirato e sintomi intestinali in 77 soggetti intolleranti al lattosio dopo l'ingestione di 400 mg di lattosio o placebo, né i livelli di idrogeno espirato né i sintomi erano diversi se i soggetti hanno ingerito lattosio a basse dosi o placebo.<sup>28</sup>



### Terapia enzimatica sostitutiva

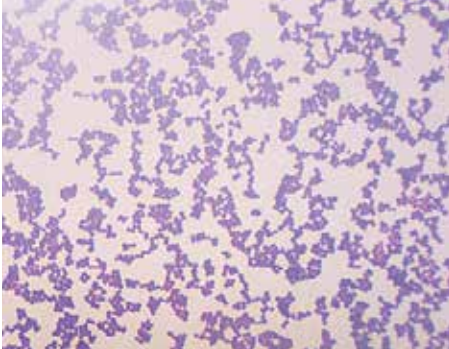
I pazienti che ingeriscono più di due tazze di latte (o il suo equivalente) al giorno di latte o prodotti lattiero-caseari senza altri nutrienti dovrebbero usare preparati enzimatici contenenti lattasi. In commercio sono disponibili preparati enzimatici contenenti lattasi o lievito contenente  $\beta$ -galattosidasi preparati sotto forma di *spray* che può essere spruzzato sul cibo o ingerito in compresse *per os* e da assumere quando si assumono alimenti contenenti lattosio. Preparazioni liquide di lattasi possono essere aggiunte al latte (14 gocce/litro), da tenere in frigorifero durante la notte prima dell'uso. La conseguente idrolisi del lattosio produce un gusto più dolce del latte contenente lattosio.<sup>30</sup>

Sono disponibili in commercio anche prodotti caseari predigeriti. Si consiglia in genere che le persone con intolleranza al lattosio inizino con due compresse, adattando in seguito la dose di enzimi necessaria.

Preparati enzimatici con lattasi possono ridurre i sintomi ed i valori di idrogeno espirato in molti soggetti intolleranti al lattosio. Tuttavia, questi prodotti non sono in grado di idrolizzare completamente tutto il lattosio alimentare ed i risultati che si ottengono nei singoli pazienti sono variabili.<sup>31,32</sup>

Una coltura di yogurt vivo, che contiene beta-galattosidasi endogena, è una fonte alternativa di calorie e calcio e può essere ben tollerato da molti pazienti intolleranti al lattosio. Tuttavia, yogurt che contengono latte o prodotti lattiero-caseari nuovamente aggiunti dopo la fermentazione possono produrre sintomi.

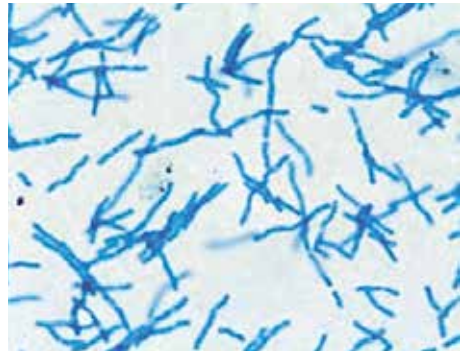
*I batteri vivi dello yogurt:*



*Streptococcus lactis*



*Bifidobacterium bifidum*



*Lactobacillus bulgaricus*

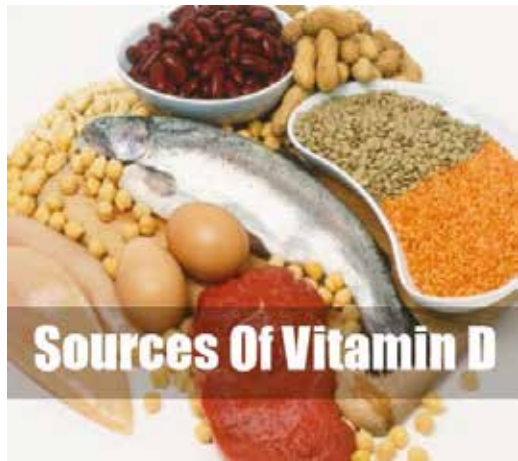
*Assunzione di Calcio e vitamina D*

L'assunzione di calcio dietetico deve essere presa in considerazione e i pazienti con inadeguata assunzione dovrebbero essere incoraggiati ad aumentare il loro consumo di alimenti ricchi in calcio.

Se ciò non fosse possibile, si utilizzano di solito per la supplementazione il carbonato di calcio, perché è la forma più economica disponibile. Nei neonati e nei bambini piccoli, il gluconato di calcio liquido è facilmente tollerato e disponibile. L'assunzione di calcio giornaliera raccomandata per gli adolescenti e giovani adulti è di 1200 mg/die.

Le raccomandazioni sull'assunzione di calcio negli adulti dipendono, in genere, nelle donne dall'età, dalla presenza o meno di menopausa e/o di osteoporosi; per la supplementazione di calcio oltre i 500 mg/die si deve procedere con dosi frazionate<sup>32</sup>.

È consigliabile una consulenza dietetica e il controllo dei valori di vitamina D nei pazienti che evitano l'assunzione di prodotti lattiero caseari, specie in pazienti con malattia di Crohn e malattia celiaca. L'assunzione di vitamina D può essere aumentata, se necessario, da integratori. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per determinare se prebiotici o probiotici contenenti lattasi possano essere d'aiuto nella digestione del lattosio nei pazienti intolleranti al lattosio.



### ***Bibliografia (per l'intolleranza al lattosio)***

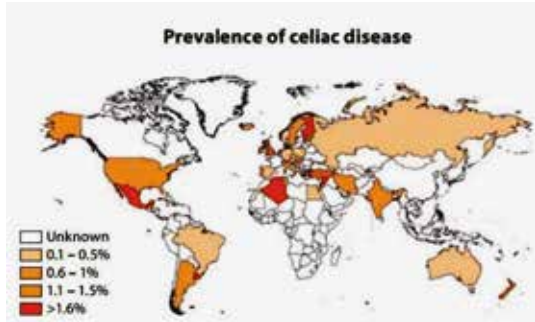
- 1) Suarez, F. L. and Savaiano, D. A., Diet, genetics, and lactose intolerance, *Food Technol.* 1997, *51*, 74-76.
- 2) Houts, S. S., Lactose intolerance, *Food Technol.* (Chicago), 1988, *42*, 110.
- 3) Simoons, F. J., Age of onset of lactose malabsorption [letter], *Pediatrics* 1980, *66*, 646.
- 4) Metcalfe, D. D., Food hypersensitivity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984, *73*, 749.
- 5) Taylor, S. L., Nordlee, J. A., and Rupnow, J. H., Food allergies and sensitivities, in *Food Toxicology: A Perspective on the Relative Risks*, Taylor, S. L. and Scanlan, R. A., Eds., Marcel Dekker, New York, 1989, 255.
- 6) Haverberg, L., Kwon, P. H., and Scrimshaw, N. S., Comparative tolerance of adolescents of differing ethnic background to lactose-containing and lactosefree dairy drinks. I. Initial experience with a double-blind procedure, *Am. J. Clin. Nutr.* 1980, *33*, 17.
- 7) Ford, R. P. K., Hill, D. J., and Hosking, C. S., Cows' milk hypersensitivity: immediate and delayed onset clinical patterns, *Arch. Dis. Child.* 1983, *58*, 856.
- 8) Gryboski, J. D., Gastrointestinal aspects of cows' milk protein intolerance and allergy, *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 1991, *11*, 773.
- 9) Paige, D. M., Bayless, T. M., Huang, S. S., and Wexler, R., Lactose hydrolyzed milk, *Am. J. Clin. Nutr.* 1975, *28*, 818.
- 10) Barillas, C. and Solomons, N. W., Effective reduction of lactose maldigestion in preschool children by direct addition of beta-galactosidases to milk at mealtime, *Pediatrics* 1987, *79*, 766.
- 11) Martini, M. C. and Savaiano, D. A., Reduced intolerance symptoms from lactose consumed during a meal, *Am. J. Clin. Nutr.* 1988, *47*, 57.
- 12) Gallagher, C. R., Molleson, A. L., and Caldwell, J. H., Lactose intolerance and fermented dairy products, *J. Am. Diet. Assoc.* 1974, *65*, 418.
- 13) Kolars, J. C., Levitt, M. D., Aouji, M., and Savaiano, D. A., Yogurt — an autodigesting source of lactose, *N. Engl. J. Med.* 1984, *310*, 1.
- 14) Wytock, D. H. and Di Palma, J. A., All yogurts are not created equal, *Am. J. Clin. Nutr.* 1988, *47*, 454.
- 15) Buller HA, Grand RJ. Lactose intolerance. In: *Annual Review of Medicine: Selected Topics in the Clinical Sciences*, Creger WP, Coggins CH, Hancock EW (Eds), Annual Reviews Inc, Palo Alto 1990. p. 141.

- 16) Suarez FL, Savaiano DA, Levitt MD. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance, *N. Engl. J. Med.* 1995; 333,1.
- 17) Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Intestinal gas dynamics and tolerance in humans, *Gastroenterology* 1998, 115, 542.
- 18) Johnson AO, Semenya JG, Buchowski MS, *et al.* Correlation of lactose maldigestion, lactose intolerance, and milk intolerance, *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, 57, 399.
- 19) Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofmann AF. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency, *N. Engl. J. Med.* 1975, 293, 1232.
- 20) Joseph F, Rosenberg AJ. Identifying lactose malabsorbers through breath hydrogen measurements, *Lab. Med.* 1986, 17, 85.
- 21) Gasbarrini A, Corazza GR, Gasbarrini G, *et al.*, Methodology and indications of H<sub>2</sub>-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2009, 29, suppl. 1,1.
- 22) Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, *et al.* A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children, *Gut* 2004, 53,1571.
- 23) Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, *et al.* Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe, *Nat. Genet.* 2007, 39, 31.
- 24) Lewinsky RH, Jensen TG, Møller J, *et al.*, T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro, *Hum. Mol. Genet.* 2005, 14, 3945.
- 25) Yang J, Deng Y, Chu H, *et al.* Prevalence and presentation of lactose intolerance and effects on dairy product intake in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2013, 11, 262.
- 26) Suarez FL, Savaiano D, Arbisi P, Levitt MD. Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance, *Am J Clin Nutr* 1997; 65:1502.
- 27) Suarez FL, Adshead J, Furne JK, Levitt MD. Lactose maldigestion is not an impediment to the intake of 1500 mg calcium daily as dairy products, *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 68, 1118.
- 28) Pribila BA, Hertzler SR, Martin BR, *et al.*, Improved lactose digestion and intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy-rich diet, *J. Am. Diet. Assoc.* 2000, 100, 524.
- 29) Montalto M, Gallo A, Santoro L, *et al.*, Low-dose lactose in drugs neither increases breath hydrogen excretion nor causes gastrointestinal symptoms, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008, 28, 1003.
- 30) Rosado JL, Solomons NW, Lisker R, Bourges H. Enzyme replacement therapy for primary adult lactase deficiency. Effective reduction of lactose malabsorption and milk intolerance by direct addition of beta-galactosidase to milk at mealtime, *Gastroenterology* 1984, 87, 1072.
- 31) Ramirez FC, Lee K, Graham DY. All lactase preparations are not the same: results of a prospective, randomized, placebo-controlled trial, *Am. J. Gastroenterol.* 1994, 89, 566.
- 32) Harvey JA, Zobitz MM, Pak CY., Dose dependency of calcium absorption: a comparison of calcium carbonate and calcium citrate, *J. Bone Miner. Res.* 1988, 3, 253.



## 2. LA MALATTIA CELIACA

La prevalenza della celiachia negli Stati Uniti in diversi studi è di circa l'1%, mentre la prevalenza nelle popolazioni europee varia da un massimo del 2,4% in Finlandia ad un minimo di 0,3% in Germania. È interessante notare che ci sono dati che mostrano che negli ultimi 30 anni l'incidenza e la prevalenza della celiachia sono aumentate negli Stati Uniti, così come in Europa.



### Patobiologia

Le proteine dietetiche che contengono glutine e che derivano da frumento, segale e orzo contengono sequenze proteiche che suscitano una gamma diversificata di risposte immunologiche. L'avena in genere non genera una risposta immunologica, a meno che non vi sia una sufficiente *cross*-contaminazione da fresatura e movimentazione di granaglie ricche di glutine, come il frumento.

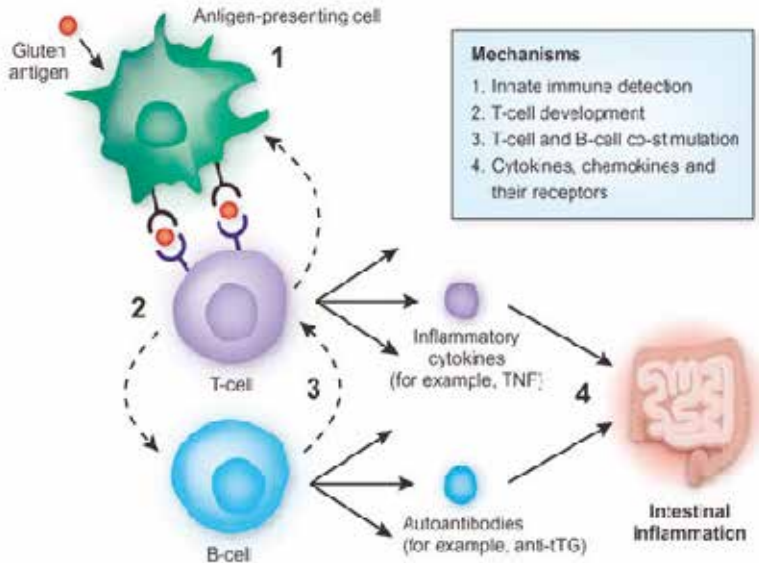


La **zonulina-1** è una proteina che modula le giunzioni strette degli enterociti, le cellule che costituiscono la parete intestinale. Essa si lega a uno specifico recettore dell'epitelio della superficie intestinale e innesca una cascata di reazioni biochimiche che creano un disassemblamento delle cellule epiteliali, con un conseguente aumento della permeabilità intestinale ([www.centrodimedicina-biologica.it](http://www.centrodimedicina-biologica.it)).

La Alpha-2 gliadina contiene una sequenza di 33 aminoacidi resistenti alla digestione dell'intestino umano e degli enzimi pancreatici ed è tipicamente un antigene della celiachia. Affinché si manifesti una risposta immunologica alle proteine del glu-

tine è necessario che si verifichi un certo numero di eventi: l'antigene dovrà oltrepassare la barriera protettiva dell'intestino tenue in modo da rappresentare alle cellule B e T del sistema immunitario della mucosa grandi molecole complesse di istocompatibilità presenti sulla cellule presentanti l'antigene APC (*Antigen Presenting Cells*, come le cellule dendritiche).

Le proteine del glutine sembrano in grado di attraversare le cellule e le *tight junction* a causa di una difettosa regolazione delle proteine di giunzione come la zonulina-1, fornendo un bersaglio per la terapia.<sup>1</sup>



(da [bnljceliacdisease.wordpress.com](http://bnljceliacdisease.wordpress.com))

Un certo numero di agenti possono determinare una breccia nella funzione di barriera dell'intestino (cioè infezioni, farmaci non steroidei, proliferazione batterica); in tal modo un difetto di permeabilità può diventare un antecedente fisiopatologico allo sviluppo di malattie come già proposto da Fasano.<sup>2</sup>

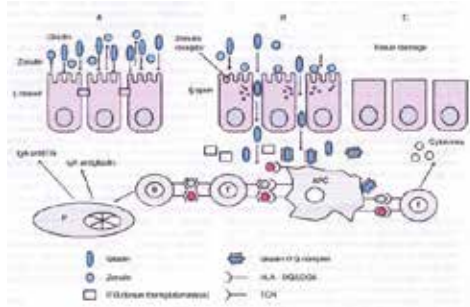
Il successivo meccanismo di processazione degli antigeni indigeribili del glutine da parte del sistema immunitario della mucosa porta all'infiammazione dell'intestino tenue, in cui le citochine infiammatorie possono ulteriormente allentare le *tight junction* favorendo l'ulteriore ingresso di altri peptidi del glutine, così da perpetuare un circolo vizioso.

L'enzima tissutale trans-glutaminasi (TTG) rimuove il gruppo amminico della glutamina dei peptidi del glutine, come l'alfa 2- gliadina, lasciandola in uno stato di alta affinità e di legame per MHC HLA-DQ8 DQ2.5. Gli anticorpi nei confronti di TTG e alfa 2-gliadina diventano di conseguenza un importante strumento di *screening* per la malattia celiaca.

L'APC contenente il peptide alterato del glutine sulla sua superficie si aggancia quindi ai recettori sulle cellule T e B suscitando una vigorosa risposta immune, compresa una risposta proinfiammatoria (interferone gamma, interleuchina-17. L'Interleuchina-15 (IL-15), prodotta dalla mucosa APCs attivata dal glutine e dalle cellule epiteliali danneggiate, induce l'espressione dei recettori delle cellule *killer* naturali e promuove la loro capacità citolitica, che distrugge le cellule epiteliali e determinando l'atrofia dei villi. La celiachia, come molte malattie autoimmuni, è il risultato di una complessa interazione di fattori ambientali, genetici e immunologici per produrre la malattia.

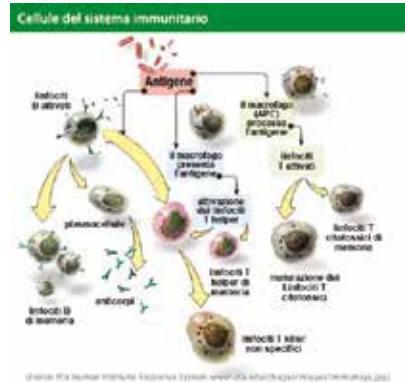
L'antigene umano del leucocita (HLA)-genotipo DQ, in particolare HLA-DQ2 e HLA-DQ8, è il più forte fattore di rischio genetico. Studi di associazione *genome-wide* (GWAS) hanno identificato 57 varianti associate non-HLA, situati a 39 regioni con funzioni prevalentemente immunologiche. Insieme a d HLA, queste varianti rendono ragione di circa il 54% di ereditabilità della malattia.

La **zonulina** è una proteina che modula le giunzioni strette degli enterociti, le cellule che costituiscono la parete intestinale. Essa si lega a uno specifico recettore dell'epitelio della superficie intestinale e innesca una cascata di reazioni biochimiche che creano un disassemblamento delle cellule epiteliali con un conseguente aumento della permeabilità intestinale ([www.centrodime-dicinabiologica.it](http://www.centrodime-dicinabiologica.it)).

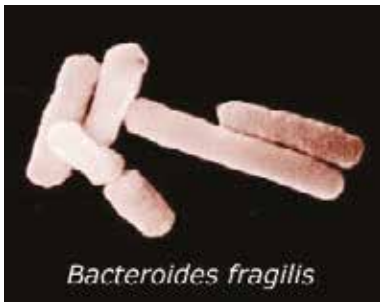


L'**interferone gamma** (IFN- $\gamma$ ), detto anche **interferone di tipo II** (IFN II), appartiene alla vasta classe di **glicoproteine** note come **citochine**. È prodotto dai **linfociti B** e **T** attivati. Ha come bersaglio gli stessi linfociti T, i **linfociti B** e i **macrofagi**;

Le **cellule T helper CD-4** esprimono IL-17 (**interleuchina-17**) sono una linea di cellule T, che affiancano il binomio immunologico TH1-TH2. Le interleuchine regolano l'attività di altre cellule, innescando uno dei più importanti meccanismi di comunicazione cellulare a livello del sistema immunitario.



### Potenziale ruolo del microbiota nella patogenesi della celiachia



Un argomento convincente è che l'ambiente microbico dell'intestino nelle fasi iniziali della vita, influenzato dalla selezione di antibiotici, delle modalità di espletamento del parto, dal tipo di alimentazione latte e dalle infezioni precoci del tratto gastrointestinale sia fondamentale nel determinare il futuro sviluppo della malattia.

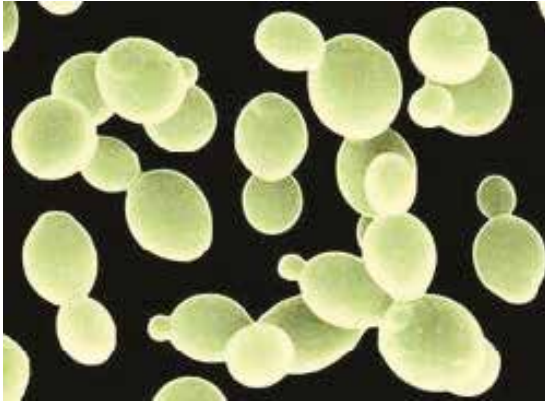
È interessante notare che il microbiota dei bambini ad alto rischio di sviluppo della malattia celiaca mostra un ridotto numero di Bifidobatteri, un tipo di batteri la cui crescita è favorita dall'allattamento al seno. L'allattamento artificiale di bambini ad alto rischio

genetico per malattia celiaca ha anche mostrato un aumento del numero di batteri del gruppo *Bacteroides fragilis*.

La patogenesi della malattia celiaca sembra associarsi ad una simbiosi intestinale: vi sono molti dati che mostrano una inclinazione alla patogenicità del microbiota intestinale. Dato il ruolo potenziale della disbiosi intestinale nella patogenesi della malattia celiaca e la capacità dei probiotici di regolare le precoci risposte infiammatorie e di regolare l'autoimmunità, la ricerca di base è stata condotta su modelli animali per fornire le basi potenziali di futuri studi clinici sull'uomo.

Alcuni Lattobacilli, quando aggiunti alla pasta acida per la fermentazione, sono in grado di idrolizzare peptidi del glutine e di renderlo meno immunotossico.





Un'integrazione con un probiotico batterico VSL3 ha dimostrato una certa capacità nel diminuire la tossicità della farina di frumento idrolizzando in maniera completa i derivati epitopi 62-75 della alpha-2-gliadina. Il lievito del *Saccharomyces boulardii* ha idrolizzato la frazione 28-kDa della gliadina migliorando il quadro di enteropatia nel topo *gluten sensitive*.<sup>2</sup>

La somministrazione orale di probiotici con batteri *Lactobacillus casei* ha prodotto un recupero completo dei villi atrofici e un miglioramento dell'omeostasi del tessuto linfoide intestinale GALT in un modello murino di enteropatia gliadina indotta.<sup>3</sup>

### **Quadro clinico e diagnosi**

Il quadro clinico della celiachia è molto variabile: da quello tipico, con sintomi gastrointestinali, a quello atipico con sintomi extraintestinali, a quello latente, senza nessun danno intestinale nonostante l'ingestione di glutine (ma con successivo cambiamento dei villi intestinali, cambiamento rilevato con diagnosi retrospettiva) e, infine, il quadro silente, asintomatico e diagnosticato tramite procedure di *screening*.

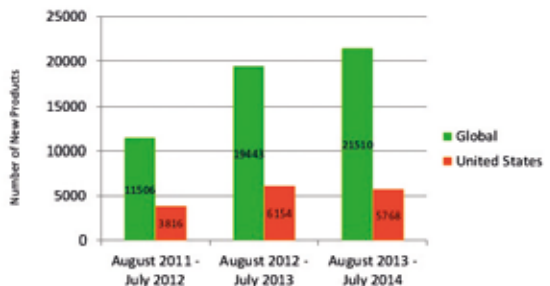
La crescita della consapevolezza nell'opinione pubblica della malattia e dei disturbi glutine-correlati ha portato ad un'esplosione nel settore alimentare di cibi senza glutine.

*Packaged Facts* ha riferito che gli alimenti confezionati senza glutine hanno un mercato di 4.200 milioni di dollari, con una proiezione di 6.600 milioni di dollari nel 2017.

La dieta priva di glutine (GFD) è impegnativa e costosa e dovrebbe essere raccomandata sulla base delle migliori evidenze disponibili, stabilendo in modo definitivo che l'intolleranza al glutine è un elemento di criticità fondamentale per la salute.

Complessivamente, questi fatti dimostrano come le reazioni al glutine rappresentino un insieme eterogeneo di condizioni, tra cui la celiachia, la sensibilità al glutine non celiachia, l'allergia al grano, che tutt'insieme interessano circa il 10% della popolazione generale. Come sottolineato da Tavakkoli e Lebwohl, la diagnosi di celiachia attualmente si raggiunge

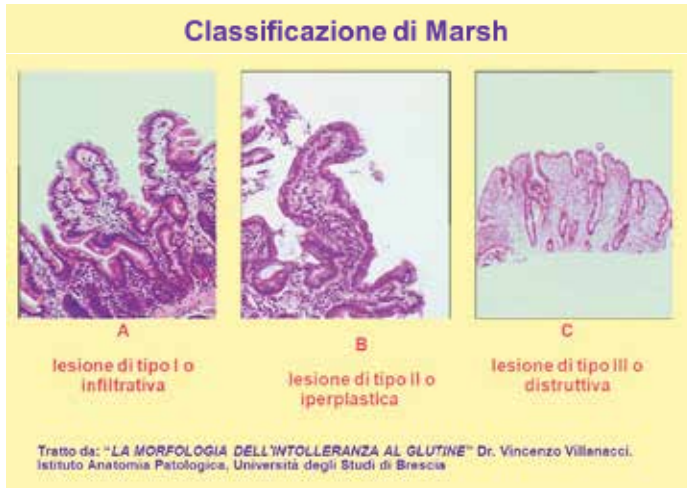
### **Gluten-Free MARKET Growth**



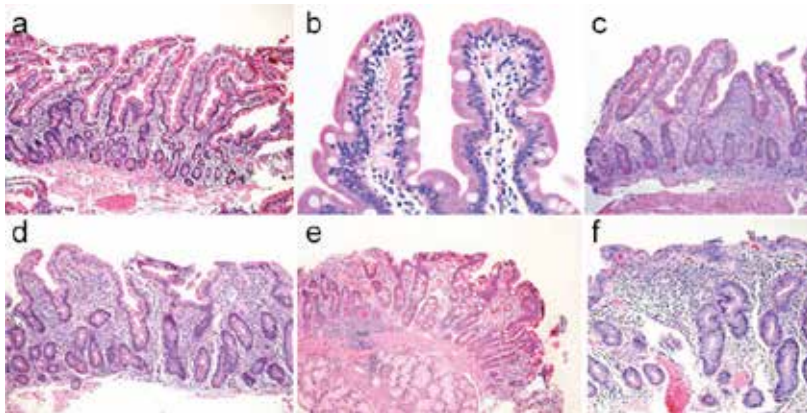
(<http://www.foxnews.com/health/2012/10/23/gluten-free-foods-industry-worth/>)

combinando i *test* sierologici, i *test* genetici e gli esami endoscopici. Lammers *et al.* hanno proposto che la diagnosi di celiachia, considerata la grande variabilità di manifestazioni cliniche, possa essere confermata dalla presenza di quattro su cinque dei seguenti criteri: <sup>5,6,7,8</sup>

- 1- presenza dei sintomi tipici che si osservano nella celiachia,
- 2- positività dei marcatori sierologici (anticorpi anti trans-glutaminasi (TTG) e anticorpi anti-gliadina),
- 4- biopsia dell'intestino tenue con evidenza di villi intestinali assenti o atrofici, o "smusati" (Marsh II-III a-c)



- 5- aumento del numero di cellule CD3 + intraepiteliali,
- 6- *screening* genetico positivo per HLA-DQ2 o -DQ8,
- 7- miglioramento dei sintomi con una dieta priva di glutine.



L'enteropatia celiaca mostra un spettro molto ampio di lesioni (da meno gravi a più gravi), che possono variare da un'infiltrazione moderata dell'epitelio con linfociti e villi a struttura inalterata (figure a – b), fino a iperplasia delle cripte (figura c) e ad un progressivo stadio di atrofia dei villi (figura d), sanguinamento (figura e) o, infine, totale atrofia dei villi (figura f). Husby, S. & Murray, J. A. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* (2014), doi:10.1038/nrgastro.2014.162

Le popolazioni in cui la celiachia si manifesta con maggiore frequenza rispetto alla popolazione generale e per le quali una dieta priva di glutine può essere utile dovrebbe includere quei soggetti in cui si manifesta malassorbimento sintomatico, diarrea con perdita di peso, diarrea cronica, anemia sideropenica cronica, malattia metabolica dell'osso, perdita di peso involontario o inspiegabile, gonfiore post-prandiale e meteorismo, alterazione degli enzimi epatici, dermatite erpetiforme occasionale, enteropatia (scoperta tramite endoscopia e istologia) di atrofia dei villi, neuropatia periferica, ulcere aftose orali, disturbi della crescita, decolorazione dei denti o contemporanea perdita di smalto, sindrome del colon irritabile, sindromi di Down e di Turner.

### **Gluten Sensitivity**

La sensibilità al glutine non celiaca (NCGS) è una reazione al glutine non mediata da una allergia o da una risposta immunitaria mediata. I pazienti non celiaci sensibili al glutine di solito si presentano con la stessa varietà di sintomi della celiachia.



Lammers e Fasano hanno stimato una prevalenza di NCGS tra il 3 e il 6%. Vi sono sei criteri di NCGS, tutti necessari per la diagnosi:

- vanno escluse la celiachia, l'allergia al frumento IgE-mediata e altre malattie clinicamente sovrapposte (DM di tipo 1, malattie infiammatorie croniche intestinali, infezioni da *Helicobacter pylori*).
- *Prick test* negativo per il frumento



*Prick test*: alcune gocce di allergene purificato vengono posizionate sulla superficie cutanea, solitamente dell'avambraccio, e successivamente la cute viene scalfita con una lancetta monouso al fine di lasciar penetrare l'allergene attraverso gli strati più superficiali della cute. Dopo un'attesa di circa 15-20 minuti si valuta la reazione cutanea ottenuta in corrispondenza di ogni allergene precedentemente posizionato. La reazione a livello dei singoli allergeni testati viene confrontata con un controllo positivo (solitamente costituito da istamina) e con un controllo negativo (solitamente costituito da glicerina, il liquido di diluizione degli allergeni). In caso di reazione positiva è possibile osservare una reazione caratterizzata da pomfo (area circoscritta di edema cutaneo, in tutto e per tutto simile ad una puntura di zanzara) intensamente pruriginoso, contornato da un alone di eritema.



- sierologia negativa con negatività degli anticorpi anti-endomisio e anti-transglutaminasi (EMA-IgA e TTG-IgA)
- biopsia del tenue con mucosa normale (Palude 0) o aumento dei linfociti intra-epiteliali (Marsh I)
- sintomatologia non provocata da lesione da glutine
- Miglioramento dei sintomi dopo pochi giorni dall'assunzione di una dieta priva di glutine

La patogenesi della celiachia e di NCGS restano distinte sulla base della mancanza di elementi sierologici, di alterazioni istologiche e della immunopatologia, così come sulla conservazione della funzione di barriera intestinale presente nella *Gluten Sensitivity* e assente nella Celiachia.<sup>9</sup>

### Terapia e monitoraggio

Nella celiachia l'intervento nutrizionale primario è la formulazione e l'attuazione di una dieta rigorosamente priva di glutine, che attualmente rappresenta l'unico trattamento per la celiachia.

La GFD richiede l'eliminazione completa del glutine presente in grano, orzo e segale. Tutti gli alimenti contenenti questi cereali come ingredienti o come contaminazione devono essere eliminati dalla dieta. È essenziale la presenza di un medico nutrizionista con esperienza in celiachia,

che sappia valutare lo stato nutrizionale dei pazienti, in grado di educare circa i cibi da evitare così come le alternative per migliorare e rispettare una dieta priva di glutine, considerato l'alto impatto di GFD sulla qualità della vita, la morbilità e la mortalità. Le carenze nutrizionali si possono verificare in soggetti con celiachia a causa del malassorbimento di sostanze nutritive, perdita della capacità di assorbimento dell'intestino tenue, insufficienza pancreatica, mancanza di fortificazione dei prodotti alimentari del glutine e da pratiche alimentari restrittive.

Dal momento che l'anemia è una manifestazione comune della celiachia, va tenuta in debita considerazione la carenza di ferro nel contesto di una anemia microcitica, la carenza di vitamina B<sub>12</sub> e di folati in presenza di una anemia macrocitica. Altre carenze, come quelle delle vitamine liposolubili (A, D, E e K) si possono verificare nella celiachia a causa della diminuzione della superficie assorbente intestinale, dell'insufficienza pancreatica e delle malattie concomitanti.

Il monitoraggio delle vitamine liposolubili dovrebbe essere fatto almeno una volta all'anno, se si esclude la vitamina D, che deve essere controllata stagionalmente, dato il maggior rischio di osteoporosi nella celiachia.

Analogamente, una volta all'anno, de-





ve essere eseguito anche lo *screening* di micronutrienti per zinco, rame, selenio, effettuandolo anche prima se se ne sospetti la carenza. Poiché, infine i pazienti in GFD tendono ad avere scarsità di fibra alimentare, si raccomanda l'assunzione giornaliera di riferimento (DRI) di 25 gr di fibre nella dieta di ogni giorno.

Sono in corso studi con finalità terapeutiche sperimentali che comprendono lo sviluppo di prodotti senza glutine a bassa immunogenicità, enzimi *per os* per metabolizzare il glutine ingerito, probiotici, peptidi che regolano le proteine di *tight-junction*, enzimi che bloccano il rapporto tra l'enzima trans-glutaminasi e i tessuti, sostanze bloccanti le citochine pro-infiammatorie, terapie con molecole anti-adesione, mitogeni intestino-trofici, e vaccinazioni contro i peptidi del glutine.

Poiché la celiachia è una malattia cronica che richiede un *follow-up* lungo tutta la vita, il monitoraggio si può considerare un aspetto critico del trattamento del paziente celiaco.

Herman *et al.* suggeriscono una prima visita di *follow-up* a 3-6 mesi dalla diagnosi, poi ogni anno dalla data della diagnosi, compresa l'esecuzione della sierologia, rimandando i controlli ogni due anni nel caso in cui la dieta sia efficace.

Sfortunatamente, l'uso di anticorpi anti-TTG o correlati (anti-EMA, anti-DPG) non dovrebbe essere l'unico strumento per il controllo della conformità di una dieta priva di glutine: infatti i pazienti con sierologia normalizzata possono continuare ad avere un'inflammazione intestinale in atto e una contaminazione da glutine nella loro dieta, con una sierologia falsamente normale nonostante la continua assunzione di glutine.

Il recupero dell'integrità della mucosa generalmente richiede negli adulti diversi anni di rigoroso evitamento del glutine ed è spesso irregolare o incompleta; analogamente si raccomanda l'esecuzione di una biopsia della mucosa dopo il primo anno di una dieta priva di glutine, così come quando i pazienti non migliorano il quadro clinico e presentano sintomatologia ricorrente, nonostante una dieta priva di glutine. Al momento della diagnosi, è opportuno che venga ricercata la presenza di anemia, malnutrizione, carenze di vitamine o minerali, alterazione della funzione epatica e/o tiroidea.

Si raccomanda inoltre lo *screening* per la densità minerale ossea e particolare attenzione a soggetti con sintomi di allarme per malattia linfomatosa, come per esempio febbre, sintomatologia intestinale refrattari al trattamento, nonché la permanenza di titoli sierologici persistenti nonostante la dieta priva di glutine al fine di valutare le eventuali complicanze.

### **Disinformazione e falsi miti sulla celiachia**

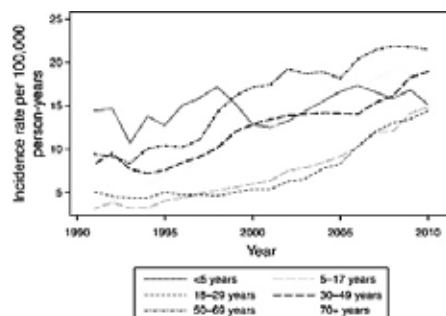
La disinformazione sulla celiachia comprende:

- che questa malattia sia rara;
- che solo i soggetti con disturbi dovrebbero essere diagnosticati della celiachia;
- che solo i caucasici sono suscettibili della celiachia;
- che le donne sono più spesso colpite rispetto ai maschi;
- che non si può essere ammalati di celiachia se si è in sovrappeso;
- che la celiachia non è una condizione grave;



- che segni e sintomi della celiachia sono facili da riconoscere e che quindi la celiachia è una malattia facile da diagnosticare;
- che una risposta positiva ad una dieta priva di glutine è già una diagnosi di celiachia;
- che è semplice ottenere delle informazioni su una dieta priva di glutine.

Fra i falsi miti da dissipare vi è inoltre quello che i celiaci non debbano utilizzare prodotti cosmetici di bellezza contenenti glutine e che il consumo dell'avena inneschi la malattia celiaca; inoltre, per la pulizia degli utensili di cucina e delle stoviglie si dice che sarebbero necessari prodotti per la pulizia senza glutine e che anche gli animali domestici dovrebbero mangiare cibi senza glutine.



Joe West et al., *Incidence and Prevalence of Celiac Disease in the UK*, *Am J Gastroenterol* 2014; 109:757-768

### Nutrizione nella celiachia

La dieta senza glutine è attualmente l'unico trattamento per la malattia celiaca, una malattia autoimmune su base genetica con infiammazione cronica della mucosa dell'intestino tenue. Gli individui con celiachia hanno una reazione immunologica alle proteine di grano, segale e orzo. I pazienti con celiachia devono essere strettamente monitorati dal dietista per valutare la salubrità della dieta priva di glutine, nonché per discutere motivazione, qualità della vita, il miglioramento dei sintomi e le barriere alla conformità.

La valutazione nutrizionale è il primo passo nel processo di cura e di nutrizione. Durante la valutazione, i dati pertinenti sono raccolti e confrontati con i valori normali. Una diagnosi di nutrizione è determinata e un piano di assistenza nutrizionale è sviluppato e prescritto. L'intervento nutrizionale dovrebbe includere obiettivi quantificabili, realizzabili, definiti nel tempo e negoziati con il paziente in modo da migliorare il comportamento alimentare e ridurre i fattori di rischio, continuando l'intervento ad ogni visita del paziente. Una valutazione completa nutrizionale comprende una anamnesi dell'*intake* dietetico, il rilievo delle misure antropometriche, dei dati biochimici, e la prescrizione di esami medici. Per la cura ottimale del paziente è consigliabile avere come riferimento un medico nutrizionista o gastroenterologo, soprattutto per la valutazione della sintomatologia gastrointestinale collegata all'assunzione di glutine che potrebbe invece essere correlata o a un'intolleranza alimentare o ad un'altra problematica medica da diagnosticare, tra cui, per esempio, la carenza di vitamine ed oligoelementi.

### Assessment dell'Intake calorico e dietetico

L'analisi e la valutazione dell'assunzione dietetica nella celiachia deve essere approfondita: tutti i cibi e le bevande consumati nei giorni feriali di mano dovrebbero essere esaminati, analizzando marchi, nome dei prodotti, la frequenza del cibo consumato lontano da casa (ristoranti, eventi sociali, case di altre persone, viaggi).

È utile che l'anamnesi dietetica riveda assieme al paziente il diario alimentare. Sono inoltre da prendere in considerazione le restrizioni dietetiche, giustificate da intolleranze alimentari, allergie alimentari, osservanze religiose e le restrizioni autoimposte. I pazienti vanno interrogati circa la loro capacità di adeguarsi rigorosamente ad una dieta priva di glutine e circa la frequenza di ingestione di glutine (volontamente o involontariamente). È importante valutare le conoscenze dei pazienti e la loro comprensione delle caratteristiche della dieta, la loro capacità di lettura delle etichette, la loro capacità di ordinare cibi nei ristoranti, e quali possibilità di contaminazione crociata ci possano essere nelle cucine utilizzate in comune.



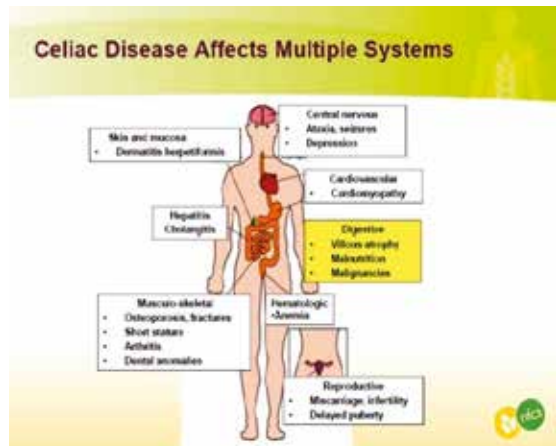
Edouard Manet, *Déjeuner sur l'herbe*. Pierre Auguste Renoir, *Le déjeuner des canotiers*.

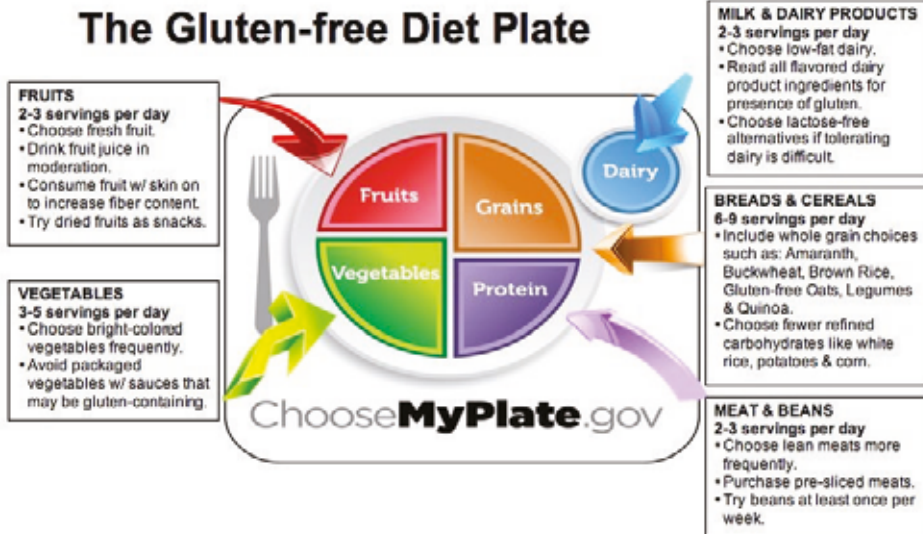
### Assessment antropometrico e Dati Anamnestici

Per effettuare un *Assessment* antropometrico è necessario valutare età, altezza, peso, indice di massa corporea, parametri di crescita nei bambini, la storia del peso corporeo, l'attività fisica, il consumo disordinato, e/o diete (attuali o del passato).

Prove dell'aria espirata (proliferazione batterica, intolleranza al fruttosio, intolleranza al lattosio), lo studio dello svuotamento gastrico, interventi chirurgici pregressi, trattamenti medici e colonscopia. È necessario ripercorrere la storia medica del paziente (per esempio, circa la patologia gastrointestinale, immunitaria, neurologica e psicologica) e altre condizioni di salute, come malattie autoimmuni, storia familiare di celiachia, allergie, entità della massa magra ed entità della massa grassa. Raccolta di informazioni su appetito, attuali sintomatologie gastrointestinali, sintomatologia precedente la diagnosi di malattia celiaca

La malattia celiaca è una malattia sistemica che dura tutta la vita, un trattamento impegnativo, che richiede visite di *follow-up* regolari con personale esperto della materia; i pazienti devono essere monitorati nella rigorosa osservanza della dieta, nel loro benessere e relativamente alla comparsa di problematiche mediche. Il soggetto affetto da malattia celiaca non trattato con una dieta priva di glutine può andare incontro a gravi conseguenze: l'assunzione di glutine può causare sintomi gastrointestinali, malassorbimento e carenze di micronutrienti, atrofia dei villi e lo sviluppo di complicanze neurologiche, problemi di fertilità, ridotta qualità della vita, linfoma intestinale e la riduzione della densità minerale ossea.





Attualmente l'unico trattamento per la celiachia è una dieta strettamente priva di glutine per tutta la vita. Una dieta senza glutine è definita come una dieta priva anche di minime quantità di proteine di frumento, orzo, segale e varietà incrociate di questi grani, come il triticale. Negli Stati Uniti gli alimenti senza glutine etichettati devono contenere meno di 20 ppm di glutine contenuti negli ingredienti o derivanti da *cross*-contaminazione-contatto con glutine. Al posto di alimenti contenenti glutine come i cereali (pane, pasta, cereali per la colazione) devono essere assunti alimenti contenenti mais, riso, miglio, *teff*, sorgo, riso selvatico, amaranto, grano saraceno, *quinoa*.

Un numero sempre crescente di alimenti etichettati come cereali senza glutine è disponibile in negozi di cibi tradizionali o naturali. Nella normativa statunitense, un cibo non può essere etichettato come senza glutine in uno dei seguenti casi:<sup>10</sup>

- il cibo contiene come ingrediente un cereale vietato quale: frumento, orzo, segale, triticale (incrocio tra grano e segale);
- il cibo contiene un ingrediente derivato da un cereale vietato e non è stato trattato per la rimozione del glutine. Esempi sono la farina di grano, le proteine del grano idrolizzate, il germe di grano, malto, orzo e aromi di malto;
- il cibo contiene un ingrediente derivato da un cereale proibito, ma la procedura seguita per rimuovere il glutine ha lasciato una concentrazione di 20 ppm o più. Esempi di questi tipi di ingredienti sono amido di grano e amido alimentare di grano modificato.
- Il cibo contiene 20 ppm o più di glutine.





## Qualità nutrizionale della dieta gluten-free

La qualità nutrizionale della dieta senza glutine dipende dalle scelte alimentari dei consumatori. Secondo *Academy of Nutrition and Dietetics Evidence Analysis Library* “l’adesione al modello dietetico senza glutine può causare una dieta ricca di grassi e povera di carboidrati e fibre, così come a basso contenuto di ferro, acido folico, niacina, vitamina B<sub>12</sub>, calcio, fosforo e zinco”.<sup>34</sup>



Vi sono anche prove che le diete *gluten-free* possono contenere insufficienti quantità di Tiamina.<sup>35</sup> Come risultato basato sull’evidenza, le linee guida per la malattia celiaca dell’Accademia raccomandano il consumo di cereali e prodotti senza glutine interi ed arricchiti.<sup>20</sup> L’aggiunta di integratori multivitaminici e minerali specifici per età e sesso è consigliato se “la dieta corrente dimostra carenze nutrizionali che non possono essere alleviate grazie a migliori abitudini alimentari”.<sup>20</sup> Ci sono diverse ragioni possibili per questo profilo in macro- e micro-nutrienti della dieta priva di glutine. Gli individui con celiachia non possono consumare la quantità consigliata di alimenti con frumento. Uno studio condotto da Thompson *et al.* hanno rilevato che solo il 21% degli adulti di sesso femminile negli Stati Uniti ha consumato il numero minimo raccomandato di porzioni di cibo con frumento.<sup>36</sup>



Una revisione retrospettiva di storie di dieta dei pazienti con CD in un centro di celiachia statunitense condotto da Lee *et al.* ha rilevato che il 38% dei pasti e spuntini consumati dai partecipanti allo studio non conteneva un componente di grano o di amido.<sup>11</sup>

Una riduzione complessiva di cereali con glutine nella dieta può portare ad alimentazione a basso contenuto di carboidrati e fibre e a consumi proporzionalmente più elevati di grassi,<sup>38</sup> il che può tradursi anche in diete a basso contenuto di ferro, acido folico, niacina e zinco.<sup>12</sup>

## ***Gestione del paziente con celiachia***

Come regola generale, sono sei gli elementi chiave per la gestione dei pazienti con malattia celiaca (*National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Celiac Disease*, 2004, <http://consensus.nih.gov/>).

- consultazione dietetica qualificata
- formazione sulla malattia
- aderenza permanente ad una dieta priva di glutine
- identificazione e il trattamento delle carenze nutrizionali
- accesso a un gruppo di aiuto
- Lungo periodo di *follow-up* effettuato da un *team* multidisciplinare

## ***Counseling dietetico***

La pietra angolare del trattamento della malattia celiaca è l'eliminazione del glutine dalla dieta: il trattamento del paziente con malattia celiaca inizia con la consulenza dietetica.

**Indicazioni** - Una dieta priva di glutine è raccomandata nei pazienti con malattia celiaca (malattia classica, celiachia atipica, e celiachia asintomatica o silente). I pazienti con malattia celiaca dovrebbero essere indirizzati ad una consulenza dietologica qualificata.

Attualmente ai pazienti con malattia celiaca latente (anticorpi IgA endomisio-positivo, ma normale biopsia dell'intestino tenue) non si raccomanda una dieta priva di glutine, ma devono essere continuamente monitorati ed eventualmente biopsiati nel momento in cui cominciano a sviluppare una sintomatologia gastrointestinale.<sup>5,20</sup>

## ***I componenti della dieta priva di glutine***

Le principali fonti di glutine nella dieta sono grano, segale e orzo. Il consumo di una dieta priva di glutine richiede un grande cambiamento di vita dal momento che il glutine è contenuto in una elevata varietà di alimenti che sono comunemente consumati in una dieta occidentale: ne consegue che, per migliorare la *compliance* del paziente è utile fornire informazioni scritte e consulenza dietetica.



Come regola generale, a tutti i pazienti si possono somministrare i seguenti consigli dietetici:

- Si devono evitare alimenti contenenti frumento, segale e orzo.
- Sono invece sicure le farine di soia o tapioca, riso, mais, grano saraceno e patate.
- È importante leggere con attenzione le etichette sui cibi pronti e sui condimenti, con particolare attenzione agli additivi, come stabilizzanti o emulsionanti che possono contenere glutine.
- Le bevande distillate alcoliche e gli aceti, così come il vino, sono senza glutine, ma le birre, birre al malto, birre *lager*, e alcuni tipi di aceto dovrebbero essere evitati perché sono spesso a base di cereali contenenti glutine e non vengono distillati. Tuttavia, in Europa sono ora in commercio birre senza glutine che possono essere trovate anche in numerose parti del mondo.



- I prodotti lattiero-caseari inizialmente possono essere non ben tollerati, poiché molti pazienti con malattia celiaca possono avere anche intolleranza secondaria al lattosio. Di conseguenza, inizialmente i prodotti contenenti lattosio dovrebbero essere evitati specie nei pazienti i cui sintomi sembrano peggiorare con la loro assunzione.
- L'avena dovrebbe essere introdotta con cautela nella dieta, monitorando con attenzione i pazienti se compaiono reazioni avverse<sup>4</sup>, limitandone il consumo a 50 a 60 g/giorno solo nei pazienti con malattia lieve al primo riscontro della malattia o nel momento in cui la malattia è in remissione dopo una rigorosa dieta priva di glutine. Tali pazienti devono essere seguiti con i attenzione in considerazione dell'evidenza di recidiva clinica e sierologica dopo la reintroduzione dell'avena. I pazienti invece con malattia grave dovrebbero evita-



re l'avena del tutto. Anche se l'avena contiene glutine, la tossicità dell'avena nella malattia celiaca è stata posta in dubbio, poiché alcuni studi suggeriscono che la farina di avena pura può essere tollerata senza recidiva di malattia, ma in altri studi questa possibilità viene invece negata.<sup>21, 22, 23, 24</sup>

Ci sono alcune ragioni per cui l'avena può essere meglio tollerata:

- In primo luogo, anche se l'avena contiene una omologia di sequenza (a, WPF) con peptidi della gliadina, che hanno dimostrato di essere attivati la malattia, questa omologia potrebbe non attivare le cellule T che richiede epitopi più grandi<sup>25, 26</sup>.
- In secondo luogo, l'avena contiene una proporzione relativamente piccola di questa parte prolaminica tossica rispetto ad altri cereali contenenti glutine. Questa ipotesi è supportata da studi di *challenge* con avena in pazienti con malattia celiaca, che suggeriscono che la tolleranza dell'avena dipende, almeno in parte, dalla quantità totale consumata.<sup>16</sup>



Il consumo quotidiano di avena di meno di 40 a 60 g/die per i pazienti la cui malattia celiaca è in remissione sembra essere ben tollerato, mentre una maggiore assunzione giornaliera si associa a recidiva di malattia<sup>27</sup>. Tuttavia, questi studi che utilizzano grandi quantità di avena sono stati realizzati prima dell'avvento della biopsia dell'intestino tenue.

- Infine, ci può essere variabilità nella immunogenicità di diverse *cultivar* di avena che possono spiegare la diversità dei risultati quando si tratta di tollerabilità dell'avena in pazienti con malattia celiaca.<sup>28</sup>

Nonostante queste osservazioni, la sicurezza a lungo termine del consumo di avena in pazienti con malattia celiaca è incerta e la maggior parte degli studi che ne hanno esaminato la sicurezza hanno incluso pazienti con malattia relativamente lieve o in cui la malattia era in remissione dopo reintroduzione dell'avena nella dieta. Vi è poi da considerare che alcuni pazienti possono essere particolarmente sensibili al contenuto prolaminico *aut* amminico dell'avena.<sup>29</sup>



Attualmente, quindi, un approccio ragionevole è quello di limitare il consumo di avena a 50 a 60 g/giorno in soggetti con malattia lieve all'esordio o la cui malattia è in remissione dopo una rigorosa dieta priva di glutine. Questi ultimi pazienti devono essere seguiti con attenzione per l'evidenza clinica o sierologica della recidiva di malattia dopo la reintroduzione dell'avena. I pazienti con malattia grave dovrebbero probabilmente evitare l'avena del tutto, soprattutto perché i prodotti di avena in commercio sono spesso contaminati da piccole quantità di altri cereali.<sup>30</sup>

È necessario evitare rigorosamente il glutine? Poiché l'eliminazione del glutine pone diverse restrizioni di stile di vita, il rispetto di una dieta rigorosamente priva di glutine risulta limitato.<sup>31</sup> Questo perché, in parte, la capacità di tollerare il glutine nella dieta è molto varia-

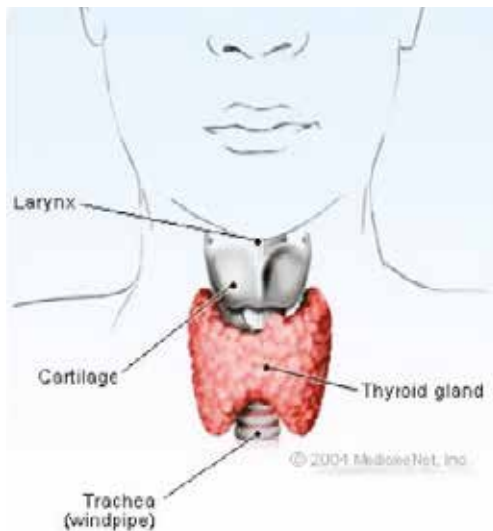
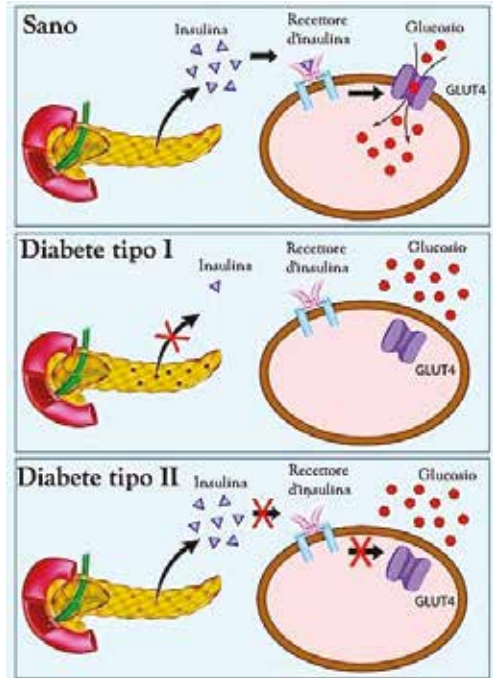


bile tra i pazienti. Mentre alcuni sono estremamente sensibili anche a piccole quantità di glutine, altri invece possono tollerare la reintroduzione di piccole quantità nella loro dieta già dopo aver raggiunto la remissione.

Nonostante questa risposta variabile, diversi argomenti favoriscono e incoraggiano la rigorosa aderenza ad una dieta priva di glutine nella maggior parte dei pazienti con malattia celiaca indipendentemente dai sintomi clinici:

- infatti, nonostante la sensazione soggettiva e clinica di benessere, i pazienti possono avere una varietà di carenze di micronutrienti che possono, in ultima analisi, determinare conseguenze cliniche, come la perdita di massa ossea per la mancanza di vitamina D. Queste carenze possono essere parzialmente revertite con una dieta priva di glutine.<sup>32</sup>
- Numerosi *report* hanno suggerito un aumento della mortalità generale e il rischio di malignità (malattia linfoproliferativa e tumori gastrointestinali) nei pazienti con malattia celiaca rispetto alla popolazione generale<sup>33,22</sup>. Anche se, in uno studio, l'aumento del rischio di linfoma non-Hodgkin persisteva per cinque anni dopo la diagnosi, nonostante l'aderenza ad una dieta priva di glutine<sup>34</sup>, molti altri studi hanno suggerito che il rischio si riduce nei pazienti che osservano una dieta senza glutine.<sup>35,36</sup>
- Almeno due studi hanno rilevato la possibilità che i pazienti con la malattia celiaca possano sviluppare altre malattie autoimmuni associate (per esempio, il diabete di tipo 1 mellito, malattie del tessuto connettivo, tiroidite di Hashimoto, il morbo di Graves), che sembrano correlarsi alla durata di esposizione al glutine, anche se i dati riportati sono discordanti.<sup>37,38</sup>
- Madri con malattia celiaca non diagnosticata sembrano essere ad aumentato rischio di neonati a basso peso alla nascita e di nascite pretermine, se confrontate con madri in cui la malattia sia stata diagnosticata (e presumibilmente trattata).<sup>39,40</sup>

Tracce di glutine possono essere contenute in prodotti etichettati come privi di glutine, ma la piccola quantità di glutine contenuta in questi prodotti non necessariamente



causa il fallimento del trattamento. Uno studio che ha valutato l'assunzione occulta di glutine (da contaminazione di grano) in 76 pazienti con dieta priva di glutine ha stimato che la contaminazione di glutine fino a 100 parti per milione (fino ad un totale di 30 mg al giorno) non ha provocato lesioni istologiche.<sup>41</sup> È interessante notare che 13 dei 59 prodotti naturalmente privi di glutine e che 11 dei 24 prodotti senza glutine contenevano glutine in quantità compresa tra 20 e 200 mg /kg.

I farmaci (pillole) generalmente contengono glutine in quantità estremamente minima e non devono essere evitati. Informazioni sui farmaci senza glutine sono disponibili *online*.

(<http://www.alessandromarugo.com/images/tumoretiroideo5.jpg>)

### **Monitoraggio della risposta ad una dieta senza glutine**

La rapidità della risposta ad una dieta priva di glutine è variabile. Circa il 70 per cento dei pazienti ha un miglioramento clinico evidente entro due settimane.<sup>42,34</sup> Come regola generale, i sintomi migliorano più velocemente del quadro istologico, soprattutto quando le biopsie sono ottenute dall'intestino prossimale.

Il motivo non è completamente comprensibile; tuttavia, una possibile spiegazione è che l'intestino distale, essendo meno danneggiato, recupera più velocemente dell'intestino prossimale, che, tipicamente, è più gravemente colpito per la maggiore esposizione al glutine.<sup>43</sup>

Si suggerisce di rivalutare i pazienti da quattro a sei settimane dopo l'avvio di una dieta priva di glutine, con l'esecuzione di un esame emocromocitometrico completo, acido folico, vitamina B<sub>12</sub>, ferritina, *test* di funzionalità epatica e esami sierologici.

È importante notare che le donne spesso avvertono tensione mammaria per tre mesi dopo l'inizio di una dieta priva di glutine e che per questo dovrebbero essere rassicurate.

I pazienti con malattia celiaca dovrebbero continuare ad essere monitorati ad intervalli regolari in caso di comparsa di sintomi residuali o nuovi, valutati per l'aderenza alla dieta senza glutine, per la raccolta anamnestica e per l'esecuzione di *test* sierologici, nonché per le complicanze della malattia celiaca. Un periodico *follow-up* medico deve essere regolarmente eseguito da un medico specialista nella malattia celiaca.<sup>44,45</sup>

Per monitorare la risposta alla dieta senza glutine si deve utilizzare il *test* sierologico dell'anticorpo IgA contro la trans-glutaminasi tissutale (tTG) o IgA (o IgG) anti-gliadina (DGP).<sup>46</sup>

Per qualsiasi metodo che verrà utilizzato, un livello di anticorpi pretrattamento dovrà essere determinato al momento della diagnosi. L'esclusione del glutine dalla dieta determinerà un graduale declino nel siero degli anticorpi anti-gliadina e anti-trans-glutaminasi (emivita di sei-otto settimane). Un valore di base normale in genere viene raggiunto in un periodo compreso dai 3 ai 12 mesi a seconda delle concentrazioni pre-trattamento. Normali livelli di IgA tTG non indicano in modo affidabile il recupero da atrofia dei villi.<sup>47</sup> Viceversa, se i livelli non cadono come anticipato, significa che il paziente continua a ingerire intenzionalmente o involontariamente glutine.<sup>48</sup>

Anche se le indicazioni di cui sopra possono essere utili dal punto di vista generale, tuttavia l'accuratezza di questi *test* nel determinare la conformità della dieta priva di glutine non



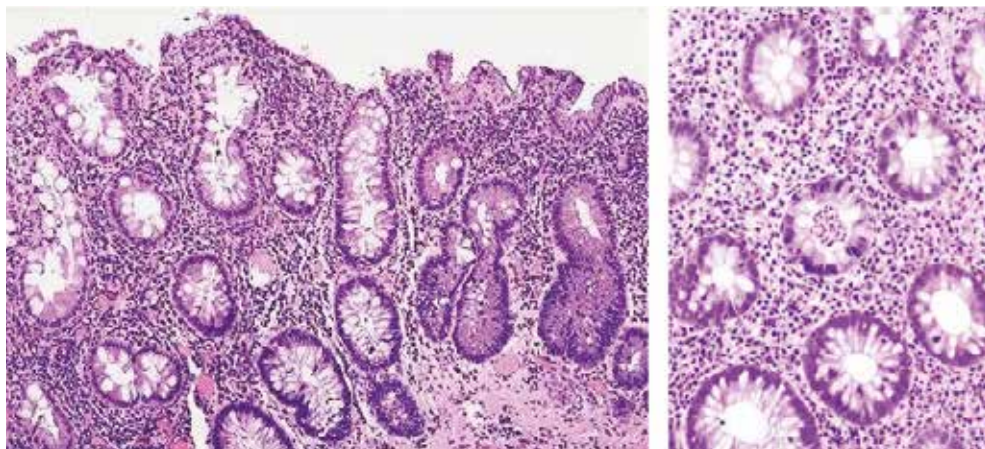
è completamente affidabile <sup>48, 49, 38, 40</sup>. Il valore di questi *test* nel monitoraggio dell'aderenza ad una dieta priva di glutine è notevolmente ridotto ai seguenti tre aspetti:

- Il *test* è inutile se i livelli di anticorpi non sono elevati prima della terapia.
- La variazione interseriale nei risultati dei *test* può essere sostanziale e renderne difficile l'interpretazione.
- Livelli persistentemente elevati di anticorpi riflettono di solito una continua esposizione a notevoli quantità di glutine nella dieta. Tuttavia, poiché i livelli di anticorpi decadono quando l'assunzione di glutine nella dieta si riduce, non si possono considerare un indicatore sensibile delle trasgressioni alimentari occasionali o minori. <sup>50</sup>

I livelli sierici di anticorpi IgG e IgA anti-endomisio anti-gliadina si riducono anche quando i pazienti non celiaci aderiscono rigorosamente ad una dieta priva di glutine (51, 52). Tuttavia, il calo di anti-gliadina IgG è più graduale rispetto a IgA anti-gliadina. <sup>53, 54</sup> Il che rende la prima meno utile nel monitoraggio dell'adesione alla dieta per il periodo più recente; i livelli di anticorpi IgA anti-endomisio sono più costosi ed i risultati sono più difficili da quantificare rispetto a IgA anti-gliadina o IgA tTG.

### ***Biopsia del piccolo intestino***

Si è a lungo discusso della necessità di una biopsia di *follow-up* in pazienti con miglioramento clinico, specie perché il *test* sierologico può essere adoperato come un utile strumento per monitorare il recupero funzionale e la conformità con la dieta. Un'endoscopia con biopsia dell'intestino tenue digiunale distale dovrebbe essere eseguita nei pazienti con malattia celiaca dopo avere stabilito che non rispondono ad una dieta priva di glutine o con ricomparsa dei sintomi nonostante una dieta priva di glutine. <sup>46</sup>



*Sprue refrattaria – Quadro istologico del piccolo intestino - Aumento dell'infiltrato nella lamina propria con criptite e ascessi, rarefazione e distorsione ghiandolare.*

(da <http://www.slideshare.net>)

### ***Pazienti non-responder***

I *non-responder* sono soggetti che continuano a manifestare sintomatologia persistente o hanno alterazioni sierologiche e/o anomalie istologiche dopo due anni di vita priva di glutine. La maggior parte infatti dei pazienti con malattia celiaca è responsiva ad una dieta priva

di glutine, ma circa il 5 per cento non lo è.

Nei pazienti *responder-incompleti* o *non-responder*, è importante considerare che non tutte le caratteristiche cliniche della malattia celiaca rispondono alla stessa velocità. Inoltre, la perdita di massa ossea dovuta all'iperparatiroidismo secondario e la neuropatia periferica migliora solo parzialmente nonostante una dieta priva di glutine.<sup>55</sup>

I pazienti che non rispondono ad una dieta priva di glutine rientrano in cinque categorie principali:

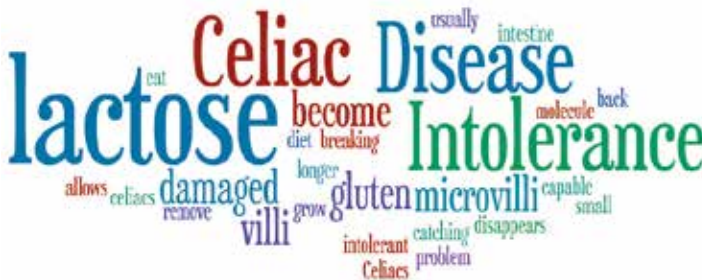
- pazienti con scarsa *compliance* o accidentale ingestione di glutine
- pazienti con caratteristiche cliniche o istologiche che si sovrappongono alla celiachia, ma sono causate da altri disturbi
- pazienti con disturbi concomitanti
- pazienti con sprue refrattaria
- pazienti con *jejunitis ulcerosa* o linfoma intestinale.

#### *Scarsa compliance o accidentale ingestione di glutine*

I motivi più comuni per la mancanza di risposta sono la scarsa conformità della dieta priva di glutine o l'ingestione accidentale di glutine.<sup>56, 57, 50-52</sup> Nei pazienti che continuano ad avere sintomi o anomalie istologiche persistenti, o in quelli nei quali i titoli anticorpali non sono diminuiti, è necessario procedere ad un'anamnesi dietetica meticolosa e accurata e ad una prescrizione dietetica da parte di personale esperto e addestrato nella malattia celiaca.

#### *Altre diagnosi*

Una diagnosi errata di sprue celiaca può derivare da falsa sierologia positiva, riguardante gli anticorpi IgA specificamente anti gliadina. Malattie associate del piccolo intestino con atrofia dei villi dovrebbero essere escluse in pazienti con sintomi persistenti che non mostrano un miglioramento istologico.<sup>50, 56</sup>



#### *Disturbi concomitanti*

Altre diagnosi per concomitanti malattie si dovrebbero tenere in considerazione in pazienti che, nonostante l'apparente rispetto della dieta priva di glutine, continuano ad avere sintomi o non hanno un miglioramento istologico.<sup>58, 59</sup> In una casistica di 78 pazienti con malattia celiaca trattati con dieta priva di glutine per almeno 12 mesi, si è osservata diarrea persistente in 13 pazienti (17%) a causa di altre diagnosi concomitanti<sup>59</sup> e cioè:

- intolleranza al lattosio concomitante o secondaria: è una possibile causa di continua diarrea e flatulenza.
- i pazienti con malattia celiaca possono avere disturbi intestinali concomitanti come la sindrome del colon irritabile, che colpisce gran parte della popolazione generale.



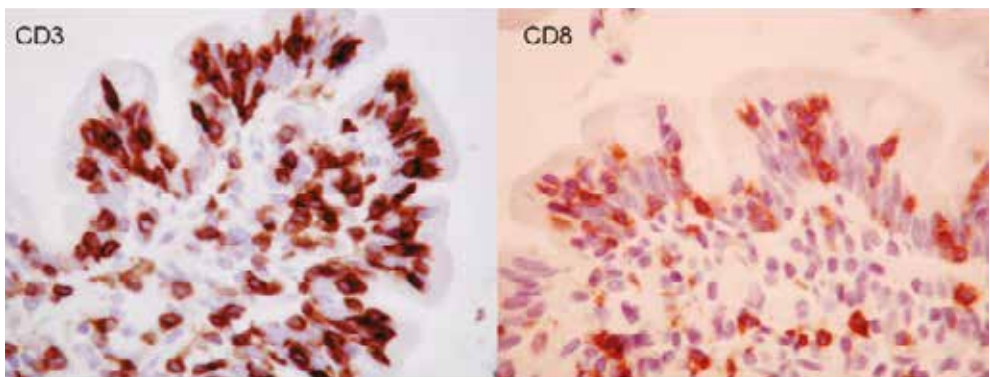
- proliferazione batterica dell'intestino tenue, che può rispondere agli antibiotici; si sviluppa in una piccola percentuale di pazienti con malattia celiaca.<sup>60,61</sup>
- Alcuni pazienti hanno coesistente insufficienza pancreatica.<sup>62</sup>
- colite microscopica, che si rileva nel 4 % dei pazienti con la malattia celiaca e che rappresenta un aumento di 70 volte del rischio<sup>63</sup>. Questi pazienti hanno una più grave atrofia dei villi e necessitano frequentemente di glucocorticoidi o di farmaci immunosoppressori per trattare la diarrea.
- sprue refrattaria - I pazienti con sprue refrattaria (noti anche come “sprue non classificati”) si dividono in due categorie cliniche:<sup>64,65</sup>
  - pazienti che non hanno risposta iniziale ad una dieta priva di glutine
  - pazienti che riportano un miglioramento clinico iniziale su una dieta priva di glutine, ma che dopo un periodo di remissione iniziano a sviluppare una malattia refrattaria all'astinenza dal glutine.



*Tipo 1 Infiltrativa*      *Tipo 2 Iperplastica*      *Tipo 3 Distruttiva (lieve)*      *Tipo 3 Distruttiva (marcata)*      *Tipo 3 Distruttiva (atrofia completa)*      *Tipo 4 Iperplastica*

La sprue refrattaria si suddivide in due categorie immunologiche:<sup>66, 67</sup>

- tipo 1, con normale popolazione di linfociti intraepiteliali.
- tipo 2, con popolazione linfocitaria, alterazioni aberranti o maligne dei linfociti intraepiteliali, basate su analisi delle clonalità dei recettori delle cellule T e immunofenotipizzazione. Il Tipo 2 può progredire a linfoma a cellule T enteropatia-correlato, che si può presentare clinicamente come *jejunitis ulcerativa*<sup>65</sup>. La diagnosi può essere stabilita sulla base di biopsia, TAC, risonanza magnetica; le scansioni PET permettono di identificare le aree sospette.<sup>68,69</sup>



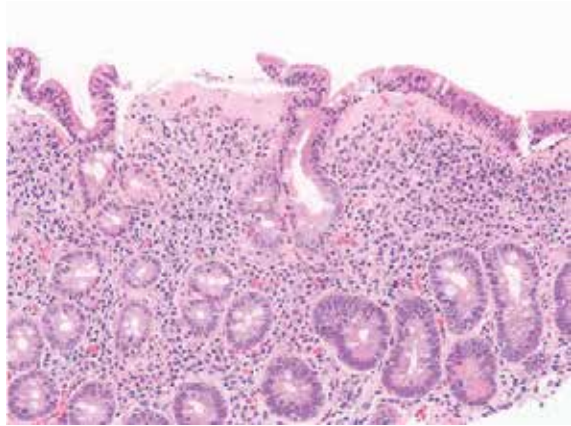
*Ulcerative jejunitis in a child with celiac disease, Terry Sigman et al., BMC Gastroenterology BMC series, open, inclusive and trusted 2014, 14:29, DOI: 10.1186/1471-230X-14-29*

La differenziazione tra i tipi 1 e 2 di sprue refrattaria è importante sia per la gestione che per la prognosi.<sup>46</sup> I pazienti con malattia di tipo 1 hanno un quadro clinico meno grave e una prognosi molto migliore rispetto ai pazienti con malattia di tipo 2.<sup>70,71</sup> Inoltre, il tipo 1 non sembra evolvere in Tipo 2.

Uno studio illustrativo su 41 pazienti con malattia di tipo 1 e su 50 pazienti con malattia di tipo 2 ha dimostrato sopravvivenza a cinque anni maggiore nel gruppo di tipo 1 (96 contro 58 %).<sup>70</sup>

La maggior parte delle morti erano dovute allo sviluppo di linfoma a cellule T (che ha sviluppato in una metà dei pazienti durante il *follow-up*). Nessun paziente con malattia di tipo 1 ha sviluppato la malattia di tipo 2 durante una media di cinque anni di *follow-up*. Un sistema di stadiazione (in base all'età, emoglobina, albumina, la presenza di cloni di cellule T, e atrofia dei villi totale) è stata proposta e attende ulteriore convalida.<sup>71</sup>

La sprue refrattaria (in particolare di tipo 2) può essere grave e può associarsi a progressivo malassorbimento e a morte, mentre un sottogruppo di pazienti manifesta deposizione di collagene subepiteliale, una condizione denominata “*collagenous sprue*”.<sup>72</sup>



(da [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net))

La causa della sprue refrattaria è sconosciuta. È possibile che alcuni pazienti con questa condizione sviluppino sensibilità ad un costituente dietetico diverso dal glutine.<sup>73</sup> Tuttavia, nella maggior parte dei pazienti, l'identificazione degli antigeni responsabili è difficile e poco gratificante. I pazienti con sprue refrattaria devono essere strettamente monitorati e ricevere un supporto nutrizionale aggressivo, tra cui, se necessaria, la nutrizione parenterale. Il trattamento si è concentrato sulla immunosoppressione, tradizionalmente basata sulla terapia steroidea.

### ***Bibliografia (per la malattia celiaca)***

- 1) Papista C, Gerakopoulos V, Kourelis A, Sounidaki M, Kontana A, Berthelot L, *et al.*, Gluten induces coeliac-like disease in sensitised mice involving IgA, CD71 and transglutaminase 2 interactions that are prevented by probiotics, *Lab Invest.* 2012, 92(4), 625-35.1 Introduction 12
- 2) Fasano A. *et al.*, Regulation of tight junctions, and autoimmune diseases, *Ann. N Y Acad. Sci.* 2012, 1258, 25-33
- 3) D'Arienzo R, Stefanile R, Maurano F, Mazzarella G, Ricca E, Troncone R, *et al.*, Immunomodulatory effects of Lactobacillus casei administration in a mouse model of gliadinsensitive enteropathy, *Scand. J. Immunol.* 2011, 74(4), 335
- 4) Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, *et al.*, Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity, *BMC Med.* 2011, 9, 23
- 5) Ford AC, Chey WD, Talley NJ, Malhotra A, Spiegel BM, Moayyedi P. Yield of diagnostic tests for celiac disease in individuals with symptoms suggestive of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis, *Arch. Intern. Med.* 2009, 169(7), 651-8

- 6) Tavakkoli H, Haghani S, Adilipour H, Daghighzadeh H, Minakari M, Adibi P, Ahmadi K, Emami MH., Serologic celiac disease in patients with inflammatory bowel disease, *Med. Sci.* 2012, *17*(2),154-8.
- 7) Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, *et al.* Spectrum of gluten- related disorders: consensus on new nomenclature and classification, *BMC Med.* 2012,*10*,13.
- 8) Lionetti E, Catassi C., New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment, *Int. Rev. Immunol.* 2011, *30*(4), 219-31.
- 9) Fasano A, Catassi C., Clinical practice. Celiac disease. *N. Engl. J. Med.* 2012, *367*(25), 2419-26.
- 10) Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, *et al.*, The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2013, *62*(1), 43-52.
- 11) Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, *et al.*, Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med.* 2011, *9*, 23.
- 12) US Food and Drug Administration. Federal register proposed rule-72 FR 2795 January 23 2007: food labeling; gluten-free labeling of foods, [http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/ - Food Allergens Labeling/ GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm077926.htm](http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/-FoodAllergensLabeling/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm077926.htm)
- 13) 34. Academy of Nutrition and Dietetics. Evidence analysis library. Celiac disease. Evidence analysis library project, <http://www.adaevidencelibrary.com/topic.cfm?cat=1403>
- 14) Shepherd SJ, Gibson PR., Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently diagnosed and long-term patients with coeliac disease, *J. Hum. Nutr. Diet.* 2013, *36*, 349-358.
- 15) Thompson T, Dennis M, Higgins LA, Lee AR, Sharrett MK., Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods? *J. Hum. Nutr. Diet.* 2005,*18*,163-9
- 16) Academy of Nutrition and Dietetics. Evidence analysis library. Celiac disease. Evidence-based nutrition practice guideline, <http://www.adaevidencelibrary.com/topic.cfm?cat=3677>.
- 17) Lee AR, Ng DL, Dave E, Ciaccio EJ, Green PH., The effect of substituting alternative grains in the diet on the nutritional profile of the gluten-free diet, *J. Hum. Nutr. Diet.* 2009, *22*, 359-63.
- 18) 38<sup>th</sup> Thompson T., ADA pocket guide to gluten-free strategies for clients with multiple dietary restrictions. Chicago, IL: American Dietetic Association, 2011.
- 19) Thompson T., Thiamin, riboflavin, and niacin contents of the gluten-free diet: is there cause for concern?, *J. Am. Diet. Assoc.* 1999, *99*, 858-62.
- 20) Ravelli A, Bolognini S, Gambarotti M, Villanacci V., Variability of histologic lesions in relation to biopsy site in gluten-sensitive enteropathy, *Am. J. Gastroenterol.* 2005, *100*, 177.
- 21) Janatuinen EK, Pikkarainen PH, Kempainen TA, *et al.*, A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease, *N. Engl. J. Med.* 1995, *333*,1033.
- 22) Cooper SE, Kennedy NP, Mohamed BM, *et al.*, Immunological indicators of coeliac disease activity are not altered by long-term oats challenge, *Clin. Exp. Immunol.* 2013,*171*, 313.
- 23) Peräaho M, Kaukinen K, Mustalahti K, *et al.*, Effect of an oats-containing gluten-free diet on symptoms and quality of life in coeliac disease. A randomized study, *Scand. J. Gastroenterol.* 2004, *39*, 27.

- 24) Janatuinen EK, Kempainen TA, Pikkarainen PH, *et al.*, Lack of cellular and humoral immunological responses to oats in adults with coeliac disease, *Gut* 2000, *46*, 327.
- 25) Sturgess R, Day P, Ellis HJ, *et al.*, Wheat peptide challenge in coeliac disease, *Lancet* 1994, *343*, 758.
- 26) Shidrawi RG, Day P, Przemioslo R, *et al.*, In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture, *Scand. J. Gastroenterol.* 1995, *30*, 758.
- 27) Högberg L, Laurin P, Fälth-Magnusson K, *et al.*, Oats to children with newly diagnosed coeliac disease: a randomised double blind study, *Gut* 2004, *53*, 649.
- 28) Schmitz J., Lack of oats toxicity in coeliac disease, *BMJ* 1997, *314*, 159.
- 29) Lundin KE, Nilsen EM, Scott HG, *et al.* Oats induced villous atrophy in coeliac disease, *Gut* 2003, *52*, 1649.
- 30) Thompson T., Gluten contamination of commercial oat products in the United States, *N. Engl. J. Med.* 2004, *351*, 2021.
- 31) Hall NJ, Rubin G, Charnock A., Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2009, *30*, 315.
- 32) Shaker JL, Brickner RC, Findling JW, *et al.*, Hypocalcemia and skeletal disease as presenting features of celiac disease, *Arch. Intern. Med.* 1997, *157*, 1013.
- 33) West J, Logan RF, Smith CJ, *et al.*, Malignancy and mortality in people with coeliac disease: population based cohort study, *BMJ* 2004, *329*, 716.
- 34) Green PH, Fleischauer AT, Bhagat G, *et al.*, Risk of malignancy in patients with celiac disease, *Am. J. Med.* 2003, *115*, 191.
- 35) Holmes GK, Prior P, Lane MR, *et al.*, Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet, *Gut* 1989, *30*, 333.
- 36) Collin P, Reunala T, Pukkala E, *et al.*, Coeliac disease--associated disorders and survival, *Gut* 1994, *35*, 1215.
- 37) Ventura A, Magazzù G, Greco L., Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease, *Gastroenterology* 1999, *117*, 297.
- 38) Cosnes J, Cellier C, Viola S, *et al.*, Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2008, *6*, 753.
- 39) Nørgård B, Fonager K, Sørensen HT, Olsen J., Birth outcomes of women with celiac disease: a nationwide historical cohort study, *Am. J. Gastroenterol.* 1999, *94*, 2435.
- 40) Ludvigsson JF, Montgomery SM, Ekbohm A., Celiac disease and risk of adverse fetal outcome: a population-based cohort study, *Gastroenterology* 2005, *129*, 454.
- 41) Collin P, Thorell L, Kaukinen K, Mäki M., The safe threshold for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease?, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004, *19*, 1277.
- 43) Macdonald Wc, Brandborg LI, Flick AI, *Et Al.* Studies Of Celiac Sprue. Iv., The Response Of The Whole Length Of The Small Bowel To A Gluten-Free Diet, *Gastroenterology* 1964, *47*, 573.
- 44) Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF., American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease, *Gastroenterology* 2006, *131*, 1981.
- 45) Herman ML, Rubio-Tapia A, Lahr BD, *et al.*, Patients with celiac disease are not followed up adequately, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2012, *10*, 893.
- 46) Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, *et al.*, ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease, *Am. J. Gastroenterol.* 2013, *108*, 656.
- 47) Hopper AD, Hadjivassiliou M, Hurlstone DP, *et al.*, What is the role of serologic testing in celiac disease? A prospective, biopsy-confirmed study with economic analysis, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2008, *6*, 314.

- 48) Kelly CP., Coeliac disease: Non-invasive tests to screen for gluten sensitive enteropathy and to monitor response to dietary therapy, Dublin University, Trinity College, Dublin, 1995.
- 49) Leffler DA, Edwards George JB, Dennis M, *et al.*, A prospective comparative study of five measures of gluten-free diet adherence in adults with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26:1227.
- 50) Vahedi K, Mascart F, Mary JY, *et al.*, Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease, *Am. J. Gastroenterol.* 2003, 98, 1079.
- 51) Bürgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, *et al.*, Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease, *Arch. Dis. Child.* 1991, 66, 941.
- 52) Kumar V, Lerner A, Valeski JE, *et al.*, Endomysial antibodies in the diagnosis of celiac disease and the effect of gluten on antibody titers, *Immunol. Invest.* 1989, 18, 533.
- 53) Kelly CP, Feighery CF, Gallagher RB, *et al.*, Mucosal and systemic IgA anti-gliadin antibody in celiac disease. Contrasting patterns of response in serum, saliva, and intestinal secretions, *Dig. Dis. Sci.* 1991, 36, 743.
- 54) Kilander AF, Nilsson LA, Gillberg R., Serum antibodies to gliadin in coeliac disease after gluten withdrawal, *Scand. J. Gastroenterol.* 1987, 22, 29.
- 55) Selby PL, Davies M, Adams JE, Mawer EB., Bone loss in celiac disease is related to secondary hyperparathyroidism, *J. Bone Miner. Res.* 1999, 14, 652.
- 56) Abdulkarim AS, Burgart LJ, See J, Murray JA., Etiology of nonresponsive celiac disease: results of a systematic approach, *Am. J. Gastroenterol.* 2002, 97, 2016.
- 57) Dewar DH, Donnelly SC, McLaughlin SD, *et al.*, Celiac disease: management of persistent symptoms in patients on a gluten-free diet, *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1348.
- 58) Leffler DA, Dennis M, Edwards George JB, *et al.*, A simple validated gluten-free diet adherence survey for adults with celiac disease, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2009, 7, 530.
- 59) Fine KD, Meyer RL, Lee EL., The prevalence and causes of chronic diarrhea in patients with celiac sprue treated with a gluten-free diet, *Gastroenterology* 1997, 112, 1830.
- 60) Rubio-Tapia A, Barton SH, Rosenblatt JE, Murray JA., Prevalence of small intestine bacterial overgrowth diagnosed by quantitative culture of intestinal aspirate in celiac disease, *J. Clin. Gastroenterol.* 2009, 43, 157.
- 61) Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G., High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in celiac patients with persistence of gastrointestinal symptoms after gluten withdrawal, *Am. J. Gastroenterol.* 2003, 98, 839.
- 62) Carroccio A, Iacono G, Lerro P, *et al.*, Role of pancreatic impairment in growth recovery during gluten-free diet in childhood celiac disease, *Gastroenterology* 1997, 112, 1839.
- 63) Green PH, Yang J, Cheng J, *et al.*, An association between microscopic colitis and celiac disease, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2009, 7, 1210.
- 64) Trier JS, Falchuk ZM, Carey MC, Schreiber DS. Celiac sprue and refractory sprue. *Gastroenterology* 1978; 75:307.
- 65) Ryan BM, Kelleher D., Refractory celiac disease, *Gastroenterology* 2000, 119, 243.
- 66) Mulder CJ, Wahab PJ, Moshaver B, Meijer JW., Refractory coeliac disease: a window between coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 2000, 32.
- 67) Olaussen RW, Løvik A, Tollefsen S, *et al.*, Effect of elemental diet on mucosal immunopathology and clinical symptoms in type 1 refractory celiac disease, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2005, 3, 875.

- 68) Hadithi M, Mallant M, Oudejans J, *et al.*, 18F-FDG PET versus CT for the detection of enteropathy-associated T-cell lymphoma in refractory celiac disease, *J. Nucl. Med.* 2006, *47*,1622.
- 70) Al-Toma A, Verbeek WH, Hadithi M, *et al.*, Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience, *Gut* 2007, *56*,1373.
- 71) Rubio-Tapia A, Kelly DG, Lahr BD, *et al.*, Clinical staging and survival in refractory celiac disease: a single center experience, *Gastroenterology* 2009, *136*, 99.
- 72) McCashland TM, Donovan JP, Strobach RS, *et al.*, Collagenous enterocolitis: a manifestation of gluten-sensitive enteropathy, *J. Clin. Gastroenterol.* 1992, *15*, 45.
- 73) Baker AL, Rosenberg IH., Refractory sprue: recovery after removal of nongluten dietary proteins, *Ann. Intern. Med.* 1978, *89*, 505.





## LA MODA DEL “LACTOSE AND GLUTEN FREE”: GUSTO O SALUTE?

LUIGIA FAVALLI

Chi ha paura dell'intolleranza cattiva? Tutti probabilmente. Con ciò si spiega il grande interesse che di recente si è concentrato, da una parte sulla diagnosi più o meno validata dei casi di intolleranza alimentare, e dall'altra sul commercio di una miriade di prodotti a marchio “gluten-free” oppure “lactose-free”.

Oggi le etichette corredate da diciture come “privi di glutine” e “senza lattosio” compaiono costantemente sui banconi dei negozi e nelle pubblicità televisive. Il desiderio di scegliere tali prodotti si sta rivelando una vera e propria moda: per cui il grande pubblico, probabilmente senza approfondite conoscenze in merito, viene indotto a pensare che siano solo questi alimenti dietetici ad essere i migliori per una sana nutrizione.

A ciò si aggiunge il fatto che in genere i cibi modificati attraverso una qualsiasi

tecnologia, anche se questa elimina un fattore nutritivo dall'alimento naturale, finiscono per costare significativamente di più dell'originale. Se ne erano già accorti molti anni fa alcuni addetti delle associazioni in difesa dei consumatori, che si chiedevano perché un prodotto “light”, cioè meno nutriente di quello tradizionale e magari diluito con acqua, dovesse risultare più caro.

La prima questione da sollevare sul tema delle intolleranze è che il glutine, particolare sostanza proteica che caratterizza la maggior parte dei cereali, e il lattosio, zucchero disaccaride presente nel latte e latticini, sono principi nutritivi del tutto naturali. Ogni individuo non affetto da specifiche intolleranze non solo li digerisce benissimo, ma può trarre da questi un certo gusto e un regolare contributo energetico e nutrizionale per l'organismo.

I nostri nonni, specie se soggetti a qualche fase di carestia alimentare, avevano già capito bene l'importanza dell'essere onnivoro, non per nulla avevano coniato il proverbio “quel che non strozza ingrassa...”. Diversa è ovviamente la situazione della persona intollerante. In questo caso glutine e lattosio non vengono assimilati come si deve e si scatenano i disturbi, per lo più di tipo gastrointestinale, che caratterizzano la relativa patologia. Alcune forme delle malattie connesse ad allergie ed intolleranze sono talmente evidenti che non c'è rischio di confusione nel fare la diagnosi.

Altre forme sono invece più subdole, per cui molte persone che presentano il classico “colon irritabile” possono effettivamente trarre giovamento dall'esclusione dei cibi a rischio per celiachia o deficit di lattasi.

Una ipotesi molto interessante chiama in causa per queste sindromi la lenta induzione di uno stato infiammatorio cronico, che si manifesterebbe pian piano con una specie di “autointossicazione cronica” creata da lievi stati di intolleranza subclinica prolungata. Su questa base razionale viene indicata come sana abitudine quella di eliminare fin da subito gli alimenti



a rischio, anche se al momento questi non creano alcun disturbo e si digeriscono benissimo.

In questo senso il lattosio merita però una considerazione diversa da quella relativa al glutine. La celiachia, intolleranza al glutine, nasce da un meccanismo complesso che comprende fenomeni immunitari. L'intolleranza al lattosio è dovuta invece alla "semplice" carenza dell'enzima lattasi, per cui se questa molecola funzionale non è sufficiente per metabolizzare il disaccaride nei suoi due componenti, glucosio e galattosio, si finisce per "intasare" la mucosa dell'intestino con "tossine indigerite" che provocheranno i classici disturbi.

Non si deve dimenticare tuttavia che la lattasi è quello che si definisce "enzima inducibile". Ciò significa che le quantità dalla sostanza possono aumentare se il contenuto di lattosio nei cibi è elevato, mentre esse finiscono per ridursi e anche scomparire se la dieta è priva di lattosio. Si sa bene che gli organismi viventi, uomo compreso, giocano spesso "al risparmio": se un organo o una funzione non vengono impiegati abbastanza a lungo si atrofizzano miseramente.

La filosofia alimentare (proposta per lo più dai vegani, che afferma come tutte le specie di mammiferi assumano il latte solo nelle prime fasi della vita e non debbano quindi cibarsi di latticini in età adulta) è quella che più radicalmente tende a far sopprimere l'attività lattasica nel tempo.

D'altra parte sono abbastanza numerose le persone che dopo l'infanzia abbandonano il bricco del latte per la colazione, dando la preferenza ad una buona tazza di the (mai assaggiato il "the all'inglese" con il suo buon contributo di latte?). Morale della favola: non possiamo più mangiare latticini perché soffriamo di intolleranza al lattosio oppure cadiamo nell'intolleranza al lattosio perché nella vita non abbiamo più assunto sufficienti quantità di latte e latticini?

Non si deve dimenticare tuttavia che ci sono casi di seria intolleranza al lattosio: per cui l'enzima lattasi è completamente assente fin dall'età giovanile. Sono questi i pazienti in cui una dieta "lactose-free" diventa indispensabile alla salute.

Di fronte al dubbio se sia veramente il caso di rivolgersi ai prodotti dietetici o meno vale comunque la pena di effettuare analisi idonee a valutare l'effettivo stato di intolleranza, tanto per il glutine che per il lattosio. Attenzione però: alcuni test propagandati sono piuttosto "fantasiosi" riguardo a vere e proprie basi scientifiche, e altri possono risentire di fattori di confondimento che producono "falsi positivi". È quindi necessario affidarsi a spe-



cialisti del settore che possano valutare i diversi aspetti della situazione individuale al fine di una diagnosi precisa.



Senza trascurare l'importanza del gusto! Anche qui il vecchio adagio insegna: “non vale la pena di vivere da malati per morire sani...”. L'Organizzazione Mondiale della Sanità continua a sostenere che una alimentazione sana e equilibrata dipende dalla scelta di una ampia varietà di alimenti. È quindi consigliabile scegliere diversi cibi in alternativa per la propria mensa.

Dando la preferenza, come dice il famoso gastronomo francese Anthelme Brillat-Savarin (1755-1826), ai cibi che sono gustosi e gradevoli al palato. Questo fa parte della qualità della vita. E qui ritornano in auge i prodotti “*lactose- and gluten-free*”. Se vi è una vera necessità clinica di esclusione di alcu-

ni cibi a causa di una diagnosticata intolleranza ben vengano le soluzioni “prive di glutine” o “senza lattosio”.

Ricordando però che ci sono diversi alimenti naturali, come i cereali che non contengono questi protidi (riso e mais in testa) e alcune granaglie di “non cereali” (grano saraceno, *quinoa*) che possono **rallegrare il piatto dei celiaci con golose ricette ad hoc facilmente reperibili sul Web (vedi in APPENDICE qualche esempio).**

Per gli intolleranti al lattosio, esclusa la possibilità di eventuale riattivazione dell'enzima lattasi con una “dieta di reintroduzione”, valgono i comuni latticini delattosati (contenenti solo i monosaccaridi glucosio e galattosio), se non i derivati della soia e del riso, forse poco gustosi al naturale, ma facilmente utilizzabili per bevande e manicaretti godibili per il palato. **Attenzione però! I cibi *lactose- e gluten-free* non sono prodotti dimagranti...**





*Capitolo 6*  
**STUDIO DELLE REAZIONI AVVERSE AL GLUTINE  
ED EVOLUZIONE DEI METODI DI ANALISI LABORATORISTICI**

SIMONETTA SIGNORINI

**Presentazione**

La malattia celiaca, l'intolleranza, l'allergia e la sensibilità al glutine sono le modalità di manifestazione di reazioni avverse al glutine.

L'identificazione e la diagnosi di queste forme che interessano l'organismo di alcuni soggetti esposti al glutine ha subito grandi innovazioni fino ad oggi, consentendo, con l'ausilio dell'esperienza clinica del Medico di base e dello Specialista (e la collaborazione delle aziende produttrici di *kit* diagnostici), di offrire *test* di laboratorio utili ed efficaci per l'inquadramento ed il supporto della diagnosi nonché il monitoraggio.

In questo capitolo saranno descritti brevemente la composizione del grano e del chicco o seme di grano, la storia e l'evoluzione dei *test* diagnostici in uso in laboratorio che ha consentito di migliorare l'appropriatezza degli esami, l'inquadramento e la definizione delle diverse tipologie di forme di reazioni avverse al glutine, l'efficacia dei risultati e possibilità di individuare un maggior numero di soggetti con queste problematiche e/o predisposti allo sviluppo di manifestazioni di intolleranza al glutine.

**IL GLUTINE**

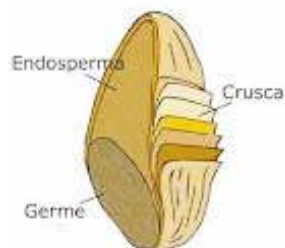
I grani o chicchi sono i semi delle piante di cereali e rappresentano la riserva ultima dell'energia che deriva dalla loro fotosintesi; questa energia la conservano in forma di amido e proteine di riserva.

Le proteine di riserva servono principalmente come sorgente di aminoacidi per la sintesi delle proteine, previa proteolisi o idrolisi proteolitica (Loponen, 2006).

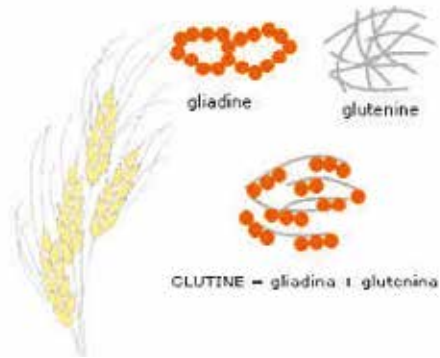
La proteolisi avviene mediante enzimi specifici detti proteasi, la maggior parte dei quali si formano durante la germinazione del chicco; tuttavia alcune proteasi sono già presenti nel chicco quiescente.

La germinazione è l'insieme dei meccanismi che porteranno alla nascita della giovane piantina, durante i quali il chicco prende l'acqua, mobilizza le molecole di riserva, attiva gli enzimi e si sottopone a diversi processi biochimici.

Le proteine del glutine, le glutenine e le gliadine, rappresentano la maggiore riserva di proteine del chicco del frumento e costituiscono circa il 75-80% delle proteine totali. Le gliadine rappresentano le proteine alcool-solubili, mentre le glutenine sono le proteine solubili in acidi diluiti.

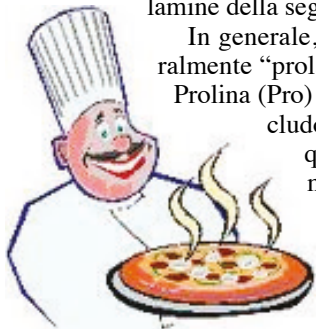


Le glutenine sono proteine altamente polimerizzate che consistono in diverse sub-unità di singole glutenine, legate insieme da legami disolfuro. Questa polimerizzazione porta alla formazione di molecole giganti, suddivise in due gruppi: glutenine ad alto peso molecolare (HMW) e glutenine a basso peso molecolare (LMW). Le gliadine sono monomeriche, sono formate da legami disolfuro solo intramolecolari ed in funzione della loro composizione aminoacidica sono classificate in  $\alpha$ -,  $\gamma$ - e  $\omega$ -gliadine. In particolare,  $\alpha$ - e  $\gamma$ - gliadine contengono residui di cisteina, mentre le  $\omega$ -gliadine non contengono residui di cisteina.



Come per il frumento, la maggior riserva delle molecole proteiche per la segale e l'orzo include sia proteine monomeriche che polimeriche, ma a differenza del frumento le prolamine della segale sono le secaline e quelle dell'orzo sono le ordeine.

In generale, le gliadine, le glutenine, le secaline e le ordeine sono definite generalmente "prolamine"; questo termine si riferisce a proteine ricche degli aminoacidi Prolina (Pro) e Glutamina (Gln) alcool-solubili, tipicamente presenti nei cereali; includono anche le glutenine solubili in acidi diluiti, le ordeine e secaline, in quanto diventano proteine alcool-solubili dopo la loro trasformazione in monomeri.



Le prolamine sono ulteriormente suddivise in tre sottogruppi sulla base del peso molecolare e tenore di zolfo: prolamine ad alto peso molecolare, prolamine ricche di zolfo, prolamine povere di zolfo.

A causa di questa classificazione multipla, la terminologia della "scienza" dei cereali è spesso confusa.

Per esempio, riguardo la malattia celiaca per "glutine" si intendono tutte le prolamine contenute nel frumento, segale e orzo, mentre nell'ambito alimentare della "cottura a forno" il termine "glutine" si riferisce alla componente viscoelastica nella struttura dell'impasto del frumento.

Le proteine del glutine, le glutenine polimeriche e le gliadine monomeriche rappresentano le proteine di riserva del chicco del frumento e la loro solubilità aumenta con l'aumentare delle condizioni di acidità. Durante lo stadio della germinazione e della maturazione del frumento, le proteine del glutine sono "impacchettate" in modo compatto nel chicco, per servire come sorgente di azoto nel momento in cui il chicco prende acqua e germina. Nella loro forma compatta (con legami disolfuro intra- ed inter-molecolari), le proteine del glutine non sono disponibili per la mobilizzazione; quindi è necessaria una iniziale disgregazione della struttura proteica compatta per essere utilizzate. Il sistema di riduzione dei legami disolfuro delle proteine (sistema tioredossina) può disgregare questa struttura compatta proteica.

Inoltre il sistema tioredossina può favorire la mobilizzazione delle proteine attivando alcuni enzimi idrolitici ed eventualmente inattivando alcuni inibitori di proteasi. L'effettiva idrolisi proteica enzimatica, detta proteolisi, viene condotta dalle proteasi specifiche del chicco del frumento. Il chicco del grano quiescente contiene infatti le aspartico-proteinasasi e la carbossi-peptidasi II (entrambe attivate in condizioni di ambiente acido) che iniziano la proteolisi nell'endosperma. Man mano che la germinazione procede, appare un "arsenale" di proteasi, delle quali le più importanti sono quelle della categoria "cisteina-proteinasasi".



## ANATOMIA DEL CHICCO DI GRANO E PROPRIETÀ NUTRITIVE

La cariosside (il frutto del grano) è costituita da tre parti:

- tegumenti o involucri (8% circa)
- endosperma amilaceo o mandorla farinosa (87-89% circa)
- germe di grano o embrione (2-4% in peso)

Ogni parte ha i suoi specifici nutrienti con relative proprietà. Il germe di grano, fermo restando che fa bene a tutti, è soprattutto indicato per la crescita dei bambini, per la dieta degli anziani, per gli sportivi.

Contiene le vitamine del gruppo B, vitamine del gruppo E, minerali (fosforo, magnesio), grassi, aminoacidi, acidi grassi insaturi, sostanze fitoattive e presenta un buon profilo proteico.

I benefici del germe di grano derivano dalla sua composizione.

Contiene le preziose vitamine del gruppo B (B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>), lecitina, provitamina A, D e soprattutto una elevata percentuale di vitamina E, che svolge un importantissima azione antiossidante in grado di contrastare il livello dei radicali liberi, implicati nei processi di invecchiamento e nelle patologie ad essi correlate.

Un adeguato apporto di vitamina E concorre in modo naturale a ritardare tali processi e a ridurre i danni degenerativi dovuti all'inquinamento atmosferico. La vitamina E, inoltre, fornisce un sostegno importante alle nostre difese immunitarie, rafforzandole.

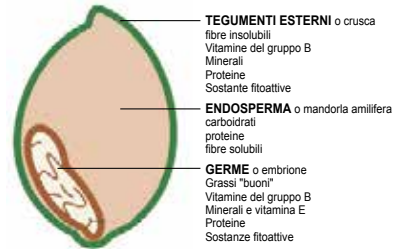
Un altro componente importante è la presenza di octacosanolo, che contribuisce a migliorare la resistenza alla fatica fisica negli atleti e l'efficienza mentale in chi studia e in chi usa molto la mente ed il ragionamento.

L'octacosanolo ha anche importanti effetti sulla fertilità e sulla potenza sessuale dell'uomo e in generale sul vigore di molte funzioni vitali: ad esempio, può rilasciare i muscoli contratti dalla tensione nervosa, aumentare l'efficienza degli organi di senso, l'acutezza visiva e la prontezza di riflessi; la forza e la resistenza alla fatica; può 'rischiare' la mente, offuscata dal superlavoro.

Il germe di grano contiene anche i seguenti oligoelementi: calcio, potassio, silicio, fosforo, zolfo, zinco, rame, ferro, magnesio, manganese, selenio e molibdeno.

Questa ricchezza in oligoelementi, coniugata con le vitamine e l'octacosanolo, rende questo alimento efficace e completo.

In particolare è da sottolineare anche l'attività riequilibrante del metabolismo lipidico che contribuisce a ridurre significativamente i valori di colesterolo nel sangue.



## MANIFESTAZIONI SINTOMATOLOGICHE CAUSATE DAL GLUTINE: INQUADRAMENTO E DEFINIZIONE DELLE PATOLOGIE FUNZIONALI

L'enzima coinvolto nella trasformazione del glutine è la transglutaminasi tissutale. Le transglutaminasi sono una famiglia di enzimi calcio-dipendenti, localizzate sia nei tessuti che nei fluidi corporei. Le funzioni di questi enzimi e il coinvolgimento nei meccanismi biochimici cellulari sono molteplici: adesione cellulare, apoptosi, riparazione dei tessuti, emostasi, neogenesi di tessuti epiteliali.

In funzione della loro localizzazione sono suddivise in quattro tipi: transglutaminasi serica (fattore XIII della cascata enzimatica della coagulazione), transglutaminasi cheratinocitica (TGk), transglutaminasi epidermica (Tge) e transglutaminasi tissutale (tTG).

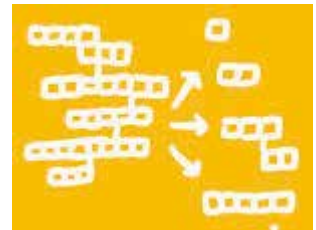
La transglutaminasi tissutale tTG è un enzima intracellulare localizzato a livello del citoplasma delle cellule endoteliali della muscolatura liscia di vene e arterie mesangiali, midol-





lari e dei fibroblasti. Questo enzima ha la funzione di catalizzare la formazione di legami isopeptidici tra residui di glutammina e lisina di varie proteine. Inoltre è implicato in numerosi processi biologici, tra cui il differenziamento cellulare, l'apoptosi e il metabolismo del glutine. A livello intestinale, quando non vi sono ammine accettrici disponibili, la transglutaminasi catalizza la trasformazione della glutammina in acido glutammico, carico negativamente, attraverso la reazione di deamidazione. I peptidi di gliadina neo-formati a seguito della modificazione dalla reazione di deamidazione acquisiscono cariche elettronegative, diventando così peptidi che legano più avidamente le molecole di HLA-DQ2 e DQ8 sulle cellule presentanti l'antigene (APC).

Si formano complessi di peptidi-HLA-DQ che possono attivare le cellule T nella mucosa dell'intestino tenue. Inoltre sembra che l'elevata affinità transglutaminasi-gliadina (e l'interazione tra queste due molecole), generi neo-epitopi con proprietà antigeniche, che determinano il riconoscimento da parte del sistema immunitario e l'inizio della risposta autoimmune, in quanto l'attivazione linfocitaria comporta non solo la produzione di anticorpi anti-gliadina, ma anche di auto-anticorpi anti-tTG tissutale.



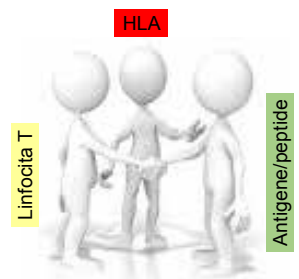
## COS'È IL SISTEMA HLA?

Il nostro sistema immunitario, affinché venga attivato, deve “incontrare” gli antigeni attraverso un “tramite” che ha il compito di “presentare” gli antigeni/peptidi. Il Complesso Maggiore d'Istocompatibilità – *Major Histocompatibility Complex (MHC)* - è un locus genico che porta l'informazione per la sintesi di una serie di glicoproteine di membrana cellulare, che hanno il ruolo di “presentare” ai linfociti T una *pool* di peptidi antigenici sconosciuti per innescare l'attivazione di una specifica risposta immune, sia cellulare che umorale.

Il nome **MHC** deriva dal fatto che la sua scoperta è avvenuta studiando il rigetto dei trapianti nel topo, fenomeno che dipende dalla compatibilità tra sistemi immunitari di donatore e ricevente. Nell'uomo le proteine dell'MHC prendono il nome di **HLA** o *Human Leucocyte Antigens*, perché studiate inizialmente nei leucociti. Le proteine dell'MHC o HLA appartengono a due classi distinte: quelle di classe prima (HLA I) sono di tipo **HLA-A, HLA-B, HLA-C** e sono espresse da praticamente tutte le cellule dell'organismo; quelle di classe seconda (HLA II) sono di tipo **HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR** e sono prodotte da cellule specializzate come macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B. Il locus genico dell'MHC è una regione di circa 32 Kb del braccio corto del cromosoma 6. In essa troviamo, oltre ai geni degli HLA summenzionati, numerosi altri geni correlati al sistema immunitario. La celiachia è strettamente correlata al sistema HLA classe II.

Dunque abbiamo già visto i tre elementi fondamentali di cui è caratterizzata la Celiachia:

- fattore esterno: ingestione di glutine
- predisposizione genetica
- risposta immunitaria



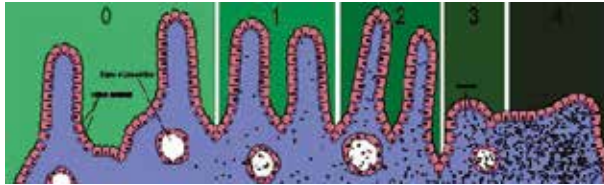
## QUALI ALTRI FATTORI?

Manca tuttavia il quarto fattore fondamentale che definisce la Celiachia: l'infiltrazione linfocitaria nella mucosa intestinale e la distruzione del villo intestinale fino al completo appiattimento della mucosa.

La diagnosi definitiva della malattia celiaca si basa sull'esame esofago-gastro-duodenoscopia (EGDS), un esame invasivo che permette di analizzare direttamente il duodeno o digiuno ed eseguire un prelievo biotico per visualizzare la struttura del villo intestinale e la presenza di eventuali linfociti intra-epiteliali (IEL).

Nel 1992 Marsh introdusse una classificazione in 4 stadi:

- stadio 0 = mucosa normale
- stadio 1 = aumento del numero dei linfociti intra-epiteliali, in genere in un numero superiore al 20% degli enterociti
- stadio 2 = proliferazione delle cripte di Lieberkühn
- stadio 3 = parziale o totale atrofia dei villi
- stadio 4 = ipoplasia dell'architettura dell'intestino tenue



Questa classificazione è stata poi modificata e rivista da Oberhuber *et al.* (1992), introducendo una suddivisione del tipo 3 in 3a, 3b, 3c, per cui la classificazione diventa:

- Lesione di tipo I o infiltrativa: villi nei limiti morfologici, rapporto villo/cripta nella norma (3/1), incremento del numero dei linfociti intraepiteliali IEL
- Lesione di tipo II o iperplastica: villi morfologicamente come nel tipo I, incremento del numero dei linfociti intraepiteliali IEL, iperplasia degli elementi ghiandolari.
- Lesione di tipo III o distruttiva: atrofia dei villi di grado variabile, associata a iperplasia delle cripte; gli enterociti di superficie sono di altezza ridotta, con *brush-border* irregolare e talora vacuoli citoplasmatici; incremento numero IEL come per tipo I e II. Ulteriormente suddiviso in tipo 3a, 3b, 3c in funzione del grado di atrofia del villo e aumento progressivo di linfociti intraepiteliali.



Successivamente, Corazza & Villanacci (2005) e Villanacci *et al.* (2011) hanno introdotto un'ulteriore semplificazione di questa classificazione:

| Tipo    | Grado e definizione | Effetto  |
|---------|---------------------|--|
| 1 e 2   | A (non atrofica)    | incremento patologico del numero di IEL                                |
| 3a - 3b | B1 (atrofica)       | il rapporto villo/cripta è < 3/1, ma i villi sono ancora individuabili |
| 3c      | B2 (atrofica)       | i villi non sono più individuabili                                     |

| Infiltrative<br>(Type 1)                                     | Hyperplastic<br>(Type 2)                              | Destructive<br>(Type 3)                                    |
|--|---|--|
| Close relatives of celiac patients                           | Celiac patients exposed to moderate amounts of gluten | Untreated celiac disease                                   |
| Treated celiac patients exposed to minimal amounts of gluten | Dermatitis herpetiformis without clinical enteropathy | Treated celiac patients exposed to large amounts of gluten |
| Dermatitis herpetiformis without clinical enteropathy        |   | Dermatitis herpetiformis with clinical enteropathy         |
| Tropical enteropathy   |   | Tropicale sprue  |

<http://www.medicel.unina.it/>

| Classificazione di Marsh-Oberhuber |   | Classificazione di Corazza-Villanacci |
|------------------------------------|---|---------------------------------------|
| Tipo 1                             | ▶ | Grado A                               |
| Tipo 2                             |   |                                       |
| Tipo 3a                            | ▶ | Grado B1                              |
| Tipo 3b                            |   |                                       |
| Tipo 3c                            | ▶ | Grado B2                              |

<http://www.celiachia.it/>

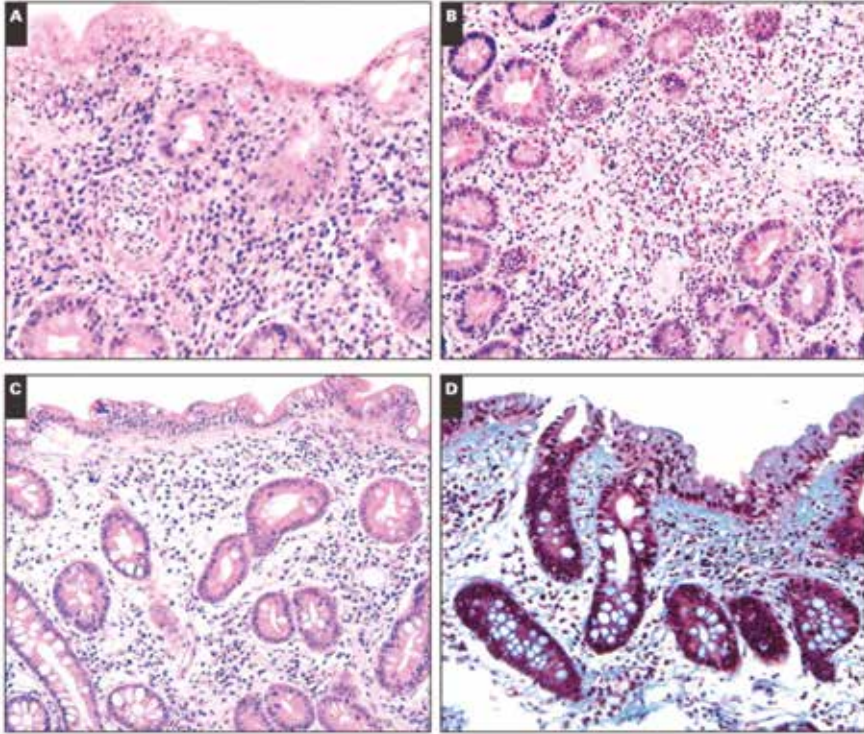
Nei soggetti celiaci che hanno la predisposizione genetica alla celiachia (HLA DQ2 –DQ8) i peptidi di gliadina carichi negativamente (formati a seguito della disgregazione del glutine ingerito da parte dell'enzima Transglutaminasi) vengono riconosciuti dal sistema HLA come "agenti esterni". Tale riconoscimento determina l'attivazione di meccanismi molecolari e cellulari dell'immunità, sia innata che adattativa. Il processo infiammatorio che si produce per l'aumentata produzione di citochine infiammatorie IL-15 ed IFN $\gamma$  determina l'alterazione della mucosa intestinale tipica della malattia celiaca: atrofia del villo intestinale, iperplasia delle cripte ed infiltrazione linfocitaria.

Solitamente la malattia celiaca può presentarsi nelle seguenti forme:

- **Tipica o classica**, caratterizzata da inappetenza, diarrea, dolori addominali, vomito, anoressia, rachitismo, addome globoso associato ad atrofia degli arti, alterazione dell'umore e del carattere.
- **Atipica**, con sintomatologia prevalentemente extra-intestinale. Le manifestazioni cliniche sono secondarie al malassorbimento: anemia da carenza di ferro che non risponde alla terapia orale, rachitismo, osteopenia/osteoporosi, displasia dello smalto dentario, ritardo puberale, anoressia, ipertransaminasemia, dermatite erpetiforme, dolori addominali ricorrenti.
- **Silente**, con nessun sintomo gastrointestinale; è caratterizzata da alterazione della mucosa intestinale tipica della celiachia in assenza di sintomatologia e marcatori sierologici positivi. È stata individuata nei soggetti appartenenti a gruppi a rischio, in particolare parenti di pazienti affetti da malattia celiaca ed in soggetti affetti da altre malattie autoimmuni (tiroidite, diabete autoimmune tipo I, etc.). Le manifestazioni sintomatologiche predominanti sono quelle extra-gastrointestinali, in particolare nei bambini di statura bassa: anemia, sintomi neurologici; negli adulti dermatite erpetiforme, anemia, infertilità, densità ossea ridotta, sindrome da intestino irritabile, dispepsia, reflusso gastro-esofageo, malattie autoimmuni, sintomi neurologici.
- **Latente o potenziale**, con nessun sintomo gastrointestinale, è caratterizzata da marcatori sierologici positivi, ma la mucosa intestinale si presenta normale. In questi soggetti (da monitorare nel tempo), solitamente la presenza di un evento acuto determina la manifestazione della malattia celiaca con lesione a livello della mucosa intestinale che regredirà solo a seguito di una dieta priva di glutine.



In tutte queste forme (esclusa la latente), la morfologia della mucosa intestinale è alterata. Oltre a queste forme è da aggiungere la **Dermatite Erpetiforme**, caratterizzata esclusivamente da manifestazioni cutanee.



A. Mucosa del piccolo intestino che mostra enterociti anomali nell'epitelio superficiale e infiammazione nella lamina propria, comprendente numerosi neutrofili e ascessi alle cripte.  
 B. Densa infiltrazione di eosinofili nella lamina propria della mucosa del piccolo intestino.  
 C-D. Sottile strato di collagene associato con atrofia dei villi nella mucosa del piccolo intestino (Brown J.S. et al., 2012).

## METODI DI ANALISI LABORATORISTICI

L'ingresso del laboratorio nella diagnostica della Celiachia si è fatto attendere fino agli anni '80 con la comparsa finalmente dei primi esami laboratoristici di *screening* non invasivi.

Le prime "diagnosi" si basavano esclusivamente sull'osservazione di sintomatologia di "diarrea ribelle", dal greco *Koiliakos*. Per rappresentare questa malattia intestinale, nel I° secolo d.C. **Aulo Cornelio Celso**, medico romano, nel suo trattato *De Re Medica* introdusse il termine "*Koiliakos*".

Successivamente, nel II° secolo d.C., **Aristeo di Cappadocia** descrisse bambini ed adulti affetti da celiachia (*De causis et signis acutorum morborum*).

Nel testo greco originale, il capitolo relativo alle "Diatesi celiache" descriveva le steatorree e, per la prima volta, anche osservazioni di altre sintomatologie associate, quali perdita di peso, pallore etc., sia negli adulti che nei bambini.





Verso la metà del XVIII secolo (1760), **Jean Astruc** (medico di Montpellier, Francia) aggiunse un'altra caratteristica nella definizione della diarrea dell'infanzia in una pubblicazione dal titolo "*On the diarrhoeas of infants*", cioè la presenza di "chilo" nelle feci.



Cento anni dopo, nel 1880, **Samuel Gee** (un pediatra britannico) descriveva la malattia celiaca in bambini fra 1 e 5 anni, soffermandosi in particolare (nel testo dal titolo "*The Coeliac Affection*") sulle caratteristiche delle feci "pallide, non liquide, ma non formate".

Fino a quel momento, tuttavia, non si conoscevano in modo completo le cause di questa malattia, ma si sconsigliava l'uso di farinacei.

Nel 1908 **C.A. Herter** (un medico statunitense) riscopriva la malattia in America e da allora in Europa viene usato il termine di malattia di Gee-Herter, con la definizione di "Infantilismo intestinale", caratterizzato dalla compromissione della crescita.

Intorno al 1924 **S.V. Haas** (medico di New York) propose la dieta della banana nel trattamento di bambini affetti da anoressia e diarrea.

Durante gli anni della 2ª Guerra Mondiale (1939-1945), **W.M. Dicke** (un pediatra tedesco) scoprì un tassello fondamentale della malattia celiaca: osservando i bambini sfamati in quell'inverno con patate, bulbi di tulipano e non con derivati del frumento, individuò il glutine come responsabile della celiachia e tale argomento fu oggetto della sua tesi di Laurea in Medicina.



Nel 1954 il Dr. **J. W. Paulley** (un medico inglese) descrisse l'alterazione della mucosa intestinale per la presenza di atrofia dei villi con ipertrofia delle cripte.

Negli anni 1965-66 **W. Macdonald** suggerì un'ereditarietà autosomica dominante con penetranza incompleta. Venne richiamata l'attenzione sull'associazione dermatite erpetiforme e malattia celiaca (**J. Marks e Coll.**, 1966).

Negli anni 1969-75, in caso di sospetto per malattia celiaca, la diagnosi avveniva tramite esame istologico di tre biopsie intestinali:

- a dieta libera per evidenziare la presenza di atrofia dei villi
- a dieta priva di glutine per verificare la remissione
- dopo riesposizione al glutine in caso di risultato equivoco con reintroduzione del glutine nella dieta e verifica di presenza di atrofia dei villi

Queste biopsie avevano lo scopo di confermare la glutine-dipendenza delle lesioni intestinali e della sintomatologia clinica.

Il laboratorio comincia a fare il suo ingresso a supporto della diagnostica mediante l'osservazioni di alterazioni ematologiche e biochimiche associate alla celiachia:

- Linfocitopenia, MCV (aumentato o ridotto), RDW (di solito aumentato).
- Diminuzione di Ferro, Ferritina, Calcio, Fosforo, IgA, Acido Folico, Vitamina B<sub>12</sub>, Albumina, Colesterolo.
- Aumento di Transaminasi, Fosfatasi Alcalina, PT, PTH.

Negli anni '80 il laboratorio inizia ad utilizzare dei marcatori sierologici specifici per lo *screening* e diagnosi della celiachia.

## I PRIMI MARCATORI SIEROLOGICI

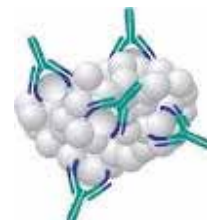
Dal 1960 in laboratorio vennero introdotte tecniche di immunodosaggio, cioè identificazione e dosaggio quantitativo di una molecola/antigene, sfruttando la reazione antigene-anticorpo.

La risoluzione della struttura cristallografica di alcuni complessi immunoglobulina-antigene ha permesso di chiarire alcuni aspetti delle interazioni anticorpo-antigene. Sfruttando questa reazione è possibile:

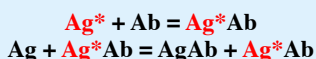
1. Identificare la molecola
2. Dosarla in modo quantitativo

Affinché si realizzino i punti 1 e 2 è necessario l'utilizzo di un tracciante specifico per la rilevazione della reazione antigene/molecola da dosare-anticorpo.

I primi metodi introdotti furono le tecniche Radioimmunologiche (RIA) di tipo competitivo.



L'aggiunta dell'antigene marcato  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$  compete con l'antigene da identificare e dosare. In presenza di un anticorpo specifico in quantità limitata, maggiore è la concentrazione di antigene non radioattivo, minore sarà la quantità di antigene marcato radioattivo legato all'anticorpo. Per interpretare questo dato si usa un'apposita curva di taratura, che è prodotta aggiungendo quantità note e crescenti di antigene non marcato (del campione da analizzare) alla miscela all'equilibrio con l'antigene marcato. La curva mostra ovviamente un andamento discendente della frazione legata all'aumentare della concentrazione dell'antigene non marcato. Al valore della curva è poi sottratto un "bianco" che rappresenta il legame non specifico dell'isotopo radioattivo contenuto nella frazione legata. Il valore di concentrazione dell'antigene nel campione da misurare si ottiene per **interpolazione** del valore di radioattività misurato con questa curva. Per questo metodo RIA il tracciante è un isotopo radioattivo.



Legenda: **Ag\*** = Antigene marcato; **Ag** = Antigene non marcato (del campione da analizzare); **Ab** = Anticorpo.

Questa metodica ha subito delle migliorie mediante la fissazione dell'anticorpo su fase solida, l'uso di anticorpi prodotti tramite immunizzazione di animali da laboratorio e l'utilizzo di traccianti non radioattivi.

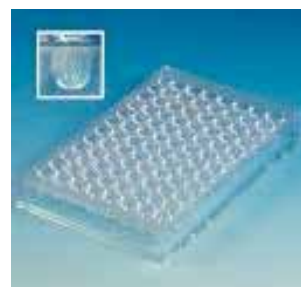
Gli anticorpi prodotti possono essere policlonali o monoclonali.



I policlonali sono miscele di anticorpi che derivano da "cloni" di plasmacellule (cellule deputate alla produzione di anticorpi) diversi, cioè che presentano una eterogeneità nella struttura dell'anticorpo con definite regioni costanti e regioni variabili, detti anche "domini", che sono coinvolti nel riconoscimento e legame dell'antigene (regione variabile) e nelle funzioni effettrici degli anticorpi (regione costante).

I monoclonali sono anticorpi che derivano da un solo clone di plasmacellule e sono quindi identici sia nella regione variabile che costante.

Oltre alla metodica RIA, nuove metodiche si sono sviluppate, sempre basandosi sul principio antigene-anticorpo, migliorando sempre più la sensibilità, la specificità del metodo riducendone i costi, la tipologia dei traccianti, la sicurezza nella manipolazione dei reattivi necessari alla reazione e semplificando i passaggi con la possibilità di automatizzare i processi.





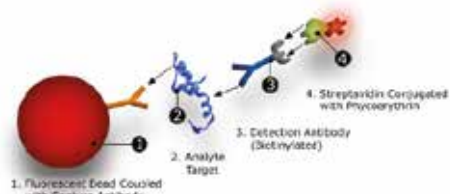
La sensibilità e specificità di un metodo indica rispettivamente la capacità di individuare la molecola associata alla malattia, dunque di rilevare i soggetti veramente malati all'interno della popolazione: VP/VP + FN (VP= Veri positivi; FN = Falsi negativi).

La specificità di un metodo indica la capacità di individuare i soggetti sani all'interno della popolazione: VN/VN + FP (VN= Veri negativi; FP = Falsi positivi).

Queste due caratteristiche fondamentali delle metodiche spesso non possono raggiungere entrambe il 100% , ma un buon metodo raggiunge un ottimo compromesso fra queste due caratteristiche.

Le metodiche introdotte successivamente sono state:

- Immunofluorescenza Indiretta (IFI)
- Immunoenzimatica (ELISA)
- Luminescenza
- Chemiluminescenza



Ciò che varia tra queste differenti metodiche sono:

- i supporti/fase solida o substrati utilizzati per fissare l'antigene; nel caso del metodo Immunofluorescenza Indiretta i substrati possono essere sezioni di tessuti animali o cellule fissate e rappresentano direttamente l'antigene;
- l'utilizzo di anticorpi monoclonali o policlonali;
- la ricerca dell'antigene diretta o indiretta;
- i metodi di rilevazione/traccianti (tipologia di segnale associato all'anticorpo che lega l'antigene/molecola da identificare e dosare).

Il principio rimane lo stesso, cioè si sfrutta la reazione antigene-anticorpo.

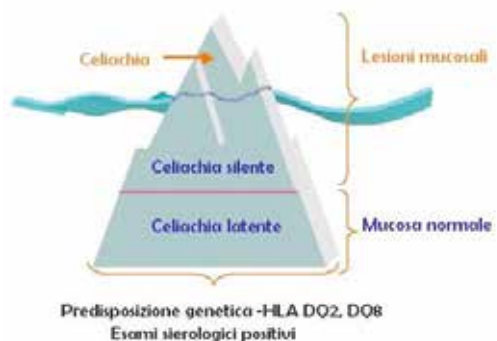
Sicuramente l'introduzione di queste metodiche, in particolare ELISA, Luminescenza e Chemiluminescenza, ha determinato un miglioramento qualitativo in termini di sensibilità e specificità rispetto alla metodica RIA, che man mano andrà scomparendo.

Per quanto riguarda i marcatori sierologici della celiachia, i primi anticorpi ricercati nei campioni dei soggetti affetti da malattia celiaca sono stati proprio gli anticorpi anti-Gliadina antigene nativo, cioè la frazione del glutine alcool-solubile di classe IgA ed IgG.

La ricerca della classe anticorpale IgA per la celiachia rappresenta il marcatore più importante, in quanto le Immunoglobuline IgA sono presenti nelle secrezioni e sulle superfici delle mucose e sono l'espressione dell'immunità locale a livello delle stesse.

La ricerca degli anticorpi di classe IgG è importante nei soggetti che hanno un *deficit* selettivo per le Immunoglobuline A, per cui non producendo questa classe anticorpale in modo completo e nelle quantità necessarie, non possono essere rilevate.

Inoltre sono utilizzate in fase di monitoraggio della dieta priva di glutine, dove gli anticorpi di classe IgA cominciano a decrementare già dopo 1-3 mesi dall'inizio della dieta priva di glutine (fino a scomparire completamente), mentre le IgG permangono positive anche fino ad un anno dall'inizio della dieta; ovviamente nei soggetti con *deficit* IgA gli anticorpi di classe IgG sono gli unici che possono essere misurati in fase di monitoraggio.



Dal momento che vennero introdotti questi primi marcatori sierologici per lo *screening* diagnostico per la malattia celiaca fu evidente che i soggetti diagnosticati erano una percentuale molto bassa rispetto a quelli “reali”.

Dunque era necessario ricercare ed introdurre nuovi marcatori più sensibili e specifici.

Infatti gli anticorpi anti-Gliadina Nativa IgA ed IgG hanno caratteristiche di sensibilità e specificità basse, rispettivamente 70-90% e 82-92%.

Inoltre possono essere rilevati anche in soggetti non affetti da Celiachia, ma da altri disordini, come: Morbo di Crohn, Rettocolite Ulcerosa, Artrite Reumatoide, Gastrite, Sindrome di Down, Fibrosi Cistica, Psoriasi e anche in soggetti sani.

Il *test* genetico di predisposizione alla Celiachia HLA morbo celiaco DQ2-DQ8 (scoperto tra gli anni 60-70) ha sicuramente fornito indicazioni utili in merito alla predisposizione genetica e dunque ha contribuito almeno a selezionare i soggetti predisponenti, cioè con probabilità di sviluppo di celiachia, oppure a escludere qualsiasi predisposizione.

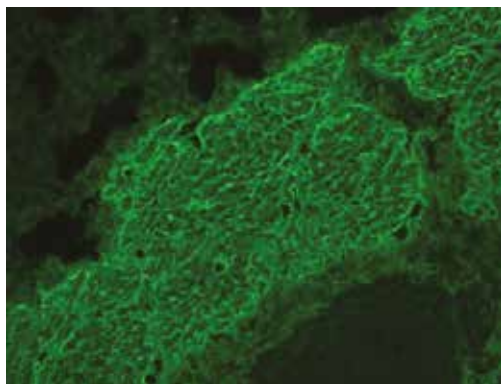
L'introduzione della ricerca degli anticorpi anti-Endomisio ha rappresentato e rappresenta il marcatore più specifico per lo *screening* di laboratorio della celiachia e sicuramente ha migliorato la sensibilità rispetto alla ricerca degli anticorpi anti-Gliadina IgA ed IgG Nativa.

L'endomisio è il rivestimento di fibre reticolari che circonda ciascuna cellula della muscolatura liscia.

Gli anticorpi anti-Endomisio di classe IgA sono rilevabili nella quasi totalità dei soggetti affetti da celiachia florida; in questi soggetti la dieta priva di glutine determina la normalizzazione di questi anticorpi in circa 4-12 mesi.

Nei bambini celiaci con età inferiore ai 2 anni possono essere assenti.

Nei celiaci con *deficit* di Immunoglobuline IgA saranno rilevabili anticorpi anti-Endomisio di classe IgG.



*Anticorpi anti-Endomisio sezione di Esofago di scimmia regione prossimale.*

Anche per questa metodica il principio di rilevazione si basa sulla reazione antigene-anticorpo e l'uso di un tracciante per identificare questo complesso e dosarlo.

Il substrato non è rappresentato da un antigene presente nel pozzetto di una micropiastre, ma la sezione criostatica di muscolatura liscia di un tessuto (solitamente esofago di scimmia regione distale, poiché più ricca della porzione di tessuto “endomisio”, fissata su vetrino) dove si vanno a ricercare gli eventuali anticorpi presenti nel siero del campione da analizzare, oppure una sezione di cordone ombelicale umano (meno utilizzata).

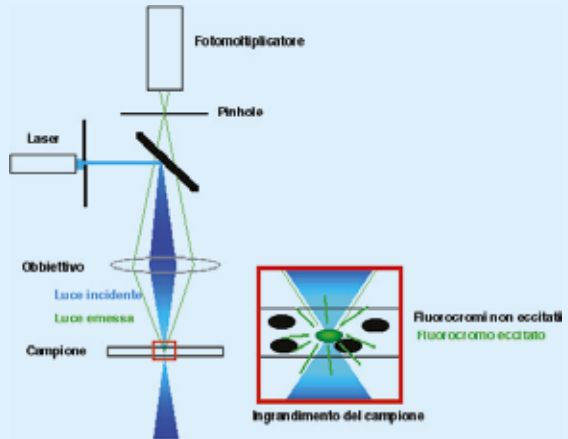
L'identificazione avviene mediante osservazione con microscopio a fluorescenza, sostituito attualmente da sistema illuminatore a LED (*Light Emitted Diode* o Diodo ad Emissione Luminosa).

A differenza della lettura al microscopio a “luce bianca” classica, il microscopio è dotato di una sorgente di illuminazione aggiuntiva, che ha lo scopo di illuminare il preparato da osservare e allo stesso tempo di provocare l'eccitazione del tracciante o fluorocromo o coniugato fluorescente (in questo caso la Fluoresceina o FITC).

La molecola di FITC eccitata emette luce che viene visionata agli oculari del microscopio come colorazione verde.  
Per selezionare la lunghezza d'onda opportuna per l'eccitazione del FITC (~ 450 nm) e quella di emissione visionata al microscopio (~ 550 nm), il microscopio è dotato di due filtri: filtro di eccitazione e filtro di emissione.

L'illuminatore tradizionale è una lampada ai vapori di mercurio, mentre attualmente si utilizzano illuminatori a LED che consentono i seguenti vantaggi:

- durata praticamente illimitata
- sicurezza di utilizzo
- stabilità dell'illuminazione/eccitazione

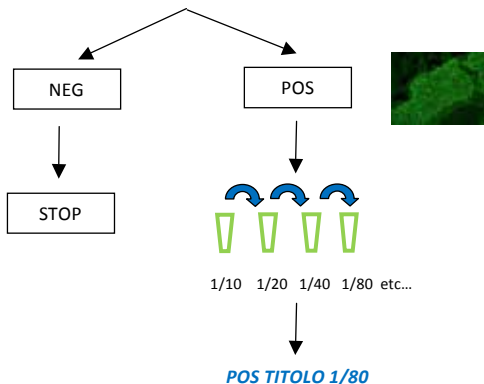


Questa metodica, caratterizzata da una sensibilità superiore al 90% e, soprattutto, di una specificità pari al 100%, non permette di fornire un dato quantitativo reale vero e proprio, perché basata sull'osservazione soggettiva al microscopio; dunque è possibile solo fornire un valore in titolo, ottenuto, in caso di positività, diluendo il campione per raddoppio a partire dalla diluizione di *screening* e verificare l'ultima diluizione dove è ancora visibile la fluorescenza con il quadro tipico degli anticorpi anti-Endomisio.



Ad esempio:

diluizione di *screening* 1/10  
(1 parte di campione + 9 parti di diluente, solitamente tampone PBS)



Pertanto, nonostante il miglioramento della *performance* di sensibilità (e soprattutto specificità), l'utilizzo di questa metodica presenta comunque dei limiti:

- Soggettività nella lettura del preparato
- Riproducibilità del dato analitico
- Limite di precisione del dato quantitativo reale nel monitoraggio nei soggetti a dieta priva di glutine
- Necessità di operatori esperti per la lettura ed interpretazione del vetrino.

Ulteriori studi hanno dimostrato che la positività individuata per endomisio è determinata da un antigene specifico, la Transglutaminasi (Dieterich W., 1997).

Come già evidenziato, la Transglutaminasi è l'enzima responsabile della trasformazione del glutine ingerito ed in particolare nella neoformazione dei peptidi di gliadina.

In laboratorio vengono ricercati gli anticorpi anti-transglutaminasi tissutale (tTG) in quanto consentono di coprire ed individuare la quasi totalità dei soggetti celiaci.

Per quanto riguarda i pazienti affetti da Dermatite Erpetiforme, la ricerca degli anticorpi anti-tTG tissutale risulta positiva nella maggior parte dei casi, tuttavia esiste anche un *kit* diagnostico per la ricerca degli anticorpi anti-transglutaminasi epidermica (Tge), specifica per i soggetti affetti da Dermatite Erpetiforme. Questo *test* diagnostico per Tge rimane come esame specialistico per inquadrare in modo preciso la forma di patologia. Va utilizzato esclusivamente quando la ricerca anticorpale (eseguita con la transglutaminasi tissutale) risulta negativa in presenza di manifestazioni cutanee evidenti associate a predisposizione genetica, con esame biotico positivo. Per questo motivo è poco diffuso e non eseguito in tutti i laboratori.

La ricerca degli anticorpi anti-transglutaminasi IgA è eseguita mediante il principio medesimo di individuazione e dosaggio del complesso antigene-anticorpo, dove l'antigene tissutale transglutaminasi è immobilizzato nei pozzetti di una micro-piastra o su *beads* specifiche per i metodi in Chemiluminescenza/Luminescenza. Rappresenta oggi il metodo di *screening* più sensibile per la diagnostica di laboratorio della Celiachia.

Questo metodo di ricerca presenta i seguenti vantaggi:

- dosaggio quantitativo dell'eventuale presenza di anticorpi
- riproducibile ed automatizzabile
- maggiore sensibilità rispetto agli anticorpi anti-Endomisio
- marcatore sierologico utile anche nella fase di monitoraggio della dieta priva di glutine

La possibilità di utilizzare una metodica di *screening* per la Celiachia con sensibilità molto elevata, considerando che questa patologia interessa anche (ed in gran numero) bambini, ha determinato l'ingresso di *test* rapidi in vendita presso le farmacie. È possibile, anche con solo una goccia di sangue da polpastrello del dito, eseguire questi *test* con tempi di risposta di qualche minuto.

Tuttavia i *test* rapidi non consentono di avere caratteristiche di specificità e sensibilità totalmente sovrapponibili ai *test* utilizzati in laboratorio e nemmeno di fornire valori quantitativi precisi in caso di positività. Dunque è fortemente consigliato (soprattutto se il risultato fosse positivo) eseguire *test* di conferma con prelievo di sangue in laboratorio.

Dato il "ventaglio" di esami a disposizione per lo *screening* sierologico della celiachia, la presenza di *test* rapidi a disposizione degli utenti che possono eseguire questi esami autonomamente senza effettuare un'anamnesi presso il Medico curante o Specialista, diventa sempre più importante e necessario l'utilizzo di un algoritmo diagnostico per l'appropriatezza delle richieste esami e la necessità di introdurre delle Linee Guida di riferimento.

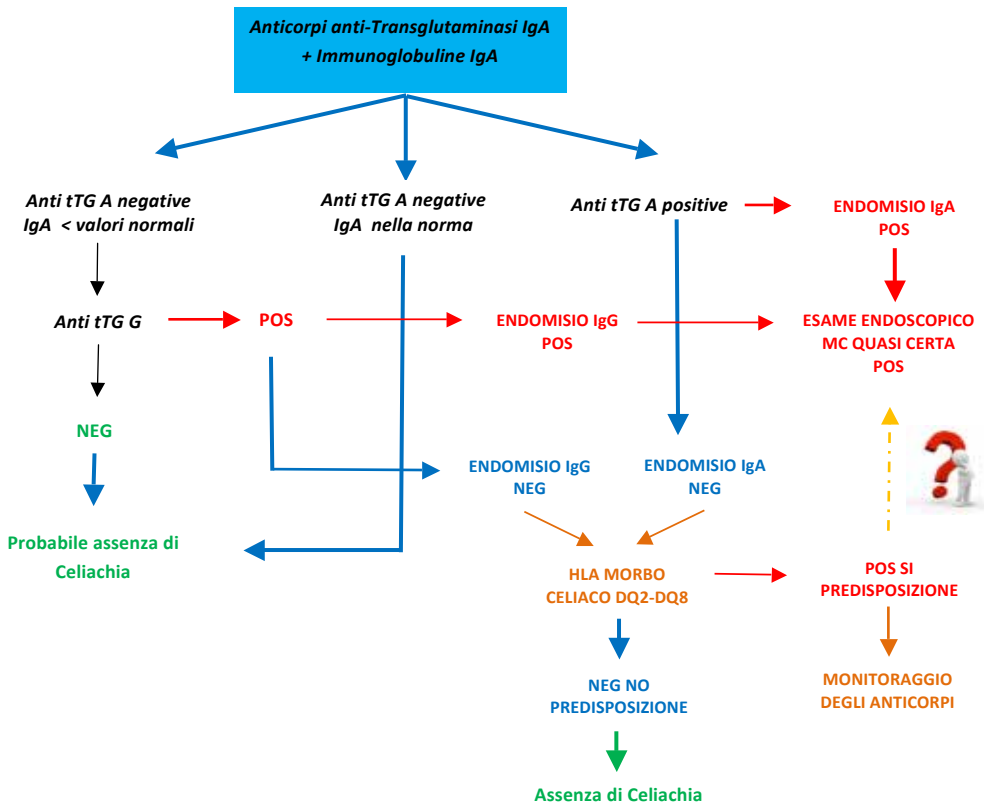


Le linee Guida per le richieste degli esami di laboratorio si basano sull'EBM (*Evidence Base Medicine*), cioè sui risultati evidenti di efficacia; in questo caso ci riferiamo all'appropriatezza diagnostica degli esami di laboratorio utilizzati, a seguito di studi effettuati, rispettivamente, su popolazione sana ed affetta da patologia. Per la Celiachia è necessario includere anche i soggetti con *deficit* di Immunoglobuline IgA, i bambini con età < 2 anni, l'eventuale presenza di familiarità per la celiachia (predisposizione genetica) e considerare che la diagnosi finale è comunque determinata dall'esame esofago-duodeno-endoscopico e biptico dei villi intestinali, cioè ricercare ed evidenziare l'eventuale danno alla mucosa intestinale. Le Linee Guida inoltre sono sempre in aggiornamento in funzione delle modifiche o introduzione di nuovi marcatori sierologici caratterizzati da migliore sensibilità e specificità diagnostica.

La recente introduzione degli anticorpi anti-Gliadina peptide deamidato IgG ed IgA (in sostituzione dell'antigene nativo) ha determinato l'ingresso di "nuovi marcatori" più sensibili e specifici da inserire opportunamente nell'algoritmo diagnostico.

L'antigene peptide deamidato rappresenta il prodotto di trasformazione dell'enzima Transglutaminasi sul glutine ingerito e dunque sicuramente l'eventuale risposta anticorpale rilevata è più specifica per i soggetti celiaci.

Di seguito riporto l'evoluzione delle Linee Guida redatte dai gruppi scientifici SIMEL e ESPHGAN in base all'aggiornamento dei marcatori sierologici disponibili ed ai continui studi delle manifestazioni sintomatologiche dei soggetti celiaci.



Legenda:

Anti tTG A = Anticorpi anti Transglutaminasi IgA; Anti tTG G = Anticorpi anti Transglutaminasi IgG  
Linee Guida SIMeL 2005

Per i bambini con età < 5 anni, nei quali il sistema immunitario è in fase di maturazione, l'algoritmo è il medesimo, con la differenza che oltre agli anticorpi anti-Transglutaminasi IgA verranno ricercati anche gli anticorpi anti-Gliadina Nativa IgA ed IgG, proprio perché è possibile in questa fascia di età individuare bambini celiaci con la sola positività per anticorpi anti-Gliadina Nativa IgA e/o IgG.

Anche in questo caso, se siamo in presenza di *deficit* di IgA, saranno eseguiti i marcatori anticorpali solo di classe IgG (Transglutaminasi IgG e Gliadina IgG ed eventualmente in caso di positività gli anticorpi anti-Endomisio IgG).

In questo primo algoritmo non erano contemplati gli anticorpi anti-Gliadina se non per i bambini di età inferiore ai 5 anni; questo perché i bambini in questa fascia di età con sospetto di Celiachia potevano presentare anticorpi anti-Gliadina Nativa e non anticorpi anti-Transglutaminasi IgA.

L'utilizzo degli anticorpi anti-Gliadina Nativa in fase di *screening* per sospetto di Celiachia in adulti e bambini con età > 5 anni era sconsigliato, date le caratteristiche non ottimali di sensibilità e soprattutto di specificità per la Celiachia.

Questi anticorpi potevano essere utilizzati solo in fase di monitoraggio per dieta priva di Glutine in soggetti affetti da Celiachia, poiché potevano fornire ulteriori informazioni in merito all'andamento e efficacia della dieta.

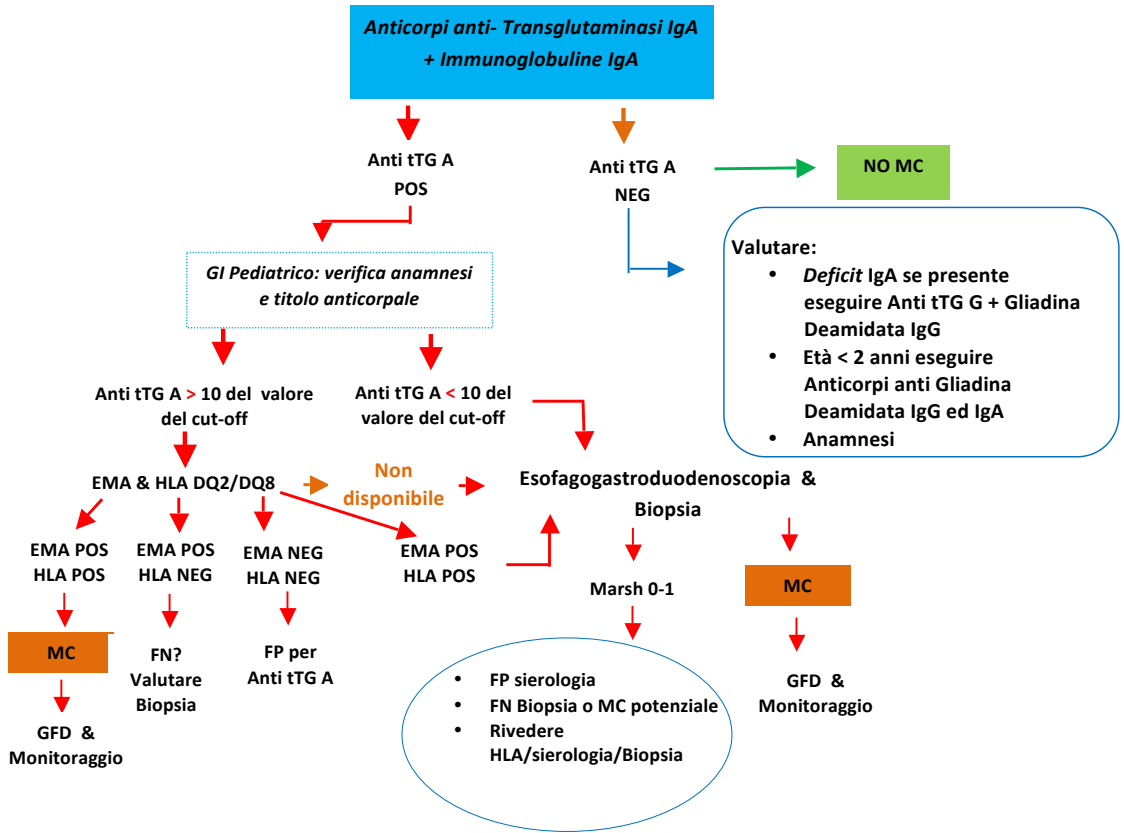
Nel 2006, a seguito dell'osservazione di esiti di false positività per gli anticorpi anti-Gliadina Nativa (determinati da altre cause differenti dalla Celiachia), le Linee Guida sono state riviste. Per quanto riguarda l'età dei bambini al di sotto della quale è utile ricercare anche gli anticorpi anti-Gliadina Nativa IgA e/o IgG, viene spostata alla fascia di età < 2 anni anziché < 5 anni.

Le ultime Linee Guida sono state redatte nel 2012 dal gruppo ESPGHAN (*European Society for Pediatric Gastroenterology and Hepatology and Nutrition*) e NASPGHAN (*North American Society for Pediatric Gastroenterology and Hepatology and Nutrition*).

Queste Linee Guida, riferite soprattutto a bambini ed adolescenti, precisano maggiormente l'utilizzo dei marcatori sierologici, compresa l'introduzione degli anticorpi anti-Gliadina Peptide Deamidato e l'importanza della ricerca HLA DQ2-DQ8 nei casi dubbi o di discrepanza dei risultati anticorpali.

L'esame esofago-gastro-duodenoscopico con prelievo bioptico rimane il *Gold Standard*, cioè esame di riferimento per la diagnosi, ma questo può essere evitato quando i risultati sierologici anticorpali sono di entità molto elevata (superiore a 10 volte il valore di riferimento per gli anticorpi anti-Transglutaminasi IgA) e fornisce Linee Guida specifiche per i soggetti appartenenti a gruppi a rischio per la Celiachia.



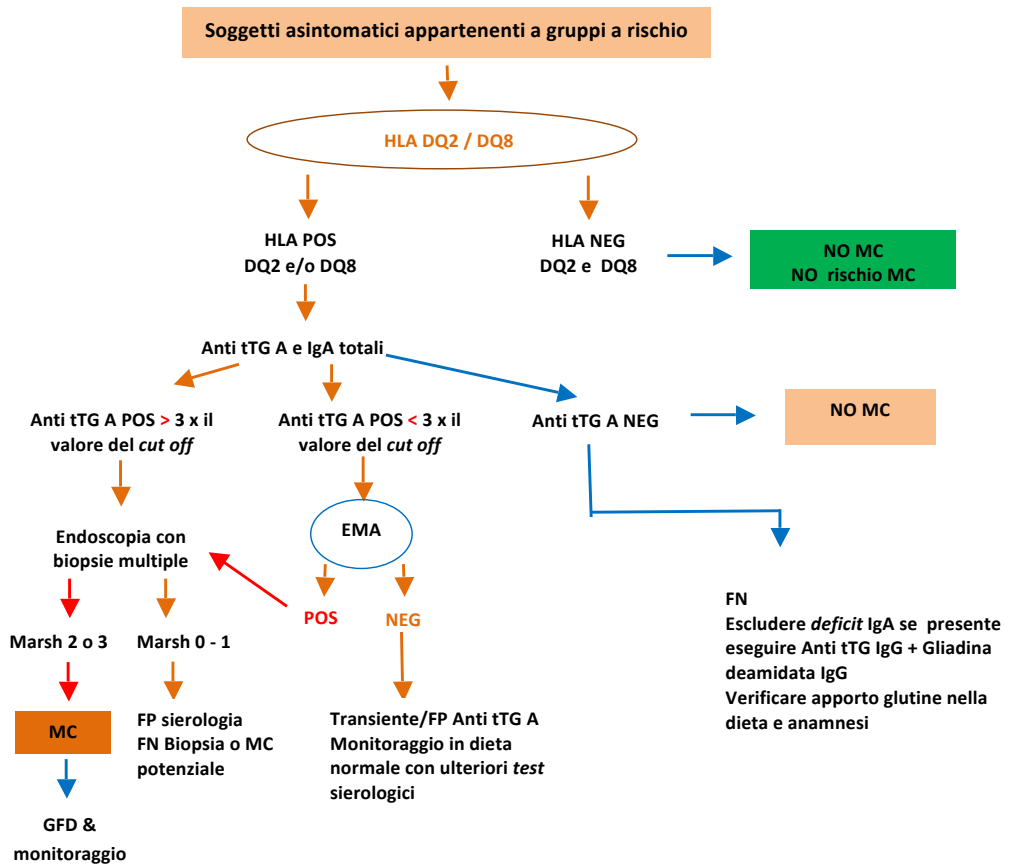


Legenda:

Anti tTG A = Anticorpi anti-Trasnglutaminasi IgA;  
 Anti tTG G = Anticorpi anti-Trasnglutaminasi IgG;  
 GI = Gastroenterologo;  
 EMA = Anticorpi anti-Endomisio IgA;  
 MC = Malattia Celiaca;  
 GFD (Gluten Free Diet) = Dieta priva di Glutine;  
 FN = Falso Negativo;  
 FP = Falso Positivo  
 Linee Guida ESPHAN e NASPGHAN 2012



Per i soggetti appartenenti a gruppi a rischio, cioè parenti di pazienti affetti da malattia celiaca, soggetti affetti da altre malattie autoimmuni (tiroidite, diabete autoimmuni tipo I, etc.), l'algoritmo diagnostico è il seguente:



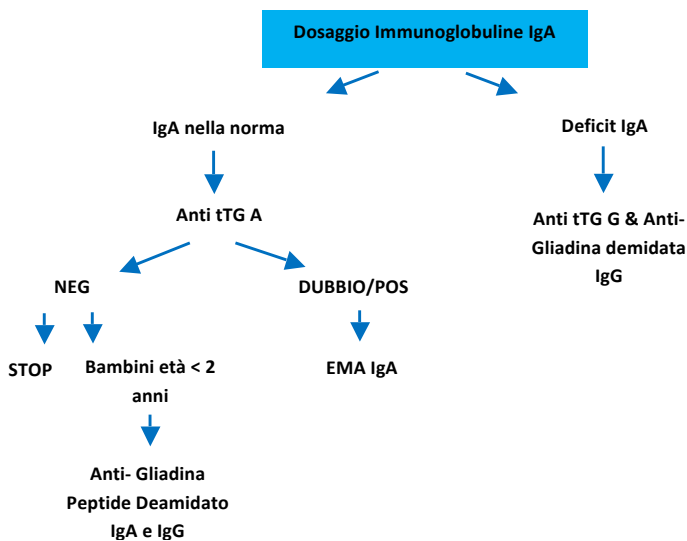
Legenda:

Anti tTG A = Anticorpi anti-Trasnglutaminasi IgA;  
 Anti tTG G= Anticorpi anti-Trasnglutaminasi IgG;  
 EMA = Anticorpi anti Endomisio IgA;  
 MC = Malattia Celiaca;  
 GFD (Gluten Free Diet) = Dieta priva di Glutine;  
 FN = Falso Negativo;  
 FP = Falso Positivo  
 Linee Guida ESPHAN e NASPGHAN 2012

Sulla scia delle Linee Guida, anche le Regioni hanno introdotto degli algoritmi diagnostici previsti nel Tariffario Regionale, definiti come *Reflex*, che consentono di eseguire *screening* ed eventuali approfondimenti, con l'obiettivo di fornire referti di laboratorio completi, con indicazioni di esiti di esami utili ai fini diagnostici.

Recentemente, con Delibera X/2313 del 01/08/2014 la Regione Lombardia ha definito indicazioni in ambito Sanitario, compresi interventi relativi alla Medicina di Laboratorio, basati su algoritmi/esami *Reflex* in diversi ambiti della Diagnostica di Laboratorio, inclusa la Celiachia.

Di seguito viene riportato l'algoritmo diagnostico proposto, associato alla prestazione del tariffario 90.53.G "Anticorpi anti-Transglutaminasi (IgA o IgG) Riflessa", da richiedere in caso di sospetto clinico di Malattia celiaca:



Legenda:

Anti tTG A = Anticorpi anti-Transglutaminasi IgA;  
 Anti tTG G = Anticorpi anti-Transglutaminasi IgG;  
 EMA IgA = Anticorpi anti- Endomisio IgA

Sicuramente, nella storia della diagnosi della Celiachia l'introduzione di *test* anticorpali (in associazione ai *test* di predisposizione genetica HLA DQ2-DQ8) ha consentito di evidenziare un numero più elevato di soggetti affetti da Celiachia e di portare alla luce, o meglio "a galla", la porzione di "iceberg" sconosciuta di questa patologia, comprese le sintomatologie di tipo extra-intestinale, quindi le forme cosiddette "non tipiche", che sono diventate ormai segnali importanti per la ricerca anticorpale di *screening*.

Lo studio continuo delle sintomatologie e reazioni biochimiche nei soggetti celiaci ha portato ad approfondire i meccanismi relativi alle alterazioni della permeabilità intestinale, che determinano l'inizio di questa patologia e anche di altre forme di sensibilità agli alimenti ingeriti.

## GLUTEN SENSITIVITY

Per capire cos'è la *Gluten Sensitivity* è utile comparare questa forma di sensibilità al glutine con la Celiachia:

| Cos'è la Celiachia?  | Cos'è la Gluten sensitività (NCGS = Non-Celiac Gluten Sensitivity)?   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Malattia autoimmune geneticamente determinata che causa un danneggiamento della mucosa intestinale causata dall'ingestione del glutine.</li><li>• La Celiachia è presente nel 1% della popolazione generale e può interessare soggetti in qualsiasi età.</li><li>• I sintomi interessano possono essere tipicamente gastrointestinale o extra-gastrointestinali e multisistemici incluso anemia, osteoporesi, carenze nutrizionali. I sintomi variano da persona a persona ed alcuni soggetti non hanno nessuna sintomatologia. Il tempo che intercorre tra l'esposizione e del glutine e l'inizio dei sintomi può essere tipicamente di settimane oppure mesi o anni.</li><li>• Un semplice esame di screening su prelievo di sangue, la ricerca degli anticorpi anti transglutaminasi (tTG) rappresenta il primo step per la diagnosi. L'esame esofagogastroduodenoscopia con biopsia dell'intestino tenue è necessario per confermare la diagnosi.</li><li>• I soggetti celiaci non diagnosticati o non trattati con dieta priva di Glutine può portare ad ulteriori complicazioni come osteoporosi, infertilità, altre condizioni autoimmuni come la tiroidite e tumore.</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Risposta immune non-specifica che è stata riconosciuta come meno severa della malattia celiaca. Non è caratterizzata da enteropatia, aumento degli anticorpi anti Transglutaminasi, Endomisio, o anti Gliadina Deamidata, e aumento della permeabilità intestinale che sono caratteristiche tipiche della Celiachia. Causa un leggero danno intestinale che recede a seguito di dieta priva di Glutine. Non è geneticamente determinata.</li><li>• È stata studiata nell'infanzia, ma è stato valutato che in realtà affligge circa il 6% della popolazione, si pensa che interessi principalmente gli adulti.</li><li>• Ci sono alcuni sintomi che si sovrappongono a quelli della Celiachia come dolore addominale, fatica, malessere, ma prevalgono spesso i sintomi non intestinali. Il tempo che intercorre tra l'esposizione al Glutine e la comparsa dei sintomi è di ore o giorni.</li><li>• Non ci sono test di laboratorio o istologici che attualmente possono diagnosticare la NCGS, la diagnosi viene eseguita per esclusione. La celiachia e l'allergia al Glutine devono essere escluse mediante test specifici prima di procedere all'eliminazione del glutine dalla dieta, seguita reintroduzione del glutine monitorato.</li><li>• La NCGS non diagnosticata e non trattata non causa ulteriori complicazioni ma necessita di ulteriori investigazioni.</li></ul> |

Unico  
trattamento  
DIETA  
PRIVA DI  
GLUTINE

Sapone A. *et al.* 2011; Ludvigsson K. *et al.* 2012; Sapone A. *et al.* 2012; Fasano A. *et al.*, 2015

Già dal confronto fra le caratteristiche della Celiachia e della NCGS emerge che la sensibilità al Glutine è una forma avversa nei confronti dell'alimento glutine ancora in fase di studio. Proprio perché al momento non esistono *test* diagnostici specifici, la diagnosi non è ancora ben chiara.

Gli unici *test* diagnostici che si possono eseguire sono quelli specifici per escludere la Celiachia, l'allergia al Glutine e l'intolleranza al Glutine. In caso di esclusione di queste forme avverse al glutine, occorre procedere con l'esclusione dell'alimento per verificare se c'è un miglioramento della sintomatologia, reintrodurre poi il glutine e monitorare se i sintomi ricompaiono.



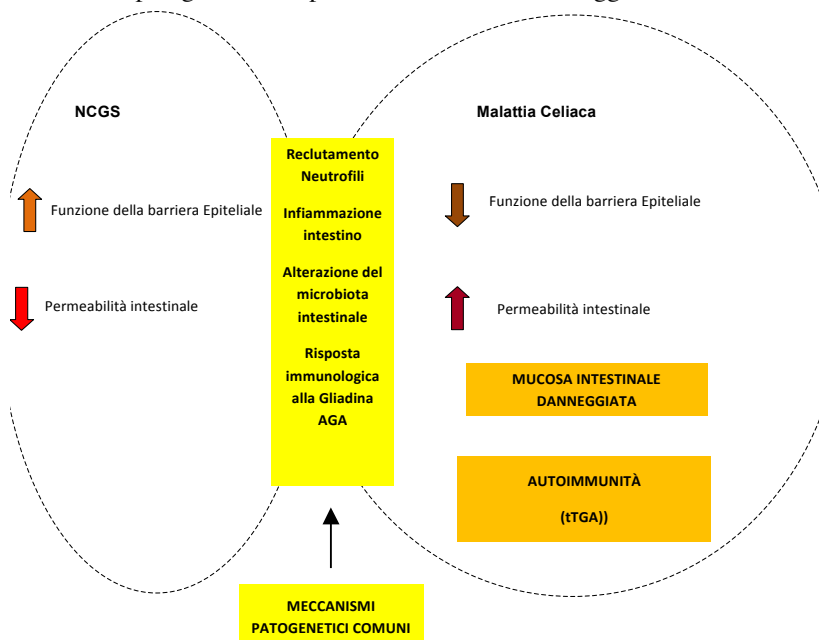
In realtà, nel 50% dei soggetti NCGS sono stati rilevati anticorpi anti-Gliadina Nativa, il primo marcatore utilizzato nella diagnostica per la Celiachia e abbandonato per utilizzare l'antigene Peptide Deamidato.

Nei soggetti con NCGS è stato osservato un 56% di positività per anticorpi anti-Gliadina Nativa IgG con titoli elevati nell'86% dei soggetti (Volta, 2013).

Gli anticorpi anti-Gliadina Nativa IgA hanno invece una bassa prevalenza nei soggetti NCGS (circa 8%) con titoli molto più bassi che nei soggetti celiaci. Tuttavia, gli anticorpi anti-Gliadina Nativa non rappresentano un *test* specifico per la NCGS, poiché presenti in altre condizioni, come malattie autoimmuni epatiche, sindrome da colon irritabile o IBS, malattie del connettivo miste e anche in donatori sani.

Pertanto la positività (in particolare ad alto titolo) per questi anticorpi può dare un contributo alla diagnosi. Nei soggetti con positività per anticorpi anti-Gliadina Nativa è possibile monitorare il titolo anticorpale durante la dieta priva di Glutine. Dopo 6 mesi di GFD (*Gluten Free Diet*), gli anticorpi anti-Gliadina Nativa IgG scompaiono, mentre in circa la metà dei soggetti celiaci rimangono positivi. Quindi è ipotizzabile che la memoria immunologica nei celiaci rimanga attiva, mentre nei soggetti NCGS no.

Le problematiche riscontrate nei soggetti NCGS hanno determinato ulteriori studi in merito al meccanismo patogenetico, soprattutto in confronto ai soggetti celiaci.



Legenda:

NCGS = Non *Gluten Sensitivity*; tTGA = anticorpi anti transglutaminasi

Particolare attenzione è stata dedicata allo studio sulle variazioni della barriera della mucosa intestinale ed è stata individuata una molecola, la Zonulina, che ha un ruolo importante sui meccanismi di alterazione della mucosa stessa.

La Zonulina è una proteina con funzione regolatrice della permeabilità epiteliale, modulando le giunzioni serrate tra le cellule contigue (TJ = *Tight Junction*). Lo studio di questa proteina deriva dalla scoperta della tossina colerica della *zonula occludens* (ZOT), una enterotossina prodotta dal *Vibrio cholerae* che agisce sulle funzioni della delle TJ.

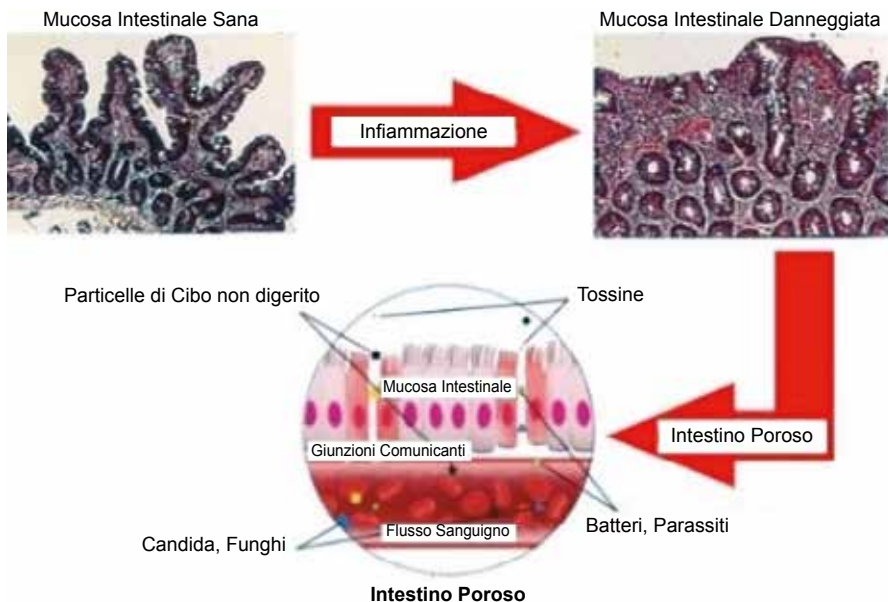
In particolare la ZOT, legandosi ad uno specifico recettore di superficie con conseguente attivazione di una serie di reazioni biochimiche intracellulari a cascata, porta alla polimerizzazione dei microfilamenti di actina, per azione della Proteina-kinasi C (PKC) che funziona da segnale intracellulare. La conseguenza di queste reazioni è l'apertura reversibile delle giunzioni serrate intercellulari che aumentano la permeabilità intestinale (Fasano A., 2011).

Utilizzando un modello per lo studio della permeabilità intestinale *ex vivo*, è stato dimostrato che esiste una proteina omologa alla ZOT con funzione di modulazione delle giunzioni serrate, denominata Zonulina.

L'integrità della barriera intestinale previene il passaggio di fattori che potenzialmente potrebbero essere dannosi, se presenti nel lume. La Zonulina è rilevabile soprattutto nel digiuno e ileo distale, non è presente nel colon e diminuisce lungo l'asse dei villi intestinali-cripte. La distribuzione della concentrazione della Zonulina coincide con la diversa risposta della barriera epiteliale intestinale e riorganizzazione dei filamenti di actina che avviene lungo l'asse del villo intestinale.

Nei soggetti celiaci la tipica caratteristica di aumento della permeabilità intestinale è accompagnata da un apertura delle TJ.

L'utilizzo di anticorpi specifici contro la Zonulina ha permesso di rilevare un'iperespressione di Zonulina nei celiaci in fase acuta.



## QUALI SONO LE CAUSE DELL'IPERESPRESSIONE DELLA ZONULINA?

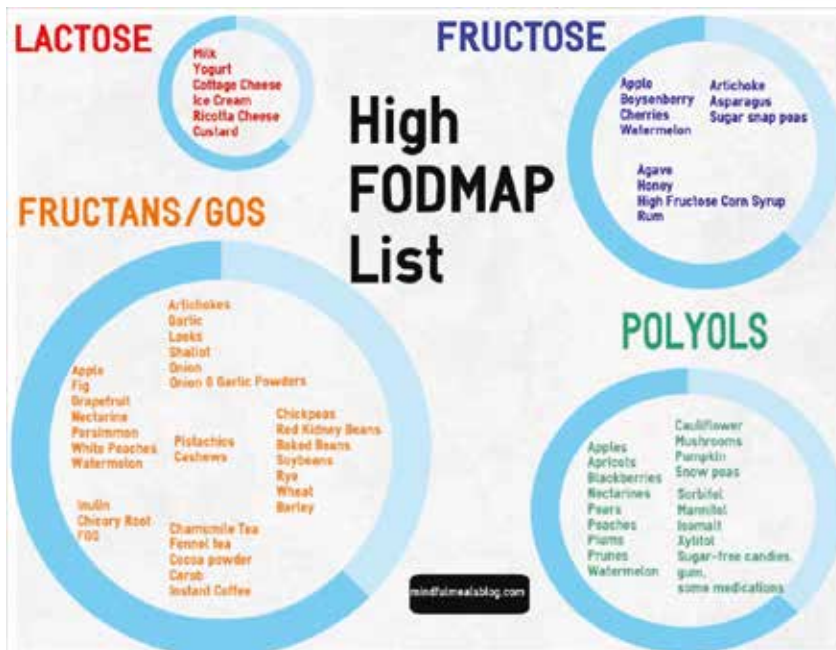
L'esposizione dell'intestino tenue a batteri e glutine fornisce due delle maggiori cause che portano all'aumento del rilascio di Zonulina. Le infezioni enteriche sono implicate nella patogenesi di diverse condizioni patologiche severe, che comprendono l'allergia, l'autoimmunità, alcune malattie infiammatorie.

Nel caso invece della NCGS, la funzione della barriera intestinale epiteliale è aumentata e abbiamo una ridotta permeabilità intestinale, esattamente l'opposto di ciò che accade per i soggetti celiaci.

Le causa ipotizzata (ed attualmente ancora in fase di studio) è un'alterazione dell'ambiente microbiota intestinale. Variazioni dell'equilibrio tra il numero di batteri lattobacilli Gram-negativi e Gram-positivi porterebbero alla risposta avversa nei confronti degli antigeni introdotti con la dieta, come il glutine (Volta U., 2013).

Recenti studi hanno dimostrato come in realtà il glutine e i suoi derivati non sono le uniche molecole a determinare NCGS, ma anche altre proteine contenute nel grano possono avere un ruolo rilevante nell'indurre reazioni avverse. In particolare, gli inibitori della tripsina-amilasi potrebbero indurre infiammazione e reazioni immuni (risposte innate immuni di monociti, macrofagi e cellule dendritiche) in diversi disordini immuni intestinali e non, incluse la NCGS e malattia celiaca. Inoltre, nei soggetti definiti NCGS sono presenti reazioni di ipersensibilità nei confronti di diversi alimenti oltre al glutine ed in particolare per gli alimenti ricchi di oligo-, di-, mono-saccaridi fermentabili e polioli (FODMAPs).

Gli alimenti che contengono maggiore concentrazione di FODMAPs sono: grano e cereali (riso, orzo e frumento), latte, legumi, miele, frutti (mango, pera, ciliegia, anguria), verdure (cicoria, finocchio, porro, barbabietola). Una dieta povera di FODMAPs migliora in modo significativo i sintomi gastrointestinali nei soggetti NCGS.



Inoltre molti sintomi gastrointestinali, compresa la sindrome da colon irritabile (IBS) presenti nei soggetti NCGS, potrebbero essere causati da additivi alimentari, come glutammati, benzoati, solfiti e nitrati, indicando che i composti chimici presenti negli alimenti aggiungono forti stimoli al “sistema nervoso” dell’intestino.

In definitiva, l’inquadramento dei soggetti NCGS risulta complesso ed include non solo la semplice ipersensibilità al glutine, ma diverse reazioni di forme avverse nei confronti di componenti alimentari differenti.

## CONCLUSIONI

In questo breve viaggio all’interno del mondo delle reazioni avverse al glutine abbiamo visto l’importanza del grano come nutrimento, la sua struttura, la definizione della molecola glutine e dei suoi composti.

Nonostante gli alimenti contenenti glutine abbiamo un’importanza fondamentale per il nostro organismo, per alcuni soggetti diventano invece “tossici”... **Perché?**

Sulla strada di questo studio abbiamo visto come si è sviluppata la diagnostica di laboratorio, per “immergerci” nel fondo nascosto e sconosciuto dell’“iceberg” della celiachia e mettere in risalto tutto ciò che è possibile fare per individuare precocemente questa malattia. **Ma tutto ciò non basta...**

In questi ultimi anni abbiamo seguito soggetti con sintomatologie ascrivibili alla celiachia, ma che non è celiachia!

**Lo studio continua ancora.** Dobbiamo fare sforzi maggiori per individuare soggetti non celiaci che presentano comunque ipersensibilità al glutine.



Proprio dall’osservazione di questi soggetti (definiti “sensibili al glutine ma non celiaci” o NCGS, messi a confronto con soggetti celiaci) abbiamo potuto studiare meglio il comportamento e l’importanza della barriera epiteliale intestinale.

La permeabilità della barriera è influenzata dall’ ingestione di glutine che l’organismo di alcuni soggetti non tollera, non solo manifestando la celiachia, ma anche altre forme avverse di ipersensibilità, con differente comportamento nella permeabilità della barriera intestinale stessa.

Ma allora cosa succede all’ epitelio della barriera intestinale nei soggetti NCGS?

Mentre è chiaro il meccanismo patogenetico per i soggetti celiaci, per i soggetti NCGS, ancora in fase di studio, si ipotizza una variazione dell’ambiente microbiota della flora intestinale a seguito della reazione di ipersensibilità nei confronti di alcuni alimenti ingeriti.

Inoltre i soggetti definiti NCGS mostrano reazioni avverse anche ad altri componenti presenti negli alimenti (FODMAPs), tra cui gli additivi chimici.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Brown J.S. *et al.*, Gastrointestinal pathology in celiac disease: a case series of 150 consecutive newly diagnosed patients, *Am. J. Clin. Path.* 2012, *138*, 42-49.
- 2) Byass P., Kahn K., Ivarsson A., The global burden of childhood celiac disease: a neglected component of diarrhoeal mortality ?, *PLoS ONE* 2011, *6* (7), e22774.
- 3) Corazza G., Villanacci V., Celiac disease: some considerations on the histological classification, *J. Clin. Path.* 2005, *58*, 573-574.



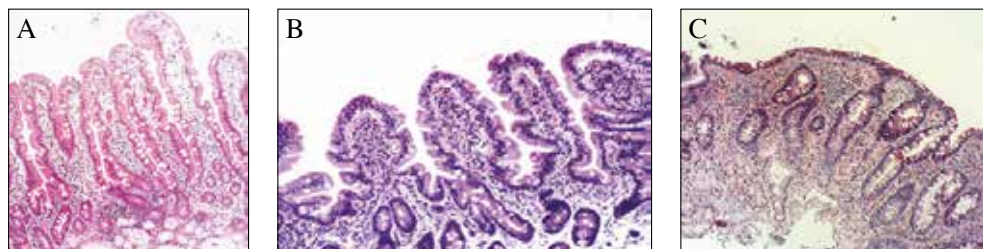
- 4) Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken EO., Schuppan D., Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease, *Nat. Med.* 1997, 3, 797-801.
- 5) Fasano A., Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, Autoimmunity, and cancer; *Physiol. Rev.* 2011, 91, 151-175.
- 6) Fasano A., Sapone A., Zavallos V., Schuppan D., Nonceliac gluten sensitivity, *Gastroenterology* 2015, 148, 1195-1204.
- 7) Loponen J., Prolamin degradation in sourdoughs. University of Helsinki. Department of Food Technology. 2006.
- 8) Ludvigsson K., United European Gastroenterology Week (UEGW) 2012: Amsterdam, 21-24 ottobre 2012.
- 9) Macdonald W, Dobbins W, Rubin C, Studies of the familial nature of celiac sprue using biopsy of the small intestine, in *N Engl J Med*, vol. 272, n° 9, 1965, pp. 448–56.
- 10) Marsh M.N., Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine: a molecular and immunological approach to gluten-sensitivity, *Gastroenterology* 1992, 102, 330-354.
- 11) Marks J. Schuster S, Watson A., Small bowel changes in dermatitis Herpetiformis, *Lancet* 1966, 2,1280-1282.
- 12) Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H., The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1999, 1, 1185–94.
- 13) Paultley J.W., Observations on the aethiology of idiopathic steatorrhea, jejuneal and lymph-node biopsies, *Brit. Med. J.* 1954, 2, 1318.
- 14) Sapone A. *et al.*, Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity, *BMC Medicine* 2011, 9, 23.
- 15) Sapone A. *et al.*, Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification, *BMC Medicine* 2012, 10, 13.
- 16) Villanacci V. *et al.*, Celiac disease: the histology report, *Dig. Liver Dis.* 2011, 438, 385-395.
- 17) Volta U. Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awariness; *Cellular & Molecolar Immunology* 2013, 10, 383-392.



## LA CELIACHIA

La celiachia è un'enteropatia che si può manifestare sia in età pediatrica che adulta in persone geneticamente predisposte in seguito all'introduzione nella dieta di alimenti contenenti proteine formanti glutine ed è una condizione clinica che persiste per tutto l'arco della vita (Fasano e Catassi, 2012). Il glutine è un complesso proteico alcool-solubile che si forma in seguito all'idratazione ed impastamento di alcuni sfarinati, quali, ad esempio, quelli derivanti dal frumento sia tenero che duro. La causa scatenante di questo disordine alimentare è rappresentata da un gruppo di proteine di riserva presenti in alcuni cereali, tra i quali appunto il frumento, il *Kamut*<sup>®</sup>, la segale, il farro, l'orzo e relativi ibridi come il triticale. Le gliadine del frumento e altre proteine alcool-solubili dei predetti cereali rappresentano il fattore responsabile dello sviluppo di questa malattia.

In passato, l'intolleranza al glutine era considerata una condizione rara che interessava per lo più individui di origine europea con un esordio generalmente intorno al primo anno di vita. La diagnosi era interamente basata sulla presenza di sintomi gastro-intestinali confermati da biopsia dell'intestino tenue. La biopsia evidenzia, nei casi più lievi di celiachia, villi meno pronunciati rispetto a quelli tipici della normale mucosa intestinale e villi atrofizzati nei casi più gravi (Fig. 1).



*Figura 1 - Aтроfia dei villi.*

*A) Mucosa normale; B) Aтроfia moderata; C) Aтроfia totale (Ravelli et al., 2005)*

Oggi, la disponibilità di strumenti sierologici altamente sensibili e specifici ha reso possibile la valutazione della reale incidenza della malattia celiaca, mostrando una frequenza importante di forme cliniche atipiche, silenti e potenziali. In Europa la prevalenza di questa malattia è pari all'1% circa con delle variazioni tra i diversi Stati (2.0% in Finlandia, 1.2% in Italia, 0.9% nell'Irlanda del Nord e 0.3% in Germania). Negli Stati Uniti interessa lo 0.5-1% della popolazione. Questo tipo di disordine non è frequente solo nei paesi sviluppati, ma anche in paesi in via di sviluppo; un'alta prevalenza si è riscontrata nelle popolazioni nord-africane, con punte del 5-6% nelle popolazioni del Sahara occidentale (Catassi *et al.*, 1999) e nel continente asiatico (Catassi e Fasano, 2008).

Questa tendenza potrebbe essere spiegata dalla globalizzazione del mercato dei prodotti alimentari, insieme allo sviluppo economico di alcune nazioni la cui alimentazione tradizionale era basata su cereali come riso e mais e che oggi stanno sempre più includendo nella loro dieta alimenti a base frumento (Kearney *et al.*, 2010).

Attualmente, anche se sono in corso alcuni studi per trovare delle alternative, l'unico trattamento per i soggetti celiaci è l'osservanza di una dieta alimentare priva di glutine, la quale deve essere rigorosa e continuativa. La sintomatologia clinica, l'alterazione dei test funzionali di assorbimento e l'atrofia della mucosa migliorano in seguito all'eliminazione dalla dieta dei prodotti contenenti glutine.

Da qui deriva la necessità che il soggetto celiaco venga opportunamente educato affinché possa identificare non solo tutti i prodotti contenenti glutine, ma anche eventuali alimenti che ne possono risultare contaminati. In particolare, vanno evitati tutti i cereali potenzialmente dannosi citati precedentemente, mentre vengono considerati innocui cereali quali riso, avena, mais, miglio e pseudo cereali, quali grano saraceno, *quinoa* e amaranto (Fig. 2).

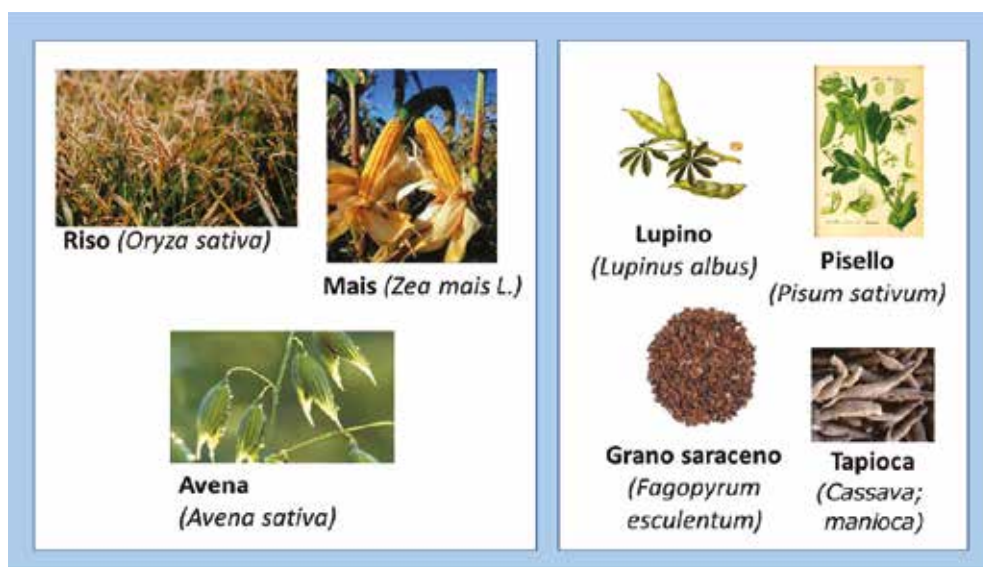


Figura 2 - Esempi di alcuni cereali, pseudocereali, tuberi e leguminose utilizzati nei prodotti senza glutine.

Per quanto riguarda l'etichettatura degli alimenti senza glutine, in aggiunta alle disposizioni generali sull'etichettatura (Regolamento CE 1169/2011), si applicano le seguenti disposizioni:

- Il termine "*senza glutine*" identifica alimenti con un contenuto di glutine che non supera 20 mg/kg (ppm). Tale termine deve apparire nell'etichetta in prossimità del nome del prodotto.
- La dicitura "*con contenuto di glutine molto basso*" è consentita solo laddove il contenuto di glutine dell'alimento venduto al consumatore finale (consistente di uno o più ingredienti ricavati da frumento, segale, orzo, avena o da loro varietà incrociate) non sia superiore a 100 ppm.

- I prodotti “*naturalmente senza glutine*”, ossia quelli non contenenti glutine e non trasformati (come frutta, verdura, carne, pesce, latte, uova tal quali) non possono utilizzare il termine “senza glutine” poiché, per loro natura, non necessitano di dichiarare l’assenza di glutine.

Per facilitare l’identificazione dei prodotti senza glutine, e quindi rimuovere gli ostacoli quotidiani che il consumatore celiaco incontra, a livello nazionale sono presenti diversi loghi che consentono una rapida identificazione dei prodotti privi di glutine; due di questi sono il marchio del “Ministero della Salute” e il marchio “Spiga Barrata”, di proprietà dell’Associazione Italiana Celiachia, che rappresentano per il consumatore celiaco una garanzia di sicurezza (Fig. 3).



Figura 3 - Marchio del Ministero della Salute (sinistra) e dell’Associazione Italiana Celiachia (destra).

## L’INSOSTITUIBILE RUOLO DEL GLUTINE

Il glutine è un materiale proteico che può essere isolato dalla farina o dalla semola quando l’amido e gli altri componenti minori sono eliminati dall’impasto tramite lavaggio con acqua. Il glutine contiene il 75-86% di proteine sul secco, la restante parte è costituita da carboidrati e lipidi, fortemente legati alla matrice glutino-proteica. Nei cereali, la frazione proteica di riserva (80-85%) è rappresentata da prolamine (30-40%) e da gluteline (40-50%).

Le prolamine sono definite come le frazioni proteiche che possono essere estratte mediante una soluzione di etanolo al 70%. Le prolamine del frumento sono denominate gliadine, quelle della segale secaline, dell’orzo ordeine e dell’avena avenine. Le gluteline sono costituite dalle proteine solubili in soluzioni acide e basiche e nel frumento sono denominate glutenine. Le gliadine sono responsabili delle proprietà viscoso e di estensibilità dell’impasto, mentre le glutenine delle caratteristiche di forza e di elasticità (Fig. 4).





Figura 4 - Le proprietà viscoelastiche del glutine.

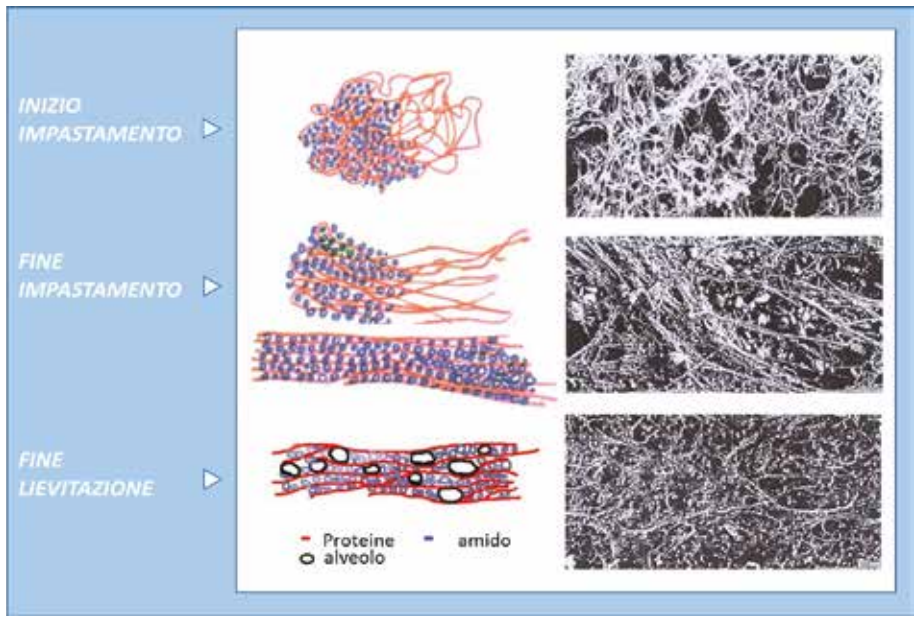


Figura 5 - Sviluppo del reticolo glutinico nel corso del processo di panificazione.



Durante la fase di impastamento e in presenza di un'adeguata quantità di acqua, le gliadine e le glutenine interagiscono tra loro formando una maglia proteica tridimensionale, il glutine, nella quale restano intrappolati i granuli di amido. Nel corso della lievitazione dei prodotti da forno, le proprietà del glutine permettono all'impasto di distendersi sotto la pressione dei gas di fermentazione e nel contempo di trattenerli, promuovendo lo sviluppo dell'impasto e la formazione dell'alveolatura (Fig. 5).

Durante la cottura, si assiste all'irrigidimento della struttura glutinica a causa della denaturazione proteica indotta dal calore e al consolidamento della forma e del volume raggiunto dal pane e dai diversi prodotti da forno. Parallelamente, anche nel caso della pasta, le caratteristiche della materia prima – semola – e il processo produttivo giocano un ruolo essenziale nel definire la qualità della pasta cotta; in particolare, la formazione di un reticolo glutinico ben sviluppato è condizione essenziale per ottenere un prodotto che, dopo cottura, risulti caratterizzato da una struttura compatta ed elastica (un buon nerbo), una limitata collosità e un rilascio modesto di sedimenti nell'acqua di cottura. Anche nella produzione della pasta, è infatti essenziale che durante l'impastamento si formi un reticolo tridimensionale in grado di trattenere i granuli d'amido che, nel corso della cottura, assorbono acqua e si rigonfiano. Più rapido si manifesterà l'irrigidimento della maglia glutinica, minore risulterà il rigonfiamento dei granuli d'amido e di conseguenza minore sarà la collosità della pasta cotta.

Da quanto precedentemente riportato, si comprende quanto siano importanti e uniche le funzionalità conferite dal glutine agli impasti tradizionali e quindi l'interesse nell'individuare, per la produzione di prodotti privi di glutine, sia ingredienti alternativi in grado di simulare il comportamento del glutine che processi tecnologici idonei per le nuove formulazioni.

#### COME IMITARE LA FUNZIONALITÀ DEL GLUTINE NEL PANE E NEI PRODOTTI DA FORNO

La reologia di un impasto privo di glutine evidenzia la mancanza di quelle caratteristiche di viscoelasticità tipiche di un prodotto tradizionale (Fig. 6).



Figura 6 - Caratteristiche reologiche di impasti con e senza glutine.



È per questo motivo che nelle formulazioni dei prodotti da forno *gluten-free* vengono impiegati alcuni ingredienti/additivi con lo scopo di imitare le proprietà viscoelastiche del glutine e quindi migliorare le caratteristiche sensoriali del prodotto finito.

Infatti, accanto alle principali materie prime utilizzate nella produzione di un pane senza glutine – quali, ad esempio, farine e amidi di mais o di riso – vengono impiegati degli idrocolloidi, molecole in grado di legare acqua e modificare grandemente la reologia degli impasti.

Con il termine di idrocolloide vengono indicati numerosi polimeri idrofilici di origine naturale (animale, vegetale, microbica) o di sintesi, naturalmente presenti negli alimenti o ad essi addizionati in piccole quantità in virtù delle loro peculiari proprietà fisiche ed, in particolare, per la loro capacità di influenzare la *texture* della matrice alimentare.

Gli idrocolloidi di origine vegetale vengono estratti da alghe marine come l'agar-agar e i carragenani, dalla buccia di mele o di agrumi come le pectine, dalla crusca di avena come i betaglucani, da essudati di piante come la gomma arabica e da semi come la gomma di *guar*, la gomma di carrube e lo *Psyllium*\*. Altri idrocolloidi di origine vegetale sono l'amido e i suoi numerosi derivati. Gli idrocolloidi di sintesi comprendono l'idrossi-propil-metil-cellulosa (HPMC), la carbossi-metil-cellulosa (CMC) e la metil-cellulosa (MC). Tutti gli idrocolloidi hanno una struttura peculiare formata da lunghe catene di zuccheri con una struttura lineare o ramificata (con ramificazioni di diversa lunghezza) e con l'eventuale presenza di gruppi sostituenti. Vengono impiegati nei prodotti senza glutine, e, in particolare, nei prodotti da forno, in virtù delle loro capacità di legare l'acqua, di modificare la viscosità del sistema e di formare *gel*, quindi con la chiara finalità di esercitare una funzione strutturante dell'impasto. Gli impasti senza glutine sono infatti molto meno coesivi rispetto agli impasti tradizionali, molto più appiccicosi, meno elastici e difficili da manipolare.



\* Lo **psillio** (*Plantago afra*) è una pianta officinale appartenente alla famiglia delle *Plantaginaceae*, diffusa nel bacino del Mediterraneo.

Gli idrocolloidi, miscelati con gli altri ingredienti in basse concentrazioni (0.5-2%), danno origine a strutture tridimensionali formate dall'associazione o dall'interazione (*cross-linking*) di catene polimeriche di diversa natura capaci di trattenere una grande quantità di acqua, sia mediante i numerosi legami idrogeno con i gruppi idrofilici delle catene polisaccaridiche che per l'elevata capacità di inglobamento nelle zone "meno legate" all'interno della struttura tridimensionale del biopolimero (Fig. 7).

Nella Figura 8 è evidente l'effetto dell'aggiunta di queste macromolecole su un impasto costituito da sfarinati privi di glutine che, se composto unicamente da farine/amidi di mais e di riso, si presenta fluido e privo di coesione.

È inoltre chiaro il ruolo degli idrocolloidi nell'influire positivamente sullo sviluppo in volume dei prodotti finiti, anche se i pani privi di glutine generalmente non raggiungono gli sviluppi ottimali del pane di frumento. Ad esempio, un effetto positivo sul volume specifico del pane è stato riscontrato utilizzando 2.5% di *Psyllium* e 0.5% di fibra di barbabietola (percentuali espresse sugli sfarinati, Fig. 9; Cappa *et al.*, 2013).

Inoltre, operando con impasti più liquidi (74-85% di acqua sugli sfarinati), rispetto al 57-58% di acqua solitamente impiegata negli impasti tradizionali (A500 e B500), si è osservato un miglioramento dello sviluppo in volume del pane e dell'alveolatura.

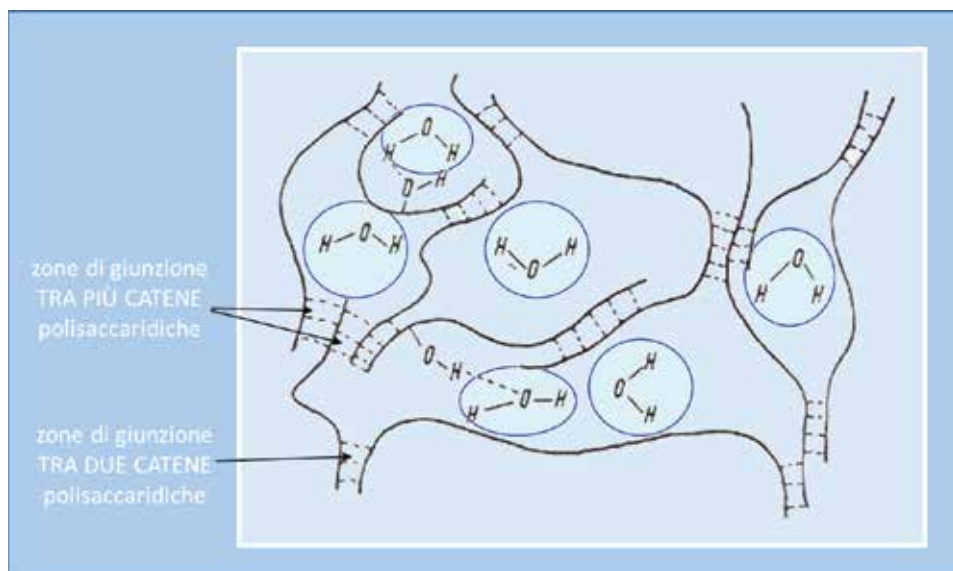


Figura 7 - Capacità degli idrocolloidi di legare l'acqua.

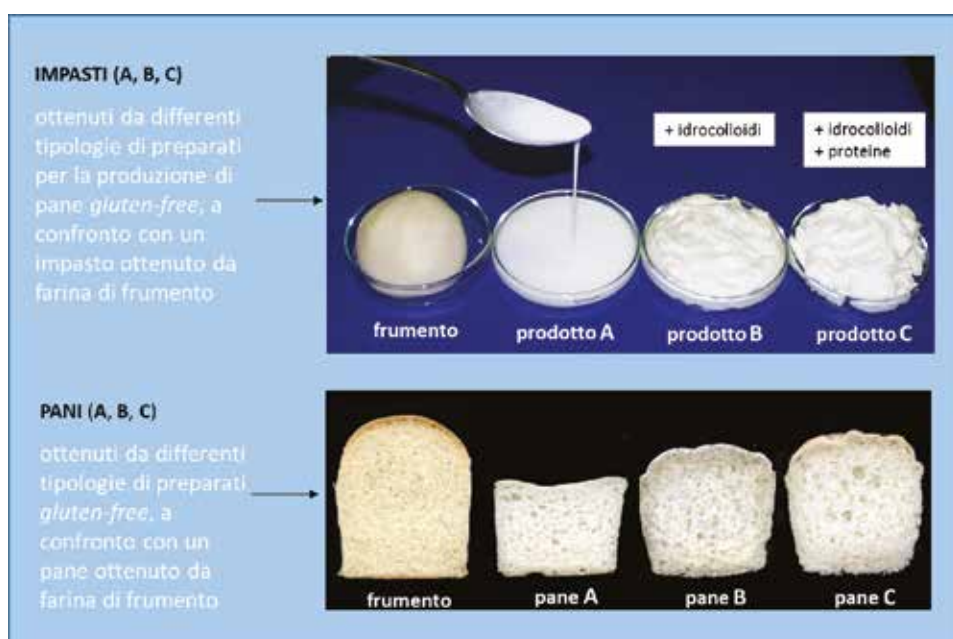


Figura 8 - Effetto dell'aggiunta di idrocolloidi e di proteine sulla reologia dell'impasto e sullo sviluppo in volume del pane.



Figura 9 - Effetto dell'aggiunta di fibra di barbabietola, Psyllium e quantità di acqua sullo sviluppo in volume del pane.

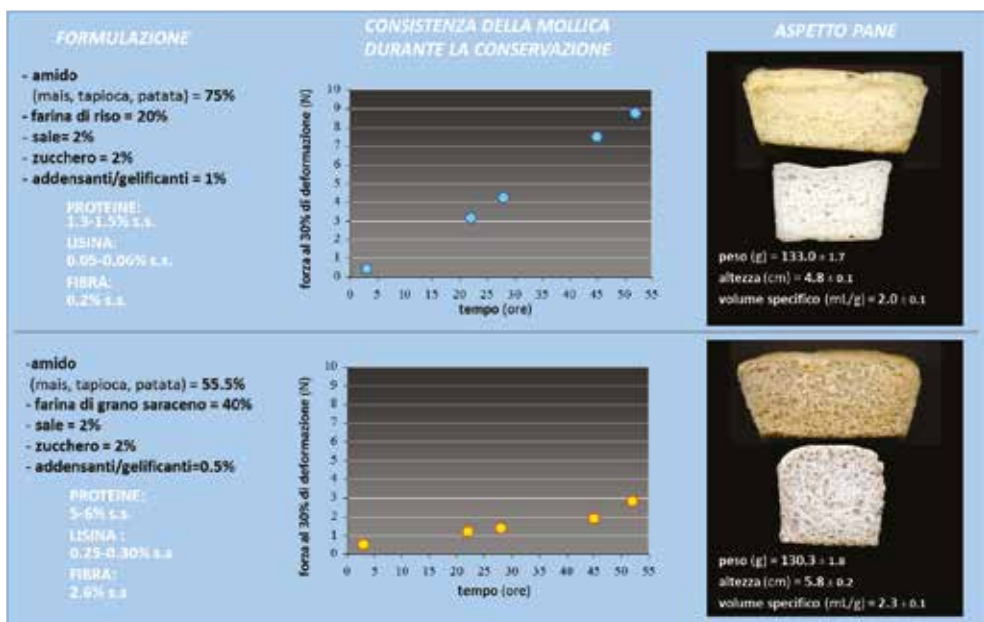


Figura 10 - Effetto dell'aggiunta di farina di grano saraceno sul rafforzamento e sul valore nutrizionale del pane gluten-free.

Si deve quindi all'assenza del glutine il minore sviluppo in volume del pane *gluten-free* a causa della scarsa capacità dell'impasto a formare una maglia tridimensionale con caratteristiche viscoelastiche ottimali e, di conseguenza, con limitata capacità di trattenere i gas di lievitazione. Una breve *shelf-life*, unitamente a una percezione sabbiosa durante il consumo, una eccessiva friabilità della mollica, una sensazione di secchezza in bocca, una scarsa colorazione della crosta e un gusto non pienamente soddisfacente sono alcune delle problematiche che necessitano ulteriori approfondimenti per questa tipologia di prodotti.

Il raffermamento è senz'altro uno dei principali difetti del pane *gluten-free*, difetto imputabile alla presenza nella formulazione di un grande quantitativo di amido che inevitabilmente nel tempo va incontro ad un processo di retrogradazione. Per contrastare questo fenomeno e allungare la *shelf-life* dei prodotti da forno *gluten-free*, vengono applicate strategie diverse, quali l'impiego di alfa-amilasi (Gujral *et al.*, 2003), di emulsionanti (Sciarini *et al.*, 2012; Purhagen *et al.*, 2012) e l'uso di farine ricche di proteine e di fibra, quali ad esempio la farina di grano saraceno (Mariotti *et al.*, 2013) (Fig. 10) o di altri pseudocereali o la fibra di barbabietola e *Psyllium* (Cappa *et al.*, 2013), la cui aggiunta, oltre a rallentare il raffermamento determina una interessante integrazione nutrizionale con proteine di elevata qualità e con fibra alimentare.

Un'ulteriore possibilità per ottenere un prodotto sensorialmente più accettabile e caratterizzato da una maggiore *shelf-life* è quella di fare uso di una lievitazione con madre acida, una delle più antiche tecniche di panificazione utilizzate nei prodotti tradizionali del Mediterraneo e nelle panificazioni con farina di segale (Houben *et al.*, 2012; Moroni *et al.*, 2009; Cappa, 2011). È stato infatti dimostrato che la produzione di acido lattico mediante fermentazione con madre acida determina un incremento di viscosità dell'impasto, genera una mollica più omogenea e dà origine ad una *texture* meno friabile, oltre a creare un profilo aromatico più marcato. Inoltre la produzione di acidi organici, quali l'acido lattico o l'acido fenil-lattico, è risultata efficace nel rallentare l'ammuffimento del pane durante la conservazione (Houben *et al.*, 2012). Effetti positivi del tutto analoghi sono stati evidenziati anche operando con impasti acidificati chimicamente, mediante l'aggiunta di acido lattico.

## COME IMITARE LA FUNZIONALITÀ DEL GLUTINE NELLE PASTE *GLUTEN-FREE*

Mentre le proteine del glutine rappresentano l'elemento strutturante delle paste tradizionali, nelle paste senza glutine è l'amido retrogradato che assolve principalmente questo compito. L'amido è un polisaccaride complesso insolubile in acqua, utilizzato come riserva nelle cellule vegetali. È costituito da amilosio, polimero lineare del glucosio caratterizzato da legami  $\alpha(1-4)$  e da amilopectina, polimero ramificato del glucosio caratterizzato sia da legami  $\alpha(1-4)$  che  $\alpha(1-6)$  in corrispondenza delle ramificazioni, come evidenziato nella Figura 11.

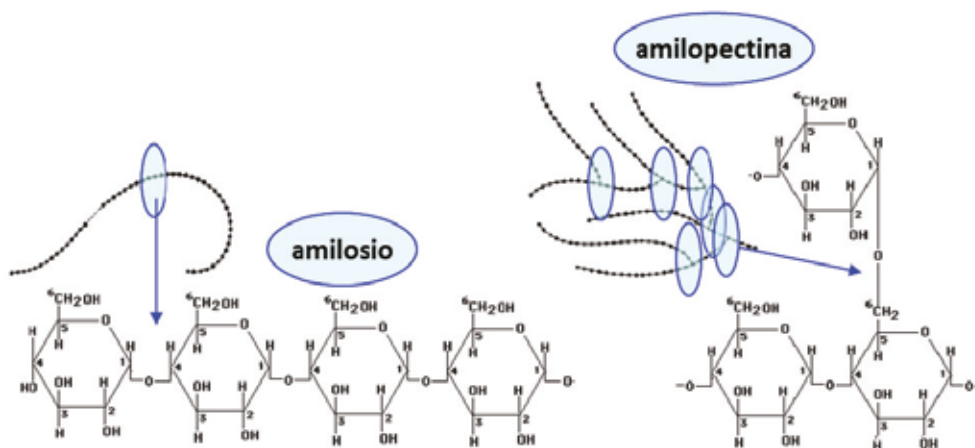


Figura 11 - Struttura di amilosio e amilopectina.

Le ramificazioni dell'amilopectina impediscono la formazione della struttura ad elica tipica dell'amilosio, e favoriscono la formazione di una struttura ad albero. La disposizione dell'amilosio e dell'amilopectina all'interno del granulo d'amido presenta zone semicristalline che rendono insolubili a freddo questi polimeri e resistenti alla digestione da parte degli enzimi amilolitici. L'amido si trova nelle cariossidi sotto forma di granuli, strutture caratterizzate da una elevata cristallinità, le cui forme e dimensioni variano in funzione della specie botanica considerata.

Il fenomeno più importante che coinvolge l'amido è la gelatinizzazione, processo che determina la perdita dell'organizzazione strutturale nativa del granulo. Tale processo è reso possibile dal riscaldamento (temperatura di inizio gelatinizzazione di circa 55-60°C) dello sfarinato preventivamente disperso in acqua. Durante la gelatinizzazione si assiste dapprima ad una idratazione superficiale dei granuli d'amido, al loro rigonfiamento, alla perdita della struttura cristallina nativa e ad un incremento di viscosità del mezzo, con formazione di una pasta molto viscosa. L'amilosio e l'amilopectina assorbono acqua, l'amilosio si solubilizza parzialmente e fuoriesce dai granuli d'amido parzialmente rotti. Durante la successiva fase di raffreddamento si assiste alla ricristallizzazione dell'amilosio e, successivamente, a quella dell'amilopectina. Questo fenomeno - denominato retrogradazione - porta alla creazione di una nuova struttura cristallina, diversa dalla struttura cristallina originaria (Fig. 12).

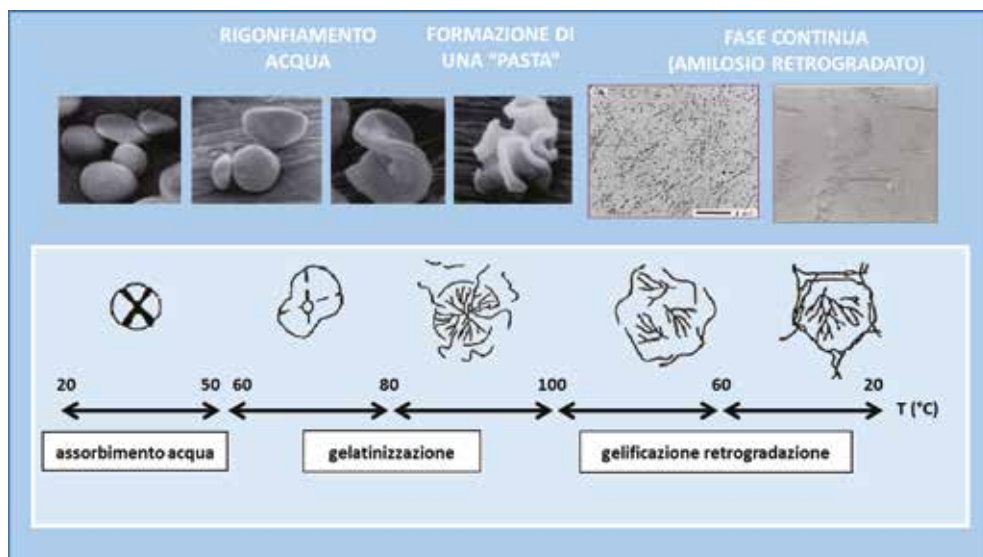


Figura 12 - Modifiche dell'amido durante la gelatinizzazione e successiva retrogradazione.

Se il sistema viene nuovamente riscaldato e raffreddato, l'amido retrogradato può essere ulteriormente disorganizzato (nuova fase di gelatinizzazione-retrogradazione), analogamente a quanto avviene nei processi tradizionali di preparazione dei *noodles* di riso.

La gelatinizzazione-retrogradazione dell'amido è dunque il fenomeno fondamentale alla base della produzione della pasta *gluten-free*. Infatti, durante il processo di pastificazione di matrici senza glutine è necessario indurre, per effetto dell'elevato sforzo meccanico, del calore e del successivo raffreddamento, la formazione di amido retrogradato che possa conferire rigidità alla pasta cotta, limitarne la collosità e ridurre le perdite di materiale solido nell'acqua di cottura (Mariotti *et al.*, 2011; Lucisano *et al.*, 2012; Marti & Pagani, 2013). Una delle procedure tecnologiche adottate è riportata nella Figura 13.



In questa tecnologia, dopo una prima fase di miscelazione degli ingredienti, l'impasto viene sottoposto a temperature superiori a 100°C e trasformato in frammenti di piccola dimensione (*pellet*) che, dopo raffreddamento, vengono alimentati in una pressa, formati e successivamente essiccati a bassa temperatura.

Una via alternativa per produrre pasta *gluten-free* è quella di utilizzare come materie prime del processo di pastificazione farine o amidi già termotrattati (parzialmente o totalmente gelatinizzati). In questo caso le successive fasi di impastamento, formatura e essiccamento possono avvenire a temperature di circa 50-60°C (Fig. 14).

Altri processi più recenti integrano i due approcci precedentemente discussi, in quanto prevedono di operare sia con formulazioni contenenti farine o amidi termotrattati che di utilizzare un processo di pastificazione condotto ad alte temperature e in regimi di elevati sforzi di taglio. La corretta gestione dei due trattamenti termici (temperatura, percentuale di acqua aggiunta nell'impasto, sforzo meccanico applicato durante il processo di estrusione) permette di modulare le caratteristiche dei prodotti e, di conseguenza, il comportamento in cottura e la consistenza della pasta cotta.

Ingredienti fondamentali delle paste *gluten-free* sono amidi o farine di diversa origine, quali, ad esempio, farine di riso e di mais caratterizzate da un elevato contenuto di amido, prestando particolare attenzione al rapporto amilosio/amilopectina. Altri ingredienti che vengono utilizzati nelle paste *gluten-free*, anche se in percentuali nettamente inferiori, sono farine di pseudocereali quali grano saraceno, *quinoa* e amaranto, altri cereali privi di glutine quali sorgo o ancora farine o isolati di legumi, quali pisello, cece e lupino, addizionati prevalentemente per incrementare il contenuto proteico delle paste e per migliorare la reticolazione della matrice durante il processo produttivo.

Inoltre, è ammesso l'uso di emulsionanti come i mono e digliceridi degli acidi grassi che facilitano alcune operazioni del processo quali, ad esempio, la fase di estrusione e limitano la solubilizzazione dell'amido nell'acqua di cottura, rendendo la pasta meno collosa. Nella tabella 1 sono riportati alcuni valori di incremen-

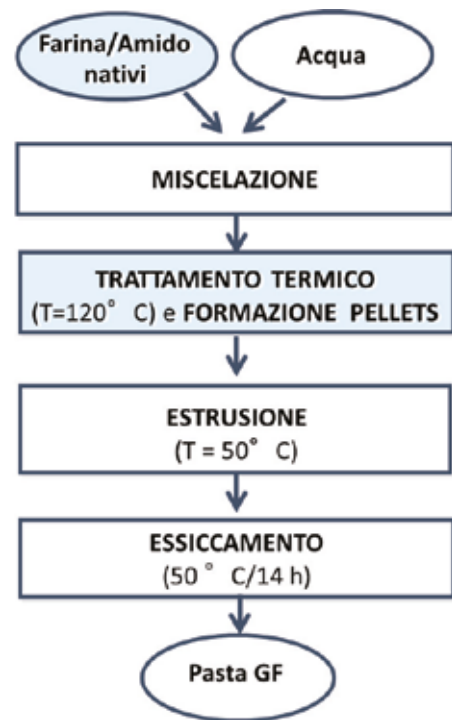


Figura 13 - Processo di produzione di pasta gluten-free con materie prime native.



Figura 14 - Processo di produzione di pasta gluten-free con materie prime termotrattate.

to di peso e perdita di solidi (residuo) nell'acqua di cottura di paste senza glutine di riso, di mais e miste, a confronto con un campione di semola di grano duro. Come si può osservare, la pasta di semola è in grado di assorbire acqua incrementando di peso senza perdere la sua struttura (residui nell'acqua di cottura molto contenuti, 2.7 g/100g); viceversa, per la pasta senza glutine si assiste spesso a sfaldamenti della matrice (residui nell'acqua di cottura compresi tra 5-12 g/100g) o ad incrementi di peso limitati (pasta mista B e pasta di riso A). Unicamente il campione di riso B, ottenuto adottando la tecnologia tradizionale di produzione dei *noodles*, presenta limitate perdite di solidi, un elevato incremento di peso e una bassa collosità (dato non riportato; Lucisano *et al.*, 2012).

**Tabella 1. Incremento di peso e residuo nell'acqua di cottura di paste senza glutine in confronto con una pasta di semola.**

| CAMPIONE        | Incremento peso in cottura (%)* | Residuo nell'acqua di cottura (g/100g)* |
|-----------------|---------------------------------|---|
| Pasta di riso A | 100                             | 12.36                                   |
| Pasta di riso B | 163                             | 3.21                                    |
| Pasta di mais_A | 117                             | 5.04                                    |
| Pasta di mais B | 120                             | 6.20                                    |
| Pasta mista_A   | 122                             | 7.47                                    |
| Pasta mista_B   | 103                             | 2.64                                    |
| Pasta di semola | 135                             | 2.66                                    |

\*al tempo ottimale di cottura

Risulta quindi evidente come la produzione di alimenti *gluten-free* rappresenti ancora una sfida tecnologica, in quanto molteplici sono i fattori che condizionano i processi produttivi e molte le variabili da considerare per massimizzare la qualità dei prodotti. Tuttavia, combinando in modo opportuno materie prime diverse e tecnologie appropriate è possibile ottenere prodotti che sempre più soddisfano le attese dei consumatori, come è dimostrato dalle molteplici referenze presenti sul mercato nazionale e internazionale.

#### UNA VALIDA “INTEGRAZIONE” DEI PRODOTTI PRIVI DI GLUTINE: GLI PSEUDO-CEREALI

In aggiunta ai comuni cereali senza glutine, nelle formulazioni *gluten-free* possono essere presenti farine derivanti dalla macinazione dei semi dei cosiddetti “pseudo-cereali”; i semi di queste piante sono infatti privi di glutine, per cui possono essere impiegati nella produzione di alimenti destinati ai consumatori celiaci. È noto che con il termine cereali si definiscono le piante appartenenti alla famiglia delle *Graminaceae*. Vi sono altre piante, come il grano saraceno (*Polygonaceae*), l'amaranto (*Amaranthaceae*) e la *quinoa* (*Chenopodiaceae*), che non possiedono alcuna relazione botanica con i cereali propriamente detti (e che quindi non possono definirsi tali), ma che presentano con essi strette analogie, soprattutto per la destinazione alimentare, e vengono pertanto definiti “pseudo-cereali”.



Il più conosciuto degli pseudo-cereali è senza dubbio il **grano saraceno** (Fig. 15), di cui esistono diverse specie.



Figura 15 - Grano saraceno; con la lettera “b” viene indicato il grano saraceno decorticato.

Tra queste il *Fagopyrum esculentum* Moench (grano saraceno comune) è il più diffusamente coltivato (Mariotti *et al.*, 2007a). Il ciclo vitale molto breve (60-90 giorni) ne consente la coltivazione anche in altitudine e lo rende altamente competitivo nei confronti delle altre colture. I suoi impieghi sono molteplici: le piante sono utilizzate come foraggio o lettiera per il bestiame; l'abbondante produzione di nettare lo rende particolarmente attraente per le api, che producono un miele di colore scuro e dall'aroma forte e caratteristico. I semi (botanicamente *acheni*) vengono impiegati nell'alimentazione umana interi, dopo rimozione dei tegumenti (es. minestre, preparazioni dolciarie) o come sfarinato (in miscela con altri cereali, nella preparazione dei famosi pizzoccheri e di altri alimenti tipici). La farina di grano saraceno è piuttosto scura ed ha un aspetto tipico, poiché una parte dei tegumenti eliminati durante la macinazione viene riaggiunta per rendere il prodotto più caratteristico e nutrizionalmente più interessante.

Dal punto di vista compositivo, l'amido è il componente più importante degli *acheni* di grano saraceno e la sua concentrazione varia in funzione della *cultivar* considerata (nel seme integrale, dal 59 al 70% s.s). Il contenuto in lipidi varia tra l'1.5 ed il 3.7%, ma poiché la maggior parte di essi è contenuta nel germe, la farina ne contiene una quantità poco rilevante. Le proteine sono presenti nell'ordine del 7-21%, in funzione della varietà e dei fattori ambientali di crescita (solitamente, 11-15%) e sono caratterizzate da un elevato valore biologico, essendo ricche di lisina. Molto importante è la presenza di rutina, composto noto per la capacità di contenere la fragilità capillare associata ad alcune malattie di tipo emorragico o all'ipertensione e di diminuire il livello di colesterolo nel sangue. Elevato è anche il contenuto in vitamine (specialmente B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, E).

In Italia viene tradizionalmente miscelato con farina per la produzione dei conosciuti “pizzoccheri” della Valtellina, dove, fino al secolo scorso (metà del '900) veniva ampiamente coltivato.

L'**amaranto** è una pianta erbacea annuale originaria del Centro America (Fig. 16).

In epoca pre-colombiana i semi di amaranto rappresentavano un prodotto così fondamentale per l'alimentazione delle popolazioni locali da diventare parte integrante di rituali pagani e leggende (Mariotti *et al.*, 2007b).

Con il decadimento delle culture locali conseguente alla colonizzazione spagnola,

l'amaranto cadde in disuso o venne addirittura bandito. Nonostante questo, alcune piccole comunità continuarono a coltivarlo, permettendo così il suo perdurare e diffondersi in tutto il mondo. Attualmente, l'amaranto viene coltivato a scopo commerciale in Messico, Sud-America, Stati Uniti, Cina, Polonia ed Austria.

I semi di amaranto sono piccoli (diametro medio: 1.0-1.5 mm; peso di 1000 chicchi: 0.6-1.2 g), di forma lenticolare e di colore variabile dal bianco-crema al marrone. L'embrione, di forma anulare, circonda completamente il perisperma amilaceo.



Figura 16 - Amaranto.

Dal punto di vista nutrizionale, i semi di *A. hypochondriacus* L. (il più coltivato in Messico) contengono il 15-20 % s.s. di proteine ricche di lisina (3.2-6.4 g/100g proteine contro 2.8-3.0 g/100g proteine per il frumento), il 58-66% s.s. di amido, il 6-9% s.s. di fibra grezza ed il 6-8% s.s. di lipidi ad alto grado di insaturazione. Particolarmente elevate sono le concentrazioni di calcio (250 mg/100g) e ferro (15 mg/100g), che risultano, rispettivamente, 10 e 4 volte superiori a quelle del frumento. Le dimensioni ridotte e la particolare morfologia del seme hanno una influenza fondamentale sulla tecnologia di trasformazione dell'amaranto; processi consolidati per altri cereali, quindi, non possono essere trasferiti direttamente a questo materiale senza opportune modifiche.

Gli utilizzi dell'amaranto sono comunque molteplici: viene consumato come seme, dopo cottura o soffiatura; viene macinato ed impiegato come farina; viene soffiato e macinato per ottenere farina pre-gelatinizzata. In Messico, in particolare, si utilizza il seme soffiato e miscelato con miele o melassa per produrre un dolce tradizionale ("Alegria").

La **quinoa** è uno pseudo-cereale originario delle regioni andine dell'America del Sud. Rappresentava un alimento importante nella dieta degli antichi Inca, tanto da essere chiamata *chisiya mama* ("madre grano"), proprio per indicare il suo eccellente valore nutrizionale (Fig. 17).

È una pianta che cresce ad altitudini elevate, è resistente al gelo ed è in grado di svilupparsi anche in regioni con scarse precipitazioni (Mariotti *et al.*, 2007c). I maggiori produttori di *quinoa* sono Bolivia, Perù ed Ecuador, ma se ne trovano coltivazioni anche in Brasile, Cile e Colombia. Il frutto della *quinoa* è un *achene* molto piccolo (diametro: 1.0 - 2.6 mm), di forma cilindrica, conica o ellissoidale e di colore giallognolo, con occasionali variazioni verso il magenta dovute alla presenza di pigmenti (beta-cianine).



Figura 17 - Quinoa.

Per quanto riguarda la composizione, la *quinoa* possiede un elevato tenore in proteine (13-14%), caratterizzate da un buon quadro aminoacidico e da un elevato valore biologico, essendo molto ricche in lisina. Rispetto al frumento, inoltre, la *quinoa* possiede una quota lipidica maggiore (5-10%) ricca di acidi grassi insaturi; un tenore di fibra alimentare leggermente più elevato (13.4%, di cui più dell'80% è insolubile); un contenuto in sali minerali simile (2.8-3.4%) e particolarmente ricco in magnesio, fosforo e ferro; un tenore in amido inferiore (52-69%); un quadro vitaminico interessante, per la presenza di vitamine B (soprattutto tiamina e riboflavina) ed acido folico nonché per gli alti livelli di tocoferoli (vitamina E) e gli interessanti quantitativi di vitamina C.

Tradizionalmente, la *quinoa* viene consumata in svariati modi e forme: la granella è utilizzata per minestre o preparazioni simili al risotto; la farina è usata per fare il *porridge* ed un pane piuttosto grezzo chiamato *krispina*; dalla fermentazione della *quinoa*, inoltre, si ottiene una birra chiamata *chicha*. L'amido di *quinoa*, caratterizzato da un basso rapporto amilosio-amilopectina, una bassa temperatura di gelatinizzazione, un'alta viscosità a caldo ed una buona stabilità al congelamento-scongelo, risulta un interessante addensante per le farciture.



Pane Krispina e Porridge di quinoa.

## BIBLIOGRAFIA

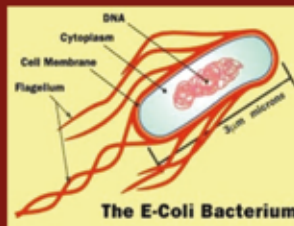
- 1) Cappa, C. (2011). Gluten-free bread: optimization of formulation and process conditions. *Tesi di Dottorato di Ricerca in Innovazione Tecnologica per le Scienze Agro-Alimentari e Ambientali, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Milano, Italia.*
- 2) Cappa, C., Lucisano, M., & Mariotti, M. (2013). Influence of Psyllium, sugar beet fibre and water on gluten-free dough properties and bread quality. *Carbohydrate Polymers*, 98:1657-1666.
- 3) Catassi, C., & Fasano, A. (2008). Celiac disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24:687-691.
- 4) Fasano, A., & Catassi, C. (2012). Celiac Disease. *New England Journal of Medicine*. 367:2419-26.
- 5) Catassi, C., Purhagen, J. K., Sjo, M. E., & Eliasson, A. C. (2012). The anti-staling effect of pre-gelatinized flour and emulsifier in gluten-free bread. *European Food Research and Technology*, 235:265-276. Fasano, A. (2008). *Current Opinion in Gastroenterology*, 24:687-691.
- 6) Catassi, C., Ratsch, I. M., Gandolfi, L., Pratesi, R., Fabiani, E., El Asmar, R., et al. (1999). Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*, 354:647-8.
- 7) Gujral, H. S., Haros, M., & Rosell, C. M. (2003). Starch hydrolyzing enzymes for retarding the staling of rice bread. *Cereal Chemistry*, 80: 750-754.
- 8) Houben, A., Höchstötter, A., & Becker, T. (2012). Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: an overview. *European Food Research and Technology*, 235(2), 195-208.
- 9) Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 365:2793-2807.
- 10) Lucisano, M., Cappa, C., Fongaro, L., & Mariotti, M. (2012). Characterisation of gluten-free pasta through conventional and innovative methods: Evaluation of the cooking behaviour. *Journal of cereal science*, 56(3), 667-675.
- 11) Mariotti, M, Pagani, M.A., Lucisano, M. (2007a). Cosa e quali sono gli pseudocereali? Partiamo dal grano saraceno. *Dolcesalato*, 64, 82.
- 12) Mariotti, M, Pagani, M.A., Lucisano, M. (2007a). Cosa e quali sono gli pseudocereali? Partiamo dal grano saraceno. *Dolcesalato*, 65, 86.
- 13) Mariotti, M, Pagani, M.A., Lucisano, M. (2007a). Cosa e quali sono gli pseudocereali? Partiamo dal grano saraceno. *Dolcesalato*, 66, 82.
- 14) Mariotti, M., Iametti, S., Cappa, C., Rasmussen, P., & Lucisano, M. (2011). Characterisation of gluten-free pasta through conventional and innovative methods: evaluation of the uncooked products. *Journal of cereal science*, 53(3), 319-327.
- 15) Mariotti, M., Pagani, M. A., & Lucisano, M. (2013). The role of buckwheat and HPMC on the breadmaking properties of some commercial gluten-free bread mixtures. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 393-400.
- 16) Marti, A., & Pagani M.A. (2013). What can paly the role of gluten in gluten free pasta. *Trends in Food Science and Technology*, 31 (1): 63-71.
- 17) Moroni, A. V., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2009). Sourdough in gluten-free bread-making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiology*, 6: 676-684.
- 18) Purhagen, J. K., Sjo, M. E., & Eliasson, A. C. (2012). The anti-staling effect of pre-gelatinized flour and emulsifier in gluten-free bread. *European Food Research and Technology*, 235:265-276.
- 19) Sciarini, L. S., Ribotta, P. D., Leon, A. E., & Pérez, G. T. (2012). Incorporation of several additives into gluten free breads: Effect on dough properties and bread quality. *Journal of Food Engineering*, 111: 590-597.

# *PARTE SECONDA*





## "Lactose-free" GERMI + LATTE + LATTASI



The E-Coli Bacterium

- L'ENZIMA LATTASI ( $\beta$ -GALATTOSIDASI)
- IL MODELLO DI STUDIO DELL' *ESCHERICHIA COLI*
- LIEVITI E MUFFE PRODUTTORI DI LATTASI
- COLTURE TRADIZIONALI DI LIEVITI E MUFFE

1

## "Lactose-free" PRODUZIONE DELLA LATTASI



- TECNICHE DI PRODUZIONE DELLA LATTASI IN FERMENTATORI
- CONTROLLI DI PRODUZIONE

2

## "Lactose- and Gluten-free" ANALISI SU ALIMENTI



- ANALISI CHIMICHE ED IMMUNO-ENZIMATICHE
- ANALISI MICROBIOLOGICHE
- SCHEMI DI LAVORO PER LA DETERMINAZIONE DI PARAMETRI MICROBIOLOGICI

3

*In questo capitolo:*

**LATTOSIO E GLUTINE IN LABORATORIO**

## GERMI + LATTE + LATTASI

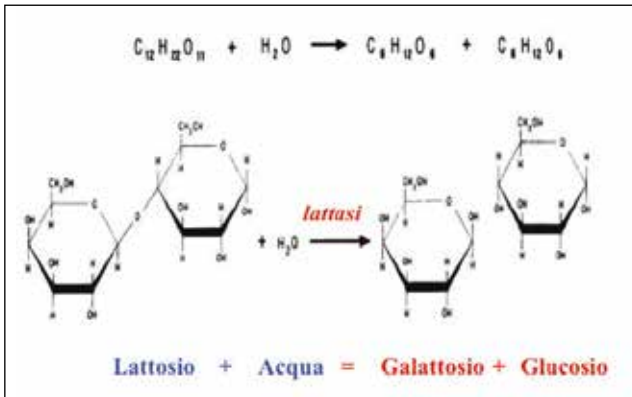
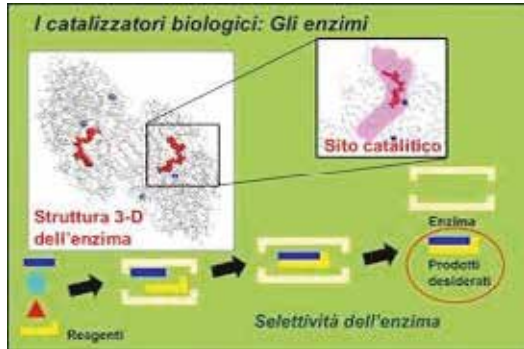
### L' ENZIMA LATTASI (β-GALATTOSIDASI)

La **galattosidasi** é un enzima ossidativo inducibile che partecipa al metabolismo glucidico (sinonimi: lattasi, β-D-Galactoside-galactohydrolase; β-D-Galactopyranosidase; β-Lactosidase).

Occupa un posto importante fra le idrolasi.

Fa parte, insieme alla lattosio-permeasi e alla transacetilasi, del sistema enzimatico responsabile della degradazione del lattosio in glucosio e galattosio, secondo la seguente reazione chimica:

La β-galattosidasi è un enzima intracellulare e la sua presenza non è di per sé sufficiente a conferire la capacità di idrolizzare il lattosio: a questo fine è necessaria anche la presenza della permeasi spe-



Rappresentazione della molecola di β-galattosidasi (o lattasi)

cifica, che trasporta il composto all'interno delle cellule (Carvalho-Silva & Spencer-Martins, 1990).

La sequenza amminoacidica della β-galattosidasi fu scoperta da Fowler *et al.*, 1970.

Il funzionamento ottimale dell'enzima richiede la presenza dello ione potassio (K<sup>+</sup>) e dello ione magnesio (Mg<sup>2+</sup>) ed un pH attorno a 6.8-7.4.

La massima concentrazione di β-galattosidasi è stata segnalata a +37°C, diminuendo rapidamente a temperature superiori a +40°C (Rech *et al.*, 1999).

La lattasi è impiegata in numerosi processi industriali, che prevedono l'idrolisi del lattosio presente nel latte (ad una concentrazione media del 4,7÷4,9%), con lo scopo di ottenere:



1. **prodotti adatti per soggetti intolleranti al lattosio.**
2. per evitare la **crystallizzazione del lattosio nei gelati e nel latte condensato**
3. per la produzione di **galatto-oligosaccaridi biologicamente attivi impiegati quali prebiotici\*** (Swennen e Coll., 2006; Kukkonen e Coll., 2007).

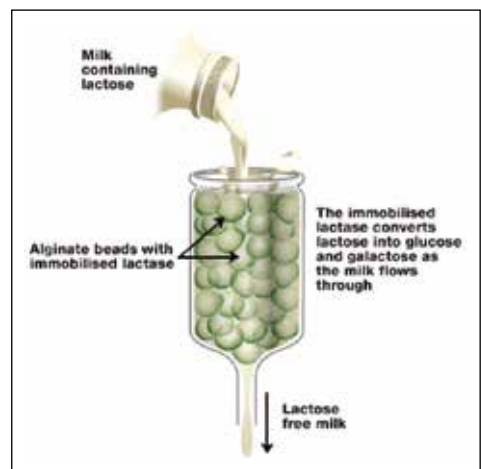


*È noto che essi esercitano una serie di effetti sul metabolismo batterico ed hanno delle implicazioni positive sulla salute (alleviamento della costipazione, miglioramento dell'assorbimento dei minerali, regolazione del metabolismo lipidico, diminuzione del rischio di cancro al colon, trattamento dell'encefalopatia epatica, modulazione del sistema immunitario, influenza sulla glicemia e insulinemia).*

Su larga scala la lattasi è ottenuta prevalentemente da microorganismi, in particolare da ceppi di **lievito** o da **muffe**. Nei lieviti tale enzima è localizzato all'interno delle cellule, a livello periplasmatico (ossia tra la parete e la membrana cellulare), mentre nelle muffe è prodotto a livello extracellulare.

Tale caratteristica suggerisce impieghi diversi e, pertanto, nell'idrolisi del lattosio in siero di latte o in latte acido si utilizzano prevalentemente lattasi di origine fungina, mentre in latte o in siero in condizioni neutre, quelle da lievito.

La lattasi trova impiego nelle applicazioni tecnologiche in forma libera o alternativamente in forma immobilizzata in fibre di acetato o di alginato oppure intrappolata in silice porosa. I principali impieghi della lattasi sono prevalentemente nel settore alimentare e, come enzima digestivo, in preparazioni farmaceutiche.



La conversione del lattosio in galattosio e glucosio incrementa inoltre di circa 5 volte la dolcezza relativa dell'alimento.



Il latte delattosato non è altro che un latte vaccino sottoposto ad idrolisi enzimatica del lattosio; questo processo consente di ridurre le concentrazioni di lattosio fino al 70% della concentrazione iniziale. La produzione di latte delattosato sta acquisendo sempre maggior importanza grazie all'elevato numero di consensi tra i consumatori.

Il processo chimico di idrolisi lattica a scopi industriali avviene mediante l'utilizzo di enzimi specifici, prodotti da alcuni microrganismi coltivabili su larga scala. Fra gli enzimi, i più utilizzati sono:

- Lattasi da LIEVITI – Microrganismo produttore: *Kluyveromyces fragilis (marxianus)*
- Lattasi da MUFFE – Microrganismo produttore: *Aspergillus niger, Aspergillus (Rhizopus) oryzae*.

Per quanto il risultato finale sia lo stesso, il procedimento tecnologico-alimentare da applicare, qualora si utilizzi l'uno o l'altro enzima, deve tener conto almeno di due fattori: pH e temperatura. Le lattasi ottenute da lieviti agiscono infatti a pH neutro (6-7) e a temperatura media, mentre quelle fungine agiscono in un mezzo acido (pH 3-6) e a temperature elevate.

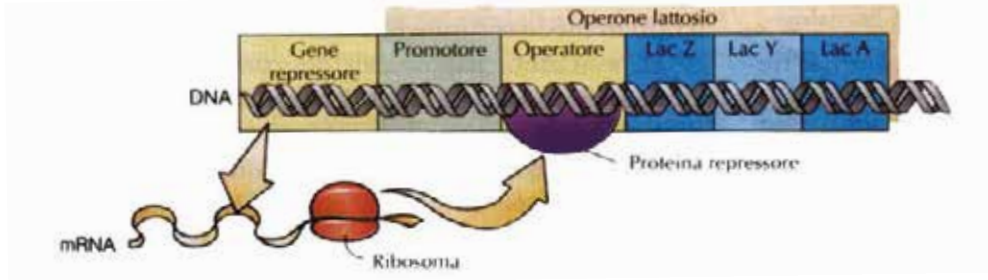
La  $\beta$ -galattosidasi prodotta da lieviti è la più usata industrialmente per il trattamento del latte, della panna e dei latticini, avendo un pH tra 6.5 e 7.0 (Santos e Coll., 1998).

## IL MODELLO DI STUDIO DELL' *ESCHERICHIA COLI*



Alcuni studi hanno evidenziato che esistono ceppi batterici normalmente presenti nel latte (*Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii subsp. lactis* o *L. lactis*) dotati di una lattasi. Si sa poi che alcuni ceppi di batteri che elaborano dei prebiotici ad uso pediatrico nella prevenzione di malattie allergiche alle lattasi (come *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) sono in grado di resistere all'ambiente inospitale dello stomaco e all'attività della bile, rimanendo perciò attivi durante il transito intestinale.

L'esempio più interessante di demolizione del lattosio si trova in *Escherichia coli*, nel cui DNA esiste un "sistema lac", comandato da un "operone-lattosio" ([www.uniba.it](http://www.uniba.it)).



L'operone-lattosio è un complesso di geni strutturali. Si tratta di un sistema inducibile dall'ambiente di crescita del coli, comandato da un OPERATORE, mantenuto inattivo, in condizioni normali, da un REPRESSORE di natura proteica.

Se non c'è lattosio nell'ambiente, il REPRESSORE lega l'operatore e la reazione non avviene.

Ma se il coli si trova in presenza di lattosio, una molecola induttrice (PROMOTORE) inattiva il REPRESSORE e l'operone mette in azione i tre geni strutturali *lac z*, *lac y* e *lac a*, che producono, rispettivamente, forti quantità di  $\beta$ -galattosidasi, galattosio-permeasi e galattoside-transacetilasi.

L'RNA polimerasi, intanto, crea nei ribosomi un mRNA che fornisce informazioni al DNA per codificare i tre enzimi, attraverso i geni *z*, *y*, *a*.

- *Lac z* codifica per l'enzima  $\beta$ -galattosidasi, che ha due funzioni: scindere il disaccaride lattosio in due monosaccaridi più semplici, il glucosio e il galattosio, utilizzati dal microrganismo e guidare la conversione del lattosio in allo-lattosio.
- *Lac y* codifica per la lattosio-permeasi, un enzima che permette al lattosio di attraversare la membrana cellulare del microrganismo.
- *Lac a* codifica per l'enzima transacetilasi, che aggiunge gruppi acetilici al lattosio non appena entrato nella cellula.

## LIEVITI E MUFFE PRODUTTORI DI LATTASI

### *Kluyveromyces fragilis* (*K. marxianus*; *Saccharomyces lactis*)

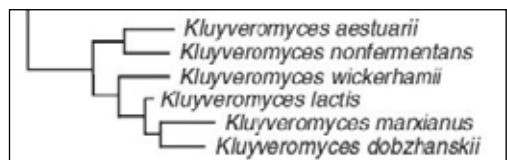


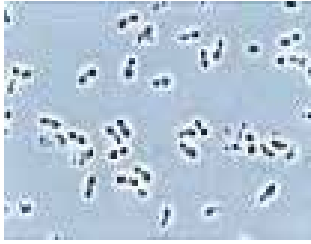
Appartiene alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*, un genere di lieviti chiamati Ascomiceti. Le ultime relazioni sulla tassonomia dei lieviti *Kluyveromyces*, invece di eseguire confronti di un singolo gene, impiegano l'analisi di sequenze multigeniche per chiarire la filogenesi dei diversi ceppi e per costruire alberi filogenetici dei lieviti.

L'approccio sequenza-base ha avuto un profondo impatto sulla comprensione del genere *Kluyveromyces*; usando questo metodo,

si è dimostrato che il genere *Kluyveromyces* contiene solo sei specie, fra cui *K. marxianus* si propone come specie-tipo.

L'habitat naturale di *Kluyveromyces* è vario, ma molti ceppi vengono isolati da lat-





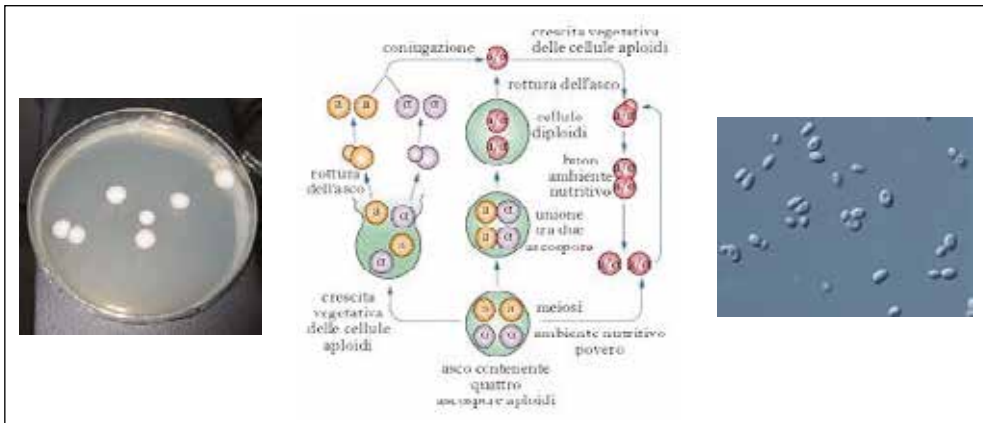
te e derivati del latte. La sua caratteristica principale, molto rara tra i lieviti, è infatti la capacità di crescere in presenza di lattosio, come unica fonte di carbonio, grazie ad una permeasi specifica che trasporta lo zucchero all'interno della cellula e una  $\beta$ -galattosidasi, che lo scinde in glucosio e galattosio.

Il ciclo vitale di *Kluyveromyces* è costituito da una fase aploide e una diploide. La riproduzione asessuata avviene per gemmazione,

mentre quella sessuata inizia con la fusione per coniugazione di due cellule di tipo sessuale opposto ( $a$  e  $\alpha$ ).

A differenza di molti lieviti, tra cui *S. cerevisiae* (con il quale ha molte caratteristiche in comune), nella maggior parte dei ceppi di *Kluyveromyces* la fase diploide è solo transitoria.

Le cellule diploidi, soprattutto quando vi è scarsità di nutrienti nel mezzo di crescita, vanno incontro a meiosi e sporulazione spontanee, generando un asco contenente quattro spore aploidi (da [Enciclopedia Treccani.it](http://Enciclopedia.Treccani.it)).



In laboratorio la specie *Kluyveromyces* mostra al microscopio cellule ovali o sferoidali allargate, a gemmazione multipolare, Gram-variabili, tendenti all'aspetto dei germi Gram-positivi.

Coltivato sui terreni batteriologici specifici per i lieviti, forma colonie che appaiono pastose, granulari, color crema.

Non cresce in anaerobiosi.

### *Aspergillus niger*



Al genere *Aspergillus* appartengono più di 900 specie, ma solo poche sono patogene, tra cui *A. fumigatus* (la più frequente), *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*.

L'habitat prevalente è il terreno.

Al microscopio *A. niger* si presenta con ramificazioni dicotomiche (ife settate), vescicole e prolungamenti (conidi). Le colonie hanno un aspetto polveroso e sono di colore nero.

Questa muffa è nota come causa di malattie nei vegetali (uva, albicocche, cipolle, arachidi) ed è ubiquitaria, poiché cresce anche sui muri umidi delle abitazioni.

Alcuni ceppi elaborano potenti micotossine, tra cui l'ocratossina A. Nell'uomo può provocare una malattia dell'apparato respiratorio, nota come aspergillosi, specie negli orticoltori che inalano le spore. Altra malattia è l'otomicosi, che comporta perdita temporanea dell'udito ed eventuali danni al timpano.



### ***Rhizopus oryzae***

Il *Rhizopus* è un genere di muffe che si trova generalmente nel suolo e in alimenti deteriorati (frutta e verdura, pane).



Produce spore per via sessuale e anche asessuale. Le sporangiospore asessuali si formano dentro una struttura simile a una capocchia di spillo, lo sporangio, e sono geneticamente identiche al loro genitore.

Le zigospore sono prodotte dopo la fusione di due miceli durante la riproduzione sessuata e danno vita a colonie geneticamente diverse dai loro genitori.

Al microscopio *R. oryzae* mostra sporangiofori semplici o ramificati in gruppi di 3 o più elementi, di forma globosa oppure ovale. Gli sporangi sono globosi, spesso con una base piatta, grigio-neri, di aspetto polveroso e con molte spore.

Le colonie su Sabouraud Dextrose Agar crescono a temperatura ambiente (+25 °C) con estrema velocità, hanno un diametro di 5-8 mm, inizialmente sono di colore bruno e successivamente grigio-nero, in seguito a sporulazione.



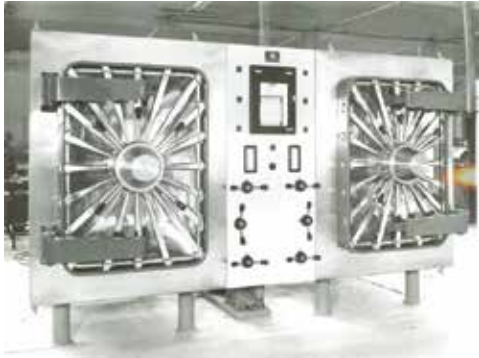
Alcune specie di *Rhizopus* possono colpire l'uomo e gli animali, provocando forme di zigomicosi, con infezioni serie e anche fatali a causa del rapido ritmo di crescita.

### COLTURE TRADIZIONALI DI LIEVITI E MUFFE



(1) Pesata degli ingredienti del terreno, (2) regolazione del pH, (3) sterilizzazione in autoclave, (4) distribuzione finale.





Autoclavi orizzontali di sterilizzazione a vapore



Filtrazione di terreno colturale attraverso filtri sterilizzanti Seitz EKS<sub>1</sub>

## TERRENI PIÙ COMUNEMENTE USATI PER LIEVITI E MUFFE

(nelle foto sono rappresentate, da sinistra a destra, piastre con colonie di lieviti e di muffe)

### *OGYE Agar Base*

Formula del terreno di base (per 1 litro):

Estratto di lievito 5.0

Glucosio 20.0

Agar 13.0

#### **Supplementi antibiotici:**

Oxytetracycline Antimicrobial Supplement: Ossitetraciclina HCl 50 mg

Gentamycin Antimicrobial Supplement: Gentamicina solfato 25 mg



### *PREPARAZIONE DEL TERRENO*

#### **A. *Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar***

Sospendere 19 g di OGYE Agar Base in 500 ml di acqua distillata fredda; portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 115°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C. Ricostituire con le precauzioni dell'asepsi Oxytetracycline Antimicrobial Supplement con 5 ml di acqua distillata sterile ed addizionala al terreno di base; concentrazione finale 100 mg/l.

#### **B. *Oxytetracycline-Gentamicin Glucose Yeast Extract Agar***

Sospendere 19 g di OGYE Agar Base in 500 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 115°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C. Ricostituire con le precauzioni dell'asepsi Oxytetracycline Antimicrobial Supplement con 5 ml di acqua distillata sterile e Gentamycin Antimicrobial Supplement con 5 ml di acqua distillata sterile ed addizionalarli al terreno di base. Concentrazioni finali degli antibiotici: ossitetraciclina 100 mg/l, gentamicina 50 mg/l. pH finale = 6.6 ± 0.2.



### *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar*

Formula per 1 litro:

|   |        |
|---|--------|
| Estratto di lievito (Yeast Extract) ..... | 5.0 g  |
| Glucosio .....                            | 20.0 g |
| Cloramfenicolo .....                      | 0.1 g  |
| Agar .....                                | 13.0 g |

pH finale =  $6.6 \pm 0.2$

Sterilizzazione in autoclave a 121°C per 15 minuti



### *Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar (DRBC)*

Formula del terreno di base (g/L):

|   |       |
|---|-------|
| Idrolisato enzimatico di tessuti animali e vegetali | 5     |
| Glucosio ( $C_6H_{12}O_6$ )                         | 10    |
| Potassio diidrogenofosfato ( $KH_2PO_4$ )           | 1     |
| Magnesio solfato ( $MgSO_4 \cdot H_2O$ )            | 0,5   |
| Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilina)             | 0,002 |
| Rosa bengala  | 0,025 |
| Agar  | 15    |

#### **PREPARAZIONE DEL TERRENO**

Sospendere 15.5 g in 500 ml di acqua distillata fredda e portare ad ebollizione per sciogliere completamente la polvere. Ricostituire il supplemento contenente cloramfenicolo ed aggiungerlo al terreno. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare ad una temperatura inferiore a 50°C in bagnomaria termoregolato tra 44 a 47°C.

Mescolare e distribuire a 15 ml in piastre di Petri sterili. Conservare il terreno al riparo della luce. pH finale =  $5.6 \pm 0.2$



### *Sabouraud Dextrose Agar*

Formula (g/L):

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| Idrolisato peptico di tessuto animale | 5  |
| Idrolisato pancreatico di caseina     | 5  |
| Glucosio                              | 40 |
| Agar                                  | 15 |

#### **PREPARAZIONE DEL TERRENO**

Sospendere 65 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata fredda.

Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Non eccedere nei tempi e nelle temperature di ebollizione e di sterilizzazione. pH finale =  $5.6 \pm 0.2$



## PRODUZIONE DELLA LATTASI

Eating right. Feeling great.  
Lactose Free Dairy



Al di fuori della coltivazione su terreni solidi largamente praticata in passato (ad esempio, in bottiglie di Roux), esiste la possibilità di far sviluppare un microrganismo, sotto forma di biomassa, in terreno liquido, entro sistemi chiamati “fermentatori”. Si tratta di apparecchi formati essenzialmente da un recipiente termostato (*tank*), dotato internamente di pale per l’agitazione del liquido di coltura (*impeller*) e di un diffusore per distribuire l’aria o altri gas (*sparger*).

Una strumentazione accessoria consente di controllare in via manuale o automatica l’andamento del processo attraverso sensori di controllo in grado di **monitorare** e quindi di provocare la **regolazione** in continuo di tutti i parametri richiesti: temperatura, pH, concentrazione di ossigeno (o di aria), pressione (che si origina in seguito ad attività fermentative).

In aggiunta sono previsti nel fermentatore dei passaggi ermetici sterilizzabili per introdurre soluzioni (brodo di coltura, antischiuma) o sospensioni (microrganismo da far crescere), come pure per il prelievo di campioni dal brodo di coltura, in modo da verificarne in laboratorio la sterilità o la concentrazione dei microrganismi sviluppati, accanto ad eventuali prodotti della fermentazione.

La preparazione del fermentatore inizia con il lavaggio dell’impianto (mediante acqua fredda, acqua calda con detersivo antitossico) e opportuni risciacqui fatti con acqua demineralizzata, seguiti da sterilizzazione, che si effettua mediante passaggio di vapore fluente (generalmente prodotto da un’ autoclave esterna) per tempi proporzionali al volume dell’apparecchio e comunque non inferiori a 3-4 ore.



Infine si ha l'immissione del terreno liquido di coltura, introdotto nel fermentatore sotto pressione positiva previo passaggio attraverso filtri sterilizzanti (tipo Seitz EKS<sub>1</sub> o Millipore®) e dell'antischiama, sterilizzato a parte in autoclave e aggiunto in proporzione dell'1% sul terreno.

Dopo un controllo di sterilità dell'intero sistema, allestito mediante prelievo di un campione di terreno da incubare in termostato per 18-24 ore a +37°C, avviene l'inoculazione del microrganismo da moltiplicare (in proporzione del 2 - 6 % sul volume del terreno). L'inoculo, in sospensione acquosa concentrata, deriva generalmente da matrici liofilizzate, accuratamente controllate per purezza e per sterilità del diluente in cui vengono disciolte.

Nel caso di colture che esigono la microaerofilia o l'anaerobiosi, l'agitazione è ridotta al minimo e al posto dell'aria viene immessa, rispettivamente, una miscela di anidride carbonica o di azoto.

Dopo un certo periodo (solitamente dell'ordine di più giorni) si raggiunge la quantità desiderata (in numero, o in peso) di microrganismi in rapporto al volume del fermentatore e al tipo di processo (fase vegetativa), che nella pratica industriale si distinguerà dalla successiva fase di messa in produzione, dove i microrganismi non cresceranno ulteriormente in numero, ma eventualmente, sotto l'influenza di condizioni ambientali diverse, effettueranno le biosintesi desiderate.

La raccolta del prodotto può essere totale (produzione per partita o *batch fermentation*) o parziale, quando si lascia nel fermentatore una quantità di coltura che funzionerà da semina nei confronti di un successivo rabbocco con terreno fresco (fermentazione in continuo, *feed-back fermentation*).

In questo caso la crescita del microrganismo viene mantenuta sempre in fase logaritmica. La fermentazione in terreno liquido (*submerged fermentation*, *SmF*) avviene in *tank* che possono contenere, su scala industriale, anche 1000 o 2500 litri e rappresenta la tecnica ideale per moltiplicare organismi unicellulari, come batteri e lieviti. Applicare questa tecnica a funghi filamentosi darebbe luogo a qualche difficoltà, in quanto le muffe si sviluppano in forma vegetativa, generando ife o filamenti ramificati pluricellulari, che sviluppando un micelio in terreno liquido generano abbondante viscosità, riducendo la solubilità dell'ossigeno, mentre l'agitazione rompe le cellule aumentandone la mortalità.

In natura, infatti, le muffe crescono sul terriccio o altri substrati organici, decomponendo le sostanze vegetali in condizioni naturali di aereazione.

È nata quindi la tecnica di fermentazione in stato solido (*solid state fermentation*, *SSF*), che favorisce lo sviluppo ottimale dei funghi filamentosi, permettendo al micelio di diffondere sulla superficie del substrato solido, sul quale l'aria può fluire.

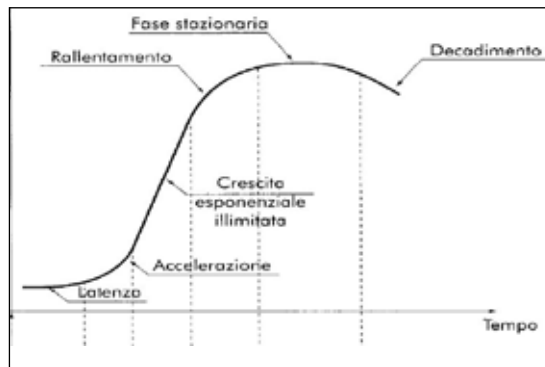
Questo procedimento consiste nel depositare un substrato colturale solido, come riso o germe di grano su palline piatte infettate con il microrganismo da moltiplicare e incubare il sistema a temperatura controllata per alcuni giorni.



### SSF Typical process characteristics (MADEP. SA)

Downstream processing: None or centrifugation for many applications  
Duration: 1 to 5 days  
Aeration: 0.5 to 5 vessel volumes per hour  
Agitation: Intermittent or constant rotation  
Moisture content: 50 to 85%  
Temperature: 5 to 95 C  
Inoculation: 1 to 20% (w/w) of fungi suspension  
Liquid Medium: Basic Mineral Medium  
Solid Matrix: Rice bran, sawdust, sugar beet pulp, etc.

Lo scopo della tecnica SSF è di coltivare il microrganismo (puro o misto) in intimo contatto con il substrato per assorbire la massima quantità di sostanze nutritive, per cui esistono varianti del metodo che prevedono coltivazione su supporti inerti impregnati di terreno liquido. La SSF ha facilitato la produzione di sostanze innovative di alto valore commerciale, come mangimi arricchiti di proteine, etanolo, enzimi ricavati da funghi, tanto da sostituire l'impiego della SmF (Bhargav S. e Coll., 2008).



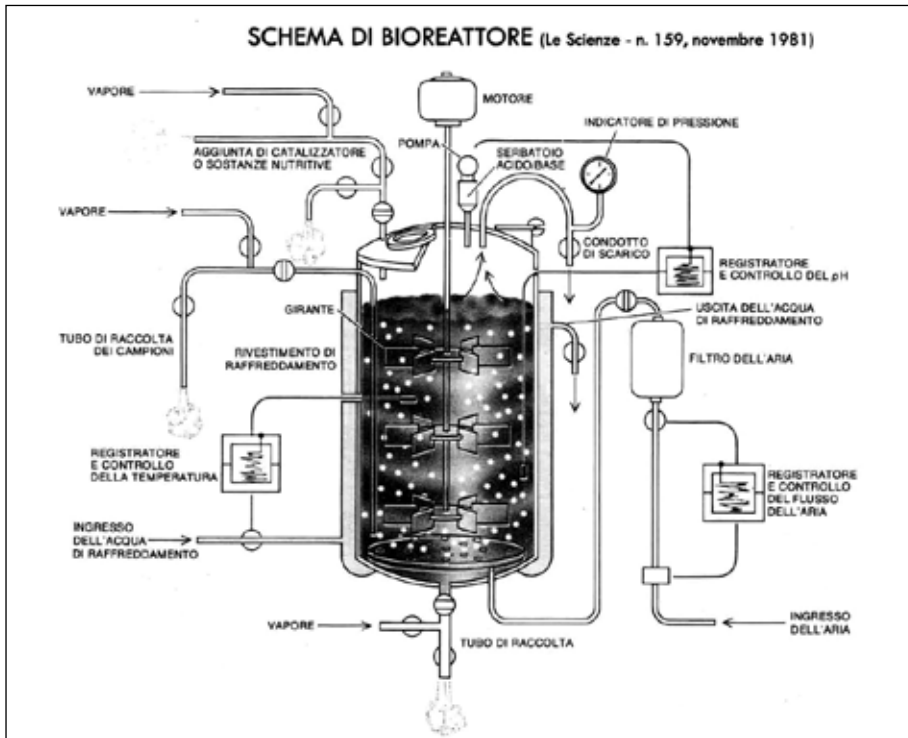
Schema di crescita dei microrganismi in fermentatore (processo in batch)

(da [www.chimica.cannizzaro.it](http://www.chimica.cannizzaro.it))

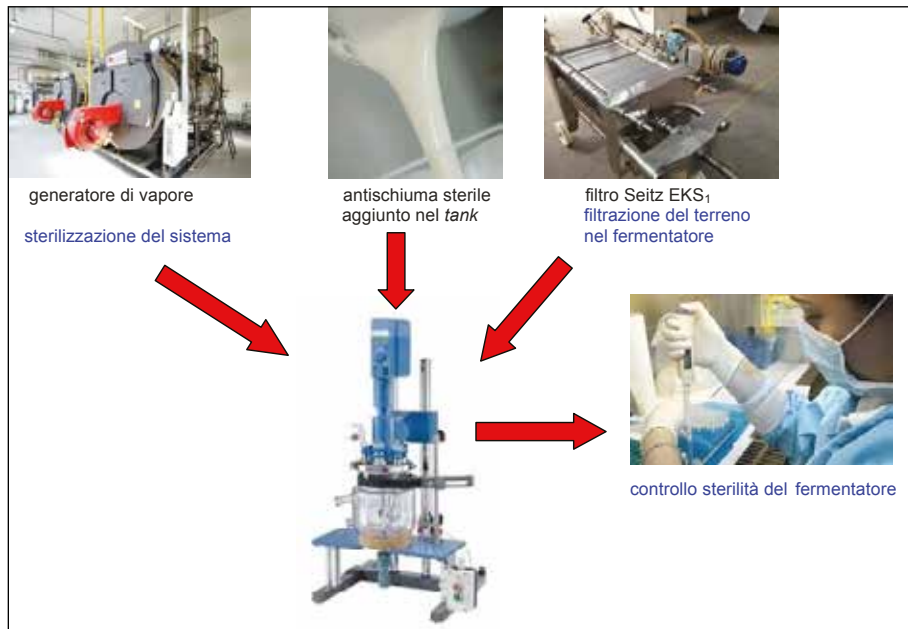
La velocità di moltiplicazione delle cellule microbiche nei fermentatori è rappresentata dall'equazione di MONOD:

$$\mu = \mu_{max} \times \frac{C_s}{K_s + C_s}$$

Dove  $\mu$  significa la variazione del numero di microrganismi,  $C_s$  la concentrazione del terreno in g/l,  $\mu_{max}$  la velocità di accrescimento massima per ora,  $K_s$  la costante di affinità fra microrganismi e terreno (espressa in ppm)



*Schema di fermentatore per produzioni in terreno liquido (submerged fermentation, SmF, da Scienza)*







*Schema di un ciclo (batch) di fermentazione (submerged fermentation, SmF)*

## TECNICHE DI PRODUZIONE DELLA LATTASI IN FERMENTATORI

### *Nota introduttiva*



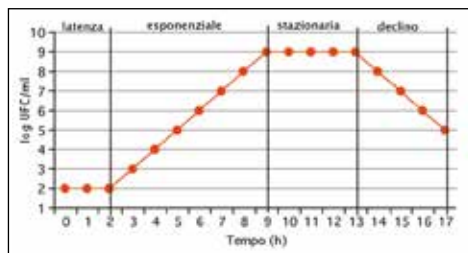
Le esperienze degli Autori di seguito riportate, desunte dalla letteratura, sono state realizzate in impianti-pilota di limitate dimensioni e pertanto le informazioni qui contenute non si possono estendere a produzioni industriali su larga scala.

**Nella foto a fianco:** unità di 4 fermentatori (capacità di ciascuno = 5 lt) a trasmissione magnetica e velocità variabile per colture in sospensione di microrganismi e produzione di biomasse – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna di Brescia, Dipartimento di Batteriologia - Progetto e costruzione OLSA, Milano, 1981.



**Produzione in biomassa di lievito *Kluyveromyces lactis* (*K. fragilis*, *Saccharomyces fragilis*)** - Metodo SmF *in batch* descritto da Dagbagli S. e Coll.(2008).

- 1 – Semina del ceppo in provette di terreno solido (Yeast Malt Agar) a becco di clarino (*slant*) avente la seguente composizione (g/l): glucosio 10, estratto di lievito 3, estratto di malto 3, peptone 5, agar-agar 20, acqua demineralizzata ml 1000. pH finale =  $6.0 \pm 0.2$ , sterilizzazione in autoclave a  $121^\circ\text{C}$  per 15 minuti.
- 2 – Incubazione delle provette in termostato per 2 giorni a  $+30^\circ\text{C}$
- 3 – Trapianto da coltura (sviluppata su terreno solido) in brodo avente la seguente composizione (g/l): lattosio 30, estratto di lievito 1, potassio fosfato bibasico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2, ammonio fosfato biacido  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1, ammonio fosfato monoacido  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1, magnesio solfato  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1, acqua demineralizzata 1000 ml. pH = 7.0; sterilizzazione in autoclave a  $121^\circ\text{C}$  per 15 minuti.
- 4 – Incubazione delle colture in brodo per 2 giorni a  $+30^\circ\text{C}$
- 5 – Inoculazione della brodo coltura-*starter* nel fermentatore, preparato con lo stesso terreno liquido, nella proporzione del 2% di semina (v/v).
- 6 – Ciclo di fermentazione a  $+30^\circ\text{C}$  per 48 ore alla velocità di 200 rpm e pH 7.0



**Produzione in biomassa di lievito *Kluyveromyces lactis* (*K. fragilis*, *Saccharomyces fragilis*)** - Metodo SmF *feed-back* descritto da Lukondeh T. e Coll. (2005)

Il ceppo di lievito viene seminato in 50 ml di Brodo-lattosio\* incubato a  $+30^\circ\text{C}$  per 14 ore su agitatore a 180 rpm. Viene allestito un trapianto in 90 ml dello stesso brodo, incubato per altre 24 ore e quindi usato per inoculare un fermentatore da 3 litri, con uguale terreno.

Il ciclo iniziale di fermentazione avviene a  $+30^\circ\text{C}$  con pH = 5.0, aria immessa al 20% sul volume del terreno e agitazione a 200 rpm.

I cicli successivi alle 24 ore sono caratterizzati dal prelievo di 2 litri di biomassa ad intervalli di 2 ore, sostituiti con pari volume di terreno fresco. La resa era mediamente valutabile in 2.9 g di cellule/litro di terreno.

\* Terreno Brodo-lattosio contenente (g/l): lattosio 10, solfato d'ammonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5, magnesio solfato  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2, potassio fosfato mono-basico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4, estratto di lievito 2, acqua demineralizzata ml 1000.



Filtrazione del terreno direttamente nel fermentatore attraverso filtri sterilizzanti Seitz EKS<sub>1</sub>

### Produzione in biomassa di *Aspergillus niger* (submerged fermentation, SmF) secondo Oskoma C.E. e Coll. (2005)

Il terreno di fermentazione deve contenere sostanze apportatrici di carbonio, azoto ricavabili da farine vegetali e tracce di elementi utili per la crescita, ad esempio zinco, rame, ferro. Altri terreni contengono farina di frumento, riso, lievito di birra, proteine di soia, digerito di caseina.

L' inoculo viene effettuato al 2% (v/v) rispetto al brodo nel fermentatore partendo da una coltura di 7 giorni di *Aspergillus niger* sviluppata su terreno solido Potato Dextrose Agar (PDA)\*\*.

Il processo di fermentazione avviene a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  con 120 rpm di rotazione per 8 giorni.

Dopo la crescita in fermentatore, le cellule vengono estratte con acqua e il prodotto finale concentrato mediante adsorbimento su silicato d'alluminio (bentonite) (*Production of acid-active lactase*, brevetto US 3620924 A).

- Composizione del terreno di fermentazione (g/l): solfato d'ammonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2, potassio fosfato monobasico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, magnesio solfato  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, zinco solfato  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1, RBM\* fino a 1 lt

- \* RBM (*rice bran medium*): sospensione acquosa al 2% di riso tritato in polvere, filtrata su garza e autoclavata a  $121^\circ\text{C}$  per 15 minuti  
pH del terreno = 3.5  
Sterilizzazione in autoclave a  $121^\circ\text{C}$  per 15 minuti

#### \*\* PDA (Potato Dextrose Agar)

Potato Infusion from 200 g ..... 4 g\*  
Dextrose ..... 20 g  
Agar ..... 15 g

\* 4.0 g of potato extract is equivalent to 200 g of infusion from potatoes.

Final pH:  $5.6 \pm 0.2$  at  $25^\circ\text{C}$

1. Suspend 39 g of the medium in one liter of purified water.
2. Heat with frequent agitation and boil for one minute to completely dissolve the medium.
3. Autoclave at  $121^\circ\text{C}$  for 15 minutes.

### Produzione in biomassa di *Rhizopus oryzae* (solid state fermentation, SSF) secondo Ghosh B. e Coll. (2011)

La muffa viene seminata su piastre di Potato Dextrose Agar (PDA) da incubare a  $28\text{-}30^\circ\text{C}$  per 48 ore. L'inoculo viene preparato tagliando dischi di terreno del diametro di 0.5 cm da usare per infettare il terreno BM\* completamente disidratato in contenitori sterili.

Dopo incubazione in SSF, la crescita viene raccolta a differenti intervalli, umidificando il substrato con diluente sterile ed omogeneizzando il prodotto finito.

- \* Terreno BM (*Basal Medium*) – Composizione (g/lt): peptone 0.9;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.4; KCl 0.1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 e amido 0.25. (pH = 8.0).



## CONTROLLI DI PRODUZIONE

### **Determinazione della concentrazione di $\beta$ -galattosidasi**

Il substrato è 2,5 mg/ ml di orto-nitro-fenil -  $\beta$  - D- galattopiranoside (ONPG) in 0.2 M di tampone fosfato a pH 6.5

Poiché la  $\beta$ -galattosidasi nei lieviti è un enzima intracellulare, è necessario rompere le cellule prima di analizzare la quantità di enzima prodotto. Esistono diversi metodi (fisici e chimici) per questo scopo.

Il metodo con alcool isoamilico prevede la preparazione di una sospensione contenente 10-20 mg di cellule (peso secco) in 5 ml di tampone fosfato 0.2 M a pH 6.5 da mescolare con 5 ml di alcool isoamilico. Dopo diluizione fino a 25 ml con lo stesso tampone fosfato, la miscela va posta su agitatore per 15 minuti a temperatura ambiente per rendere permeabile la membrana cellulare e consentire la fuoriuscita dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi.

1 ml di coltura cellulare, pre-trattato con alcool isoamilico come sopra, viene aggiunto a 4 ml di substrato e incubato a +37°C per 15 minuti.

La reazione viene bloccata aggiungendo 1 ml di sodio carbonato in soluzione acquosa al 10%

L'orto-nitro-fenolo (ONP) liberato dalla  $\beta$ -galattosidasi viene misurato allo spettrofotometro a 420 nm, considerando un coefficiente d'estinzione di 4.2371 ml micro-mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

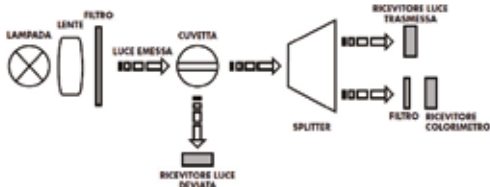
Un'unità di attività enzimatica è definita la quantità di enzima che libera 1 micro-mole di ONP per minuto nelle condizioni della prova. L'attività specifica (U g<sup>-1</sup>) è definita come il numero di unità di lattasi per grammo di biomassa cellulare.

### **Concentrazione della biomassa**

20 ml di brodocoltura vengono centrifugati a 4000 g per 20 minuti, seguiti da essiccamento delle cellule a +80°C per una notte. La valutazione viene fatta in questo caso per pesata.

La determinazione della concentrazione di cellule (sviluppate durante e a fine ciclo) può essere fatta mediante misurazione della torbidità con uno strumento (ad esempio, il torbidimetro Lange).

La torbidità del campione in sospensione viene letta e confrontata con i valori di una curva *standard*, costruita attraverso la semina di un ceppo di riferimento, opportunamente diluito, su piastre di un terreno batteriologico appropriato.



## CONTEGGIO DELLE CELLULE DI LIEVITO CON SPETTROFOTOMETRO

Il numero di cellule di un lievito può essere determinato allestendo, da una coltura del medesimo, una sospensione acquosa su cui misurare la torbidità con uno spettrofotometro. La densità ottica (OD) o assorbanza (rispetto alla luce trasmessa) che lo strumento legge è proporzionale al numero delle cellule presenti nel campione.

È necessario avere a disposizione una "curva standard" di confronto, cioè un grafico che riporta in ascissa



la densità ottica (OD) e in ordinata il numero di cellule determinato mediante il metodo classico delle diluizioni e della conta su piastra.

### Conta su piastra

Si prepara una sospensione densa in diluente fisiologico partendo da un ceppo di lievito noto (riferimento) e da questa si fanno derivare quattro diluizioni decimali (1 + 9 ml) dello stesso diluente, previa opportuna miscelazione su *vortex*.

Ciascuna diluizione viene seminata a ml 0,1 (in doppio) su piastre di terreno YPD da incubare a +30°C per 96 ore in termostato. Dal conteggio delle colonie sviluppate si ottengono, applicando la formula sotto riportata, quattro valori (N), da collocare in ordinata sul grafico:

$$N = \frac{\Sigma /C}{V (n_1 + 0,1n_2) \cdot d}$$

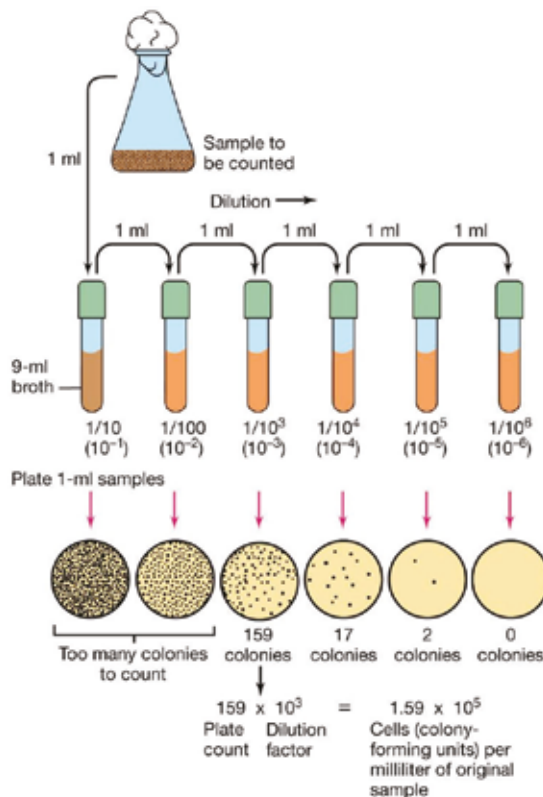
$\Sigma/C$  = somma delle colonie nelle piastre considerate

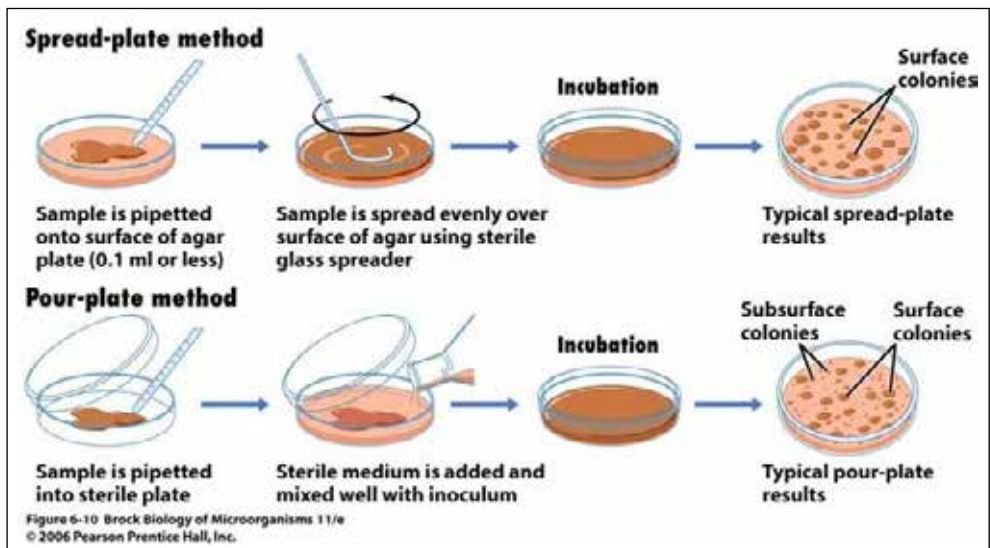
V = volume dell'inoculo seminato

$n_1$  = numero delle piastre considerate, per la prima diluizione

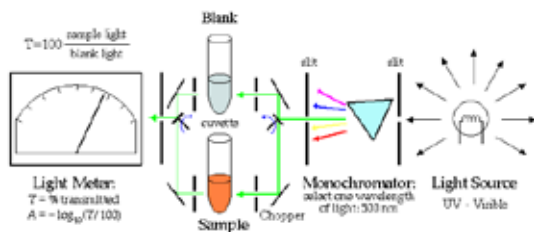
$n_2$  = numero di piastre considerate, per la seconda diluizione

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione





### Determinazione della densità ottica allo spettrofotometro



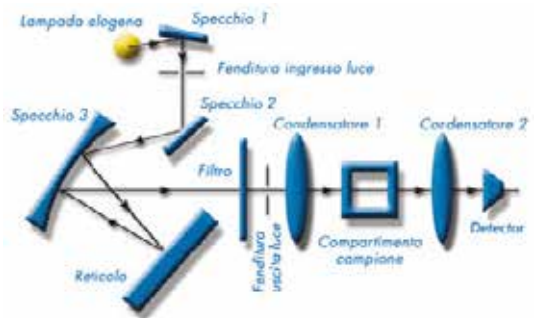
Introdurre in cinque cuvette dello spettrofotometro, rispettivamente, ml 1 di diluente (chiamato BIANCO) e ml 1 di ciascuna delle quattro diluizioni (chiamate *standard* 1, 2, 3, 4).

Leggere la densità ottica con lo strumento a 600 nm. Il BIANCO dovrà corrispondere a 0, mentre le altre letture saranno comprese fra 0 e 2.

I valori degli *standard* 1, 2, 3, 4 vanno collocati in ascissa sul grafico.

### Costruzione della curva standard e determinazione di OD di un campione

Unendo sul grafico i quattro punti di densità ottica con i corrispondenti quattro valori del numero di cellule, si disegna la retta chiamata “*curva standard*”, con la quale confrontare le letture dei campioni ignoti per desumerne la concentrazione. Ad esempio, come nel grafico seguente:



Nella conta dei lieviti, se in bassa concentrazione, può essere impiegato il metodo microscopico, che offre risultati immediati pur con notevole approssimazione.

**ANALISI SU ALIMENTI**  
(che possono contenere lattosio o glutine)



*Allevamento a Muravera, Sardegna 2015\**

**ANALISI CHIMICHE ED IMMUNO-ENZIMATICHE**

**Test di laboratorio per la determinazione della concentrazione di lattosio**

**A) Metodo colorimetrico (Miller, 1959)**

Reagenti:

- Campione in esame (ad esempio, latte) 20 g
- acido acetico al 10%
- Reattivo di Fehling 10 ml (composto da 5 ml NaOH e tartrato di Na e K + 5 ml  $\text{CuSO}_4$ )
- Blu di metilene in soluzione acquosa 1%, q.b.





## Procedimento

- Pesare esattamente 20 g del campione in un matraccio tarato da 100 ml ed aggiungere 50 ml di acqua.
- Scaldare in un bagnomaria tenuto a 40°C ed aggiungere, goccia a goccia, acido acetico al 10% fino alla completa precipitazione delle sostanze proteiche e grasse presenti nel campione.
- Lasciare raffreddare, portare a volume con acqua, agitare e filtrare.
- **Nel filtrato determinare il lattosio con il metodo del Fehling.**
- In una beuta aggiungere 5 ml di soluzione A + 5 ml di soluzione B esatti del reattivo e diluire con circa 40 ml di acqua distillata.
- Portare ad ebollizione e titolare con la soluzione di lattosio ottenuta con l'operazione di filtrazione. La titolazione deve avvenire lentamente, goccia a goccia, agitando e mantenendo la soluzione ben calda, quasi ad ebollizione, aggiungendo alcune gocce di blu di metilene per riconoscere meglio il punto di viraggio.
- Quando il colore azzurro del reattivo di Fehling si attenua, fino quasi a scomparire, interrompere l'operazione e procedere a scaldare la soluzione all'ebollizione per 6 minuti.

## Calcolo

Poiché sappiamo che 10 ml di reattivo di Fehling vengono ridotti da 0,0676 g di lattosio, la % di tale zucchero riducente presente nel campione sarà data da:

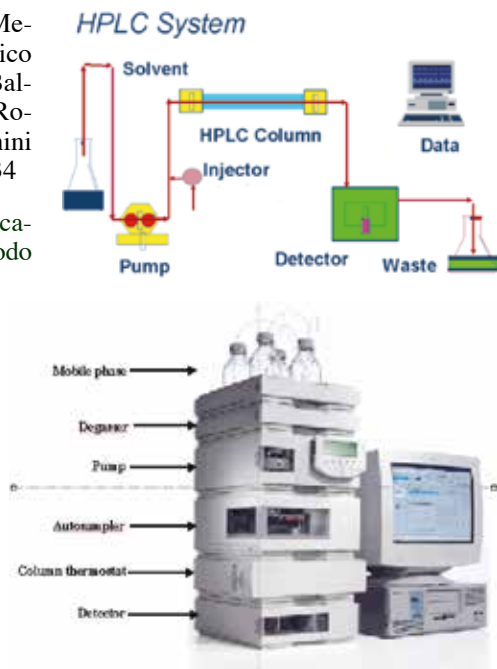
$$LATTOSIO \% = \frac{0,0676 \times 5 \times 100}{a}$$

dove **a** = ml di filtrato contenente lattosio occorsi per la riduzione di 10 ml di reattivo di Fehling

## B) Metodo per HPLC\* (*High Performance Liquid Chromatography*)

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ - Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti - Raccolta a cura di Massimo Baldini, Fabio Fabietti, Stefania Giammarioli, Roberta Onori, Leucio Orefice e Angelo Stacchini - Laboratorio Alimenti, Rapporto Istan 96/34

1. **Campo di applicazione:** il metodo è applicabile ai cereali e ai prodotti derivati. Il metodo è stato messo a punto per le matrici indicate, ma risulta applicabile anche ad altre matrici alimentari.
2. **Principio del metodo:** gli zuccheri sono estratti dal campione con una miscela di acqua e acetonitrile in bagno ad ultrasuoni. La separazione e la determinazione sono eseguite mediante HPLC, utilizzando una colonna cromatografica specifica; la rivelazione viene effettuata mediante Rivelatore ad indice di rifrazione o Rivelatore UV.
3. **Reattivi** - 3.1 Acetonitrile/acqua (60:40)  
3.2 Soluzioni *standard* di zuccheri in



acetonitrile/acqua (1:1).- Fruttosio, glucosio, saccarosio e maltosio 3.3 Fase mobile acetonitrile/acqua (75:25) (solventi per HPLC RS – PLU)

4. **Apparecchiatura** - 4.1 Macinino da laboratorio 4.2 Bilancia analitica 4.3 Bagno ad ultrasuoni 4.4 Agitatore magnetico 4.5 Carta da filtro a pieghe 4.6 Cromatografo liquido ad alta risoluzione 4.7 Colonna analitica per HPLC amminica *Carbohydrate Analysis Waters Millipore®* o equivalente. 4.8 Rivelatore ad indice di rifrazione 4.9 Rivelatore W (A = 190 nm) 4.10 Registratore integratore

### Procedimento

**Estrazione** - Estrarre 10 g del campione finemente macinato con 100 ml della miscela 3.1 in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. Mantenere il campione sotto agitazione costante per 3 ore. Iniettare l'estratto filtrato in HPLC.

**Determinazione cromatografica** - Predisporre la pompa dell' HPLC ad un flusso di circa 1.0 ml/min ed utilizzare la fase mobile (3.3). Costruire una curva di calibrazione mediante soluzioni di lavoro. Controllare la riproducibilità della curva di calibrazione ed iniettare un' opportuna aliquota del campione ottenuto in 5.1.

**Espressione dei risultati** - Il contenuto dei singoli carboidrati del campione, espresso in percentuale, é calcolato in base alla seguente formula:  $Zucchero (g/100 g) = (Ac / As) \times Ms / Mc \times 100$ , dove: Ac = area del picco del campione, AS = area del picco dello *standard*, Ms = quantità di *standard* iniettata espressa in g; Mc = quantità di campione iniettata espressa in g. L'area del picco dello *standard*, utilizzata per il calcolo deve essere comparabile quella del campione.

\* GROSSI M., MICCO, C., CHIRICO, M. ARNALDI, C. Determinazione degli zuccheri in sfarinati di frumento tenero mediante GLC e HPLC. Rivista della Società Italiana di Scienza dell' Alimentazione 1985,14 (6): 429 -434.

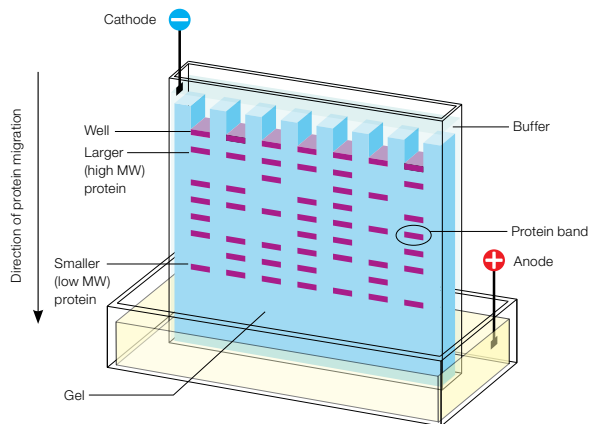
## TEST DI LABORATORIO PER GLIADINE E PROLAMINE

### SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyamide Absorbent Gel Electrophoresis)



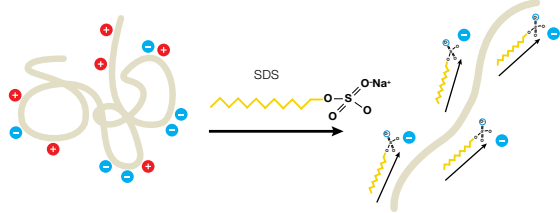
*Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 1970, 5259: 680–685 (Biochimico, Università di Ginevra)*

L'**elettroforesi** è una tecnica che permette di **separare**, mediante l'applicazione di un opportuno campo elettrico, **molecole** presenti in soluzione sotto forma di **specie** elettricamente cariche. La separazione si basa sulla **differente velocità di migrazione** di queste specie **cariche**, che possono essere amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi, acidi nucleici.

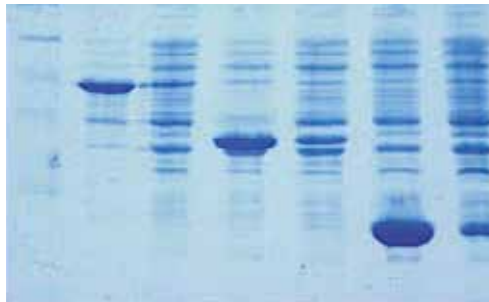


Nell'elettroforesi in presenza di SDS (tecnica di **Laemmli**, 1970), le proteine sono denaturate mediante l'aggiunta del detergente **sodio dodecil solfato (SDS)** conferendo a tutte una carica netta negativa. Interagisce con le proteine in un rapporto costante di circa 1.4 grammi di SDS ogni grammi di proteina. Le cariche negative dell'SDS mascherano la carica intrinseca della proteina conferendo ad esse un rapporto carica/massa simile. La separazione delle proteine avviene quindi mediante filtrazione su **gel di poliaccrilammide (PAGE)** in base al

loro differente peso molecolare (da <http://www.scienzeascuola.it/laboratorio/biologia/409-elettroforesi-di-proteine-sds-page>).



Effect of SDS on the conformation and charge of a protein (da <http://www.bio-rad.com/it-it/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods>)

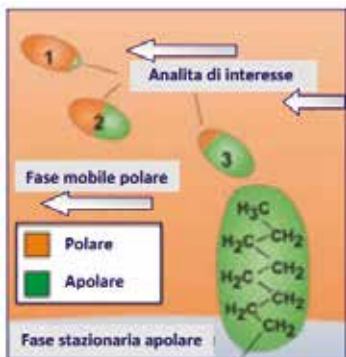


Tracciato elettroforetico di proteine in SDS-PAGE (da [www.unipa.it](http://www.unipa.it))

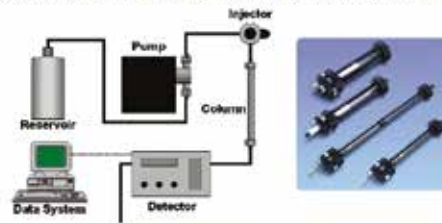
### RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)

La tecnica RP-HPLC sfrutta le interazioni idrofobiche tra le molecole proteiche e la matrice cromatografica contenente gruppi idrofobici (ad esempio, C4, C8, C18). I gruppi apolari delle proteine interagiscono con la matrice idrofobica. L'eluizione viene effettuata aumentando la percentuale del

solvente apolare in maniera tale che le proteine più idrofiliche vengono eluite prima. I sistemi di solventi comunemente utilizzati sono: acqua + 0.1% TFA/acido formico in fase acquosa, acetonitrile in fase organica.

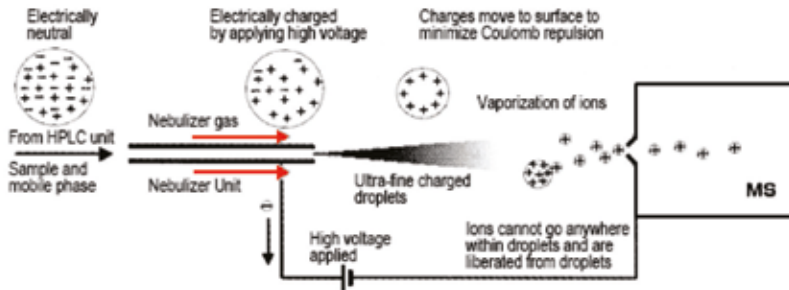


L'HPLC impiega sistemi automatizzati con campioni applicati in modo preciso, velocità di flusso controllate, mantenute ad alte pressioni, una matrice di plastica del diametro compreso tra 3 e 300 µm e rivestiti di uno strato uniforme di materiale cromatografico.



Ciò migliora enormemente la risoluzione e la riproducibilità della separazione diminuendo il tempo di esecuzione.

## LC-ESI-MS/MS (*Liquid Chromatography - Electro Spray Ionisation - Massa/Massa*)



### *Evaporation of Ions in Electrospray Ionization (ESI)*

La tecnica ESI (*Electro Spray Ionisation*) è stata inventata dal chimico statunitense John Bennett Fenn che ha ottenuto nel 2002 il premio Nobel.

Si usa abbinata alla spettrometria di massa (ESI-MS) per produrre ioni, adoperando un *electrospray* generato applicando un elevato voltaggio ad un liquido.

Permette quindi di raccogliere le informazioni racchiuse in una soluzione dopo trasformazioni in fase gassosa. La sua sensibilità può essere aumentata sottoponendo lo spettro ottenuto ad una seconda spettrometria di massa (ESI-MS/MS).

Risulta più vantaggiosa di altre metodiche per produrre ioni da macromolecole (ad esempio, le proteine) perché ne evita la loro frammentazione.

## GLIADINA NEI PRODOTTI DICHIARATI PRIVI DI GLUTINE

### Metodo per **immunodiffusione**\* dell'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

\* "Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti" - Raccolta a cura di Massimo Baldini, Fabio Fabietti, Stefania Giammarioli, Roberta Onori, Leucio Orefice e Angelo Stacchini - Laboratorio Alimenti, Rapporto ISTISAN 96/34, pagg. 249-251



- 1 - **Campo di applicazione:** il metodo è applicabile a tutti i prodotti dichiarati privi di glutine.
- 2 - **Principio del metodo:** La frazione gliadinica del glutine è lasciata diffondere su *gel* di agarosio in presenza del suo specifico anticorpo. La diffusione delle due soluzioni dà origine, nel punto di incontro, ad una banda di precipitazione dovuta al complesso antigene-anticorpo.

### 3 - **Reattivi**

- 3.1 Alcool etilico al 50%: versare in un cilindro da 1000 ml 526 ml di alcool etilico a 95° e portare a volume con acqua.
- 3.2 Tampone tris-citrico a pH 8.2: solubilizzare 9.2 g di 2-amino-2-idrossimetil 1- 3 propandiolo (tris) e 2.5 g di acido citrico monoidrato in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.
- 3.3 Soluzione di sodio azide all'1%.
- 3.4 Soluzione di agarosio: sciogliere 1 g di agarosio in 100 ml di soluzione tampone (3.2), aggiungere 1 ml della soluzione di sodio azide (3.3).
- 3.5

Idrossido di sodio 0.01 N. 3.6 . Soluzione *standard* madre di gliadina: solubilizzare 175 mg di gliadina con NaOH (3.5) in un matraccio tarato da 25 ml. 3.7 Soluzione *standard* di lavoro: diluire 1 ml della soluzione madre (3.6) con la soluzione alcoolica al 50% (3.1) in un matraccio tarato da 100 ml. 3.8 Siero specifico antigliadina (RIFTEL - DE HAEN). 3.9 Cloruro di sodio 0.15 M. 3.10 Soluzione di fissaggio: soluzione di acido tannico all'1%. 3.11 Alcool metilico. 3.12 Acido acetico glaciale. 3.13 Blu di *Coomassie*. 3.14 Soluzione colorante: sciogliere 100 mg di blu di *Coomassie* (3.13) in 50 ml di alcool metilico, aggiungere 10 ml di acido acetico glaciale e 40 ml di acqua.

3.15 Glicerina. 3.16 Soluzione decolorante: miscelare 50 ml di alcool metilico (3.11), 10 ml di acido acetico glaciale (3.12), 10 ml di glicerina (3.15) e 30 ml di acqua.

#### 4 - Apparecchiatura

4.1 Centrifuga per tubi da 50 ml. 4.2 Capsule di Petri di 8 cm di diametro. 4.3 Foratappi di 5 mm di diametro. 4.4 Contenitore ad atmosfera satura di acqua.

#### 5 - Procedimento

5.1 *Preparazione del campione*: in un tubo da centrifuga aggiungere a 5 g di campione 50 ml della soluzione alcoolica (3.1), centrifugare per 20 minuti a 5000 giri, prelevare il supernatante e trasferirlo in un pallone a fondo tondo da 100 ml. Evaporare l'alcool sotto vuoto alla temperatura di 40 °C. Riprendere il residuo con 1 ml della soluzione alcoolica al 50% (3.1).

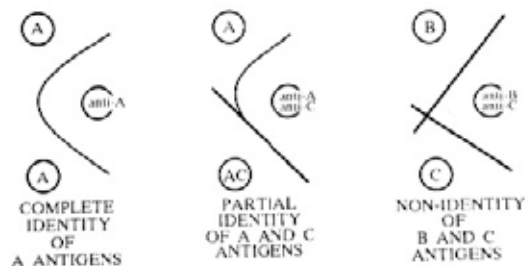
5.2 *Allestimento della piastra*: allestire la piastra di *gel* versando nella capsula di Petri 22 ml della soluzione di agarosio (3.4) precedentemente riscaldata all'ebollizione fino a limpidezza. Dopo solidificazione, incidere con il foratappi un pozzetto centrale e sei pozzetti disposti circolarmente e distanziati tra loro di 1 cm. Versare in ogni pozzetto una piccola aliquota dell'agarosio asportato dalla piastra diluita con poche gocce di acqua.

5.3 *Determinazione per immunodiffusione*: depositare nel pozzetto centrale 25 mcl del siero antigliadina (3.8) e in quelli laterali quantità crescenti dell'estratto proteico del campione, corrispondenti a 10, 25 e 50 mcl. Sulla stessa piastra depositare 10, 25 e 50 mcl della soluzione *standard* di lavoro (3.7). Lasciar diffondere le soluzioni in ambiente saturo di acqua per almeno 24 ore. In presenza di gliadina, nel punto di incontro delle due soluzioni (siero e campione), si formerà una banda di precipitazione che è possibile evidenziare con una fonte luminosa a luce radente su fondo scuro. Lavare la piastra per almeno 48 ore con la soluzione di NaCl (3.9), cambiare la soluzione circa 10 volte. Versare quindi sullo strato di agarosio la soluzione di acido tannico (3.10) e dopo 5-10 minuti sciacquare con acqua. Coprire poi lo strato di agarosio con la soluzione colorante (3.14), attendere 10 minuti e quindi decolorare con la soluzione (3.16) fino ad ottenere delle bande colorate su fondo chiaro.

#### 6 - Espressione dei risultati

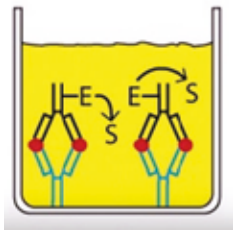
Le bande di precipitazione, che si possono apprezzare visibilmente dopo la colorazione, permettono di stabilire la presenza o assenza di gliadina nel prodotto con un limite di sensibilità dell'ordine di 7 ppm.

\* Riferimenti bibliografici \*BELLOMONTE, G. BONIGLIA C., *Gluten et maladie coeliaque*, *Pharmeuropa* 1992, 4(3), 163-164

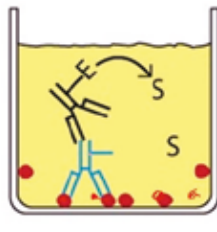


Le ricerche condotte da Koning (2004) sulle interazioni fra cellule T e gliadine hanno portato alla sintesi di peptidi contenenti epitopi proteici capaci di evocare in laboratorio anticorpi monoclonali, utilizzati poi per allestire i *test ELISA* (a *sandwich* o competitivi).

L'unico metodo analitico ad oggi approvato a livello ufficiale dal Comitato del *Codex Alimentarius* sui "Metodi di Analisi e di Campionatura come metodo di Tipo 1" è l'R5 ELISA secondo Mendez ("sandwich" ELISA). Questo metodo rileva il glutine anche in alimenti che hanno subito trasformazioni ad alte temperature. Per il rilevamento del glutine idrolizzato (ad es.: birra, sciroppi, ecc.) deve essere applicata una variante dell'R5 ELISA, l'R-ELISA *competitive*.



*ELISA sandwich*



*ELISA competitive*



I *kit* commerciali (r-Biopharm, Neogen, Romer Labs, ecc) servono per l'analisi qualitativa o quantitativa del glutine su ingredienti, soluzioni e prodotti finiti che devono presentarsi esenti da gliadine e prolamine proprie del frumento, dell'orzo e della segale ed occupano circa 30 minuti. Il *test ELISA* avviene su piastra *microtiter* nei cui pozzetti vengono messi, a contatto con gli anticorpi di cattura adesi alla plastica, estratti del campione da esaminare sospesi in tampone fosfato.

I metodi d'analisi per il glutine si sono sviluppati in Europa dopo il 1985, data di fondazione del *Prolamin Working Group* (PWG) a Geel, in Belgio. In realtà, i metodi si sarebbero evoluti verso la determinazione della prolamina (il glutine è formato da prolamine solubili e gluteline insolubili). Da questa determinazione si poteva poi stabilire la concentrazione di glutine nell'alimento.

Nel corso degli anni sono stati standardizzati diversi anticorpi diagnostici destinati a *test* per il glutine con tecnica ELISA.

Tra questi, l'anticorpo "Skerritt" e l'anticorpo R5.

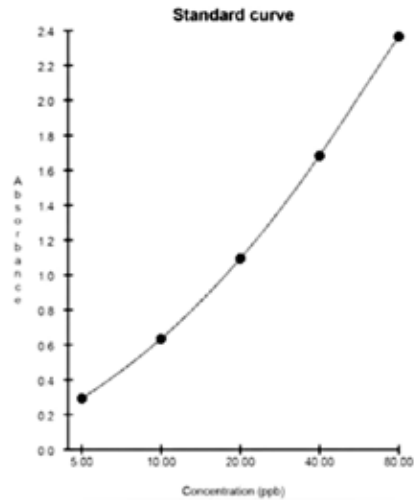
Nel 2002 l'Università di Stanford (USA) ha isolato l'anticorpo G 12, più specifico dei precedenti, che riconosce il frammento tossico 33-mer della gliadina e che viene adottato, ad esempio, nel *kit AGRAQUANT® Gluten G 12* (Romer Labs GmbH).

Dopo incubazione, le gliadine non catturate dagli anticorpi vengono lavate via e si aggiunge un secondo anticorpo (rivelatore) marcato con un enzima. Questo anticorpo si lega all'eventuale gliadina durante un altro periodo d'incubazione.

L'anticorpo marcato con l'enzima, se non legato all'antigene, viene lavato via e, dopo aggiunta di una soluzione *stop*, si legge la comparsa di colore (blu se c'è gliadina, rosso porpora in caso negativo).



Si può costruire, con una serie di *standard* di gliadina a contenuto noto, una curva su cui confrontare la densità ottica dei campioni e stabilire quindi la concentrazione della gliadina in parti per milione (ppm). Il *range* di sensibilità dei *test* varia, in genere, da 2,5 a 40 ppm.



Curva standard per il kit RIDASCREEN® Gliadin Competitive della r-BIOPHARM

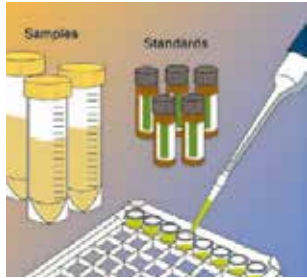
Il *test* Reveal 3-D® per il glutine della NEOGEN è dedicato all'analisi qualitativa dei residui sulle superfici e consiste in un dispositivo unico da leggere su tre linee, rispettivamente una di controllo e due di positività per bassa e alta concentrazione di glutine.

**Procedure** 1. Add Type 4 extraction buffer to sample tube. 2. Add 0.25 mL of rinse or environmental swab to a sample tube. 3. Cap and shake for 1 minute. 4. Add the contents of the Type 5 extraction buffer. 5. Cap and shake for 1 minute. 6. Remove cap and fill with liquid from tube. 7. Dip the Reveal 3-D device into the liquid in the lid. 8. Leave the cavity saturated until liquid is seen running into the test window. 9. Place device in a flat surface and allow test to develop for 5 minutes.

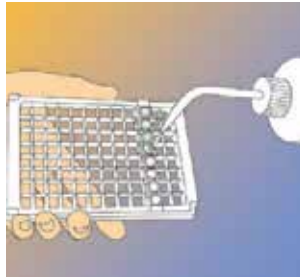


Il *test* AGRAQUANT® Gluten G-12 ELISA della ROMER LABS (Tulin, Austria) ha un limite di sensibilità di 2 ppm e un *range* di misurabilità di 4-200 ppm di glutine. Come dice il nome, utilizza l'anticorpo G 12.

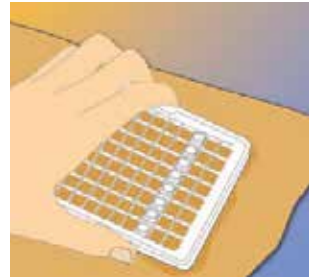




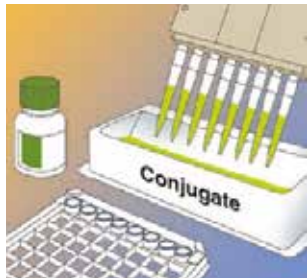
1) Add 100  $\mu\text{L}$  standard or sample to antibody coated well and incubate for 20 minutes.



2) discard contents from the wells and wash five times with wash buffer.



3) Tap to dry the plate.



4) Add 100  $\mu\text{L}$  of conjugate into well and incubate for 20 minutes.



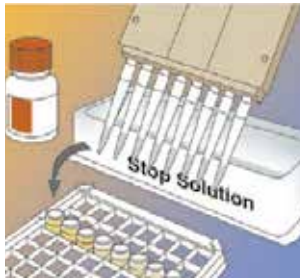
5) discard contents from the wells and wash five times with wash buffer.



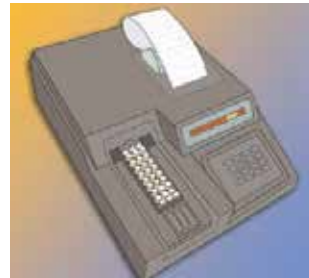
6) Tap to dry the plate.



7) Add 100  $\mu\text{L}$  substrate to each well and incubate for 20 minutes in the dark.



8) Add 100  $\mu\text{L}$  stop solution to each well.



9) read wells with a microwell reader using a 450 nm filter and interpret results.

*L'esecuzione del test è rappresentata nella figura qui sopra.*

## ANALISI MICROBIOLOGICHE

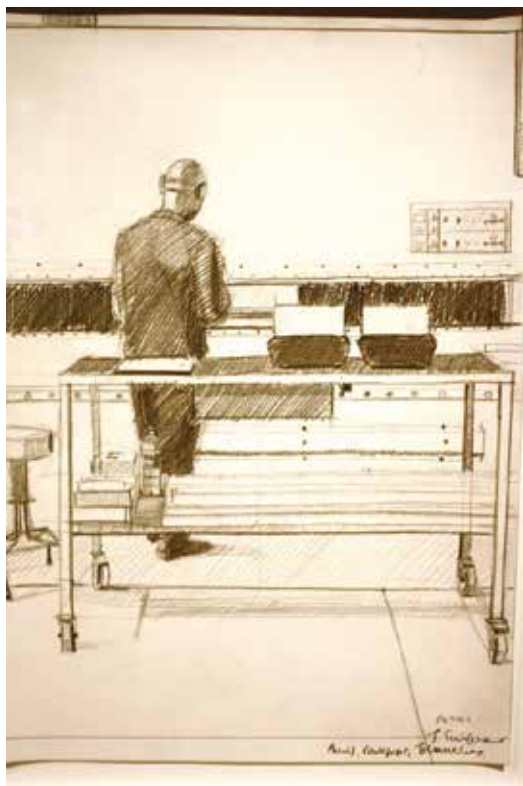
In Europa non sono disponibili, finora, norme e limiti microbiologici per alimenti delattosati o privi di glutine.

Tuttavia, trattandosi nel primo caso di **prodotti derivati dal latte**, vige dal 2005 il Regolamento (CE) n. 2073, modificato nel 2007 dal Regolamento (CE) n. 1441, che prescrive determinate analisi microbiologiche ufficiali, destinate a garantire:

- la sicurezza dell'alimento, escludendo la presenza di alcuni patogeni, in pratica, nel caso specifico, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii*;
- condizioni igieniche di fabbricazione, stabilendo dei limiti di accettabilità da non superare per alcuni microrganismi indicatori di contaminazione. Questi parametri sono da applicare soprattutto in fase di produzione nell'ambito dell'autocontrollo aziendale.

Per gli **alimenti che possono contenere glutine**, invece, non sono ancora state ufficializzate norme microbiologiche specifiche riguardanti, ad esempio, pane, prodotti di pasticceria, paste alimentari. Una raccolta completa ed accurata di analisi microbiologiche consigliate per tali alimenti è stata compilata in Italia dalla Regione Piemonte e pubblicata nel 2012 ([www.regione.piemonte.it](http://www.regione.piemonte.it)).

Nelle tabelle seguenti sono citati piani di campionamento a più classi, spiegati in dettaglio all'interno delle "Norme per il campionamento e per la preparazione dei campioni da analizzare" del Regolamento (CE) n. 1441 (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 7.12.2007) a cui si rimanda (<http://eur-lex.europa.eu/>).



*Joachim Schönfeldt - "In laboratorio" - Disegno a matita dell'artista nato a Pretoria (Sudafrica) nel 1958. Biennale Venezia 2015\*\**

**ANALISI MICROBIOLOGICHE SU LATTE E DERIVATI**  
*(Indicate anche per alimenti che possono contenere lattosio)*

**Regolamento (CE) n. 1441/2007 della Commissione del 15 dicembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari**

| Criterio  |  | Latte e derivati  |
|---|--|---|
| Sicurezza alimentare  | Igiene di processo   |   |
| <i>Salmonella,</i><br><i>Listeria monocytogenes</i><br>(per tutti i prodotti) | Enterobatteriacee  | Latte pastorizzato  |
|   | <i>Escherichia coli</i>  | Formaggi da latte pastorizzato  |
|   | Enterobatteri, stafilococchi coagulasi+, enterotossine stafilococciche                                       | Formaggi, burro, panna da latte non pastorizzato, latte e siero di latte in polvere |
|   | Enterobatteri  | Gelati  |
| + <i>Enterobacter sakazakii</i><br>(solo per lattanti e dietetici)            | <i>Salmonella,</i><br><i>Listeria monocytogenes</i><br>Enterobatteriacee,<br><i>Bacillus cereus</i> presunto | Alimenti per lattanti e dietetici   |

| LATTE E DERIVATI                                | Criteri di sicurezza                                       |                                 | Criteri di igiene di processo |                         |                                   |                           |   |
|---|--|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---|
|   | <i>Salmonella</i>  | <i>Listeria monocytogenes</i>   | Enterobatteri                 | <i>Escherichia coli</i> | Stafilococchi coagulasi+          | <i>B. cereus</i> presunto | Enterotossine stafilococciche                         |
| Latte pastorizzato                              |  |                                 | 1-5                           |                         |                                   |                           |   |
| Formaggi da latte pastorizzato                  |  |                                 | 100-1000<br>c=2               |                         |                                   |                           |   |
| Formaggi stagionati o da latte non pastorizzato |  | Assente in 25 g alla produzione |                               |                         | 100-1000<br>c=2                   |                           |   |
| Formaggi da latte crudo                         |  |                                 |                               |                         | 10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup> |                           | Solo con stafilococchi coagulasi+ >10 <sup>7</sup> /g |
| Burro e panna da latte non pastorizzato         | Assente<br>In 25 g   | 100/g sul mercato               |                               | 10-100                  |                                   |                           |   |
| Latte e siero di latte in polvere               |  |                                 | 10<br>c=2                     |                         | 10-100<br>c=2                     |                           |   |
| Gelati  |  |                                 | 10-100                        |                         |                                   |                           |   |
| Alimenti per lattanti e dietetici               | Assente in 25 g<br>n=30                                    | Assente in 25 g<br>n=10         | 10<br>n=10                    |                         |                                   | 50-500<br>c=1             |   |
|   | + <i>Enterobacter sakazakii</i><br>Assente in 10 g<br>n=30 |                                 |                               |                         |                                   |                           |   |

**NOTE ALLA TABELLA DESUNTA DALL'ALLEGATO 1 DEL REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE DEL 15 NOVEMBRE 2005 SUI CRITERI MICROBIOLOGICI APPLICABILI AI PRODOTTI ALIMENTARI MODIFICATO DAL REGOLAMENTO N. 1441/2007 DEL 15 DICEMBRE 2007**

I valori in doppio (minimo/massimo) indicati in tabella si chiamano, rispettivamente, **m** ed **M**,  
**c** è il numero di unità campionarie tollerate con risultati intermedi fra m ed M ed è sempre zero ove non diversamente specificato  
**n** è il numero di unità campionarie da esaminare ed è sempre 5 ove non diversamente specificato

**I risultati sono soddisfacenti se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m; accettabili se un numero di valori c è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m; insoddisfacente se uno o più valori sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi fra m e M**

**ANALISI CONSIGLIATE SU ALIMENTI CONTENENTI CEREALI**  
(Indicate anche per alimenti che possono contenere glutine)

**REGIONE PIEMONTE** ([www.regione.piemonte.it](http://www.regione.piemonte.it))

**CRITERI MICROBIOLOGICI PER PRODOTTI ALIMENTARI Allegato 1 – Protocollo tecnico – Rev. 04:2012**

|                                      | CEREALI<br>E PRODOTTI<br>DELLA<br>MACINAZIONE | PANE,<br>PASTICCERIA,<br>BISCOTTERIA<br>DA FORNO | PASTE<br>ALIMENTARI |
|--------------------------------------|---|--|---------------------|
| AEROBI MESOFILI                      | [Yellow bar]                                  |  |                     |
| ENTEROBACTERIACEAE                   | [Green bar]                                   |  |                     |
| ESCHERICHIA COLI (β-GLUCURONIDASI +) | [Dark teal bar]                               |  |                     |
| STAFILOCOCCI (COAGULASI +)           | [Light blue bar]                              |  |                     |
| BACILLUS CEREUS (PRESUNTO)           |   | [Orange bar]                                     |                     |
| CLOSTRIDIUM PERFRINGENS              |   |  | [Dark red bar]      |
| SALMONELLA                           | [Red bar]                                     |  | [Red bar]           |
| LISTERIA MONOCYTOGENES               |   | [Light blue bar]                                 |                     |
| LIEVITI                              | [Green bar]                                   |  |                     |
| MUFFE                                | [Purple bar]                                  |  |                     |

\* I metodi d'analisi di riferimento sono quelli predisposti dalla *International Standard Organisation* (ISO) o da altre fonti ufficiali

**REGIONE PIEMONTE** ([www.regione.piemonte.it](http://www.regione.piemonte.it))

**CRITERI MICROBIOLOGICI PER PRODOTTI ALIMENTARI Allegato 1 – Protocollo tecnico – Rev. 04:2012**

| RICERCA  | METODO        |
|--|---------------|
| Aerobi mesofili (Carica batterica totale, CBT) | ISO 4833      |
| <i>Enterobacteriaceae</i>                      | ISO 21528-2   |
| <i>Escherichia coli</i>                        | ISO 16649-2   |
| Stafilococchi (coagulasi+)                     | ISO 6888-1    |
| <i>Bacillus cereus</i> (presunto)              | ISO 7932      |
| <i>Clostridium perfringens</i>                 | ISO 7937      |
| <i>Salmonella</i>                              | ISO 7937      |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                  | O.M. 07/12/93 |
| Muffe e lieviti                                | NF V08-059    |



**CEREALI E PRODOTTI DELLA MACINAZIONE, PASTICCERIA FRESCA  
E PREPARATI PER PASTICCERIA, PASTICCERIA E BISCOTTERIA  
DA FORNO, PANE E PRODOTTI DI PASTICCERIA**

**REGIONE PIEMONTE** ([www.regione.piemonte.it](http://www.regione.piemonte.it))

**CRITERI MICROBIOLOGICI PER PRODOTTI ALIMENTARI Allegato 1 – Protocollo tecnico – Rev. 04:2012**

Valori di carica microbica consigliati nelle linee guida espressi in ufc/g e ricerche prescritte dalle norme comunitarie dal Regolamento (CE) 2073/2005 modificato dal Regolamento (CE) 1441/2007

| PARAMETRI                         | CEREALI E PRODOTTI DELLA MACINAZIONE | PASTICCERIA FRESCA E PREPARATI PER PASTICCERIA | PASTICCERIA E BISCOTTERIA DA FORNO PANE E PRODOTTI DI PASTICCERIA |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--|---|
| AEROBI MESOFILI                   | < 500.000                            | < 100.000                                      | < 10.000  |
| <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>         |                                      | < 100  |   |
| <i>ESCHERICHIA COLI</i>           | < 10                                 | < 10   |   |
| STAFILOCOCCI (COAGULASI+)         |                                      | < 10   |   |
| <i>BACILLUS CEREUS</i> (PRESUNTO) | < 100                                | < 100  |   |
| MUFFE E LIEVITI                   | < 1000                               |  | < 1000  |
| <i>SALMONELLA</i> *               | Assente/25 g                         | Assente/25 g                                   | Assente/25 g  |
| <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> *   |                                      | Assente/25 g o ≤ 100/g*                        |   |

\* Limiti di legge: vedi Regolamento (CE) 2073/2005 modificato dal Regolamento (CE) 1441/2007 (tabella per latte e derivati)

## PASTE ALIMENTARI

(Pasta all'uovo secca industriale, Pasta all'uovo fresca artigianale non confezionata, Pasta farcita industriale confezionata, Pasta farcita artigianale fresca non confezionata, Pasta farcita precotta surgelata)

REGIONE PIEMONTE ([www.regione.piemonte.it](http://www.regione.piemonte.it))

CRITERI MICROBIOLOGICI PER PRODOTTI ALIMENTARI Allegato 1 – Protocollo tecnico – Rev. 04:2012

I valori in tabella sino “valori guida” per i **PRODOTTI AL COMMERCIO**

I valori evidenziati in giallo sono invece “valori normati” per **PRODOTTI ALLA PRODUZIONE** (Circ. Min. n. 32 del 03/08/1985)

|   | ARTIGIANALI  |                                  | INDUSTRIALI             |                          | CONTENENTE CARNE        | FARCITA PRECOTTA SURGELATA |
|---|--|----------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|
|   | FARCITA NON CONFEZIONATA                                       | FRESCA ALL'UOVO NON CONFEZIONATA | FARCITA CONFEZIONATA    | SECCA ALL'UOVO           |                         |                            |
| <i>ESCHERICHIA COLI</i>                   | < 100  | < 100                            | < 10                    | < 10                     |                         | < 10                       |
| <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (coagulasi+) | <b>1000-10.000</b><br>(c=2)                                    | <b>1000- 10.000</b><br>(c=2)     | <b>100-500</b><br>(c=1) | <b>100-1000</b><br>(c=2) |                         | < 100                      |
| <i>BACILLUS CEREUS</i> (presunto)         |  |                                  | < 100                   |                          |                         |                            |
| <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>            | < 100  |                                  | 100-1000<br>(c=1)       |                          | < 10                    | < 10                       |
|   |  |                                  |                         |                          | <b>&lt; 30</b><br>(c=0) | <b>&lt; 30</b><br>(c=0)    |
| <i>SALMONELLA</i>                         | assente (limiti di legge, L. 283/62)                           |                                  |                         |                          |                         |                            |
|   | <b>assente/25 g (n=5; c=0)</b>                                 |                                  |                         |                          |                         |                            |
| <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>             | <b>11-110/g (limiti di legge, O.M. 07/12/93)</b><br>(n=3; c=2) |                                  |                         |                          |                         |                            |
| MUFFE                                     | < 100  | < 1000                           |                         | < 10.000                 |                         |                            |

\* I valori i doppio (minimo/massimo) indicati in tabella si chiamano, rispettivamente, **m** ed **M**,  
c è il numero di unità campionarie tollerate con risultati intermedi fra m ed M  
**n** è il numero di unità campionarie da esaminare ed è sempre **5**



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bhargav S. *e Coll.*, Solid state fermentation. An overview, *Chem. Biochem. Eng.* 2008, 22, 49-70.
- 2) Carvalho-Silva M.. & Spencer-Martins I., Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 1990, 57(2), 77-81.
- 3) Dalbagli S. *e Coll.*, Optimization of B-galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology, *Electr. J. Biotechnol.* 2008, DOI 10.2225, vol. 11 - issue 4 - fulltext-12.
- 4) Fowler *et. al.*, The amino acid sequence of beta-galactosidase, *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 5032-5041.
- 5) Ghosh B. *e Coll.*, Extra-cellular isoamylase production by *Rhizopus oryzae* in solid-state fermentation of agro-wastes, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011, 54, dx.doi.org/10.1590/51516.
- 6) Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M., Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin. Immunol.* 2007, 119, (1):192-8.
- 7) Lukondeh T. *e Coll.*, Feed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FH510700 cultivated un a lactose-based medium, *J. Ind. Microbiol.* 2005, 13, 284-288.
- 8) Miller G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chem.* 1959, 11, 426-428.
- 9) Oskoma C.E. *e Coll.*, Production of *A. niger* biomass from rice bran, *Pak. J. Nutrition* 2005, 4, 32-36.
- 10) Rech R. *et al.*, Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*, *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 23, 91-96.
- 11) Santos A. *et al.*, Kinetic modelling of lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzim. Microbiol. Technol.* 1998, 22, 558-567.
- 12) Swennen K, Courtin CM, Delcour JA., Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006; 46 (6),459-71.



**SCHEMI DI LAVORO PER LA DETERMINAZIONE DI PARAMETRI  
MICROBIOLOGICI DI INTERESSE PER  
LATTE DELATTOSATO E PRODOTTI A BASE DI LATTE  
DELATTOSATO**

ANNA MARIA FERRINI\*, BRUNELLA APPICCIAFUOCO, ELISABETTA DELIBATO,  
MARIA ROSA MASSARO, MICHELE SONNESSA

(biologi del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare)  
Istituto Superiore di Sanità  
Roma

[\\*annamaria.ferrini@iss.it](mailto:*annamaria.ferrini@iss.it)



## Indicazioni generali

### Preparazione della sospensione madre (diluizione primaria)

In condizioni di sterilità, pesare una massa "m" (g) o un volume "V" (ml) con un'incertezza di misura (IM) max di  $\pm 5\%$  e rappresentativo del campione di prova. Aggiungere una quantità di diluente uguale a  $9 \times m$  (in grammi) o  $9 \times V$  (in ml).

Tale quantità può essere misurata in massa (IM  $\pm 5\%$ ) oppure in Volume (IM  $\pm 5\%$ ). Per i metodi quantitativi, eventuali modifiche nel fattore di diluizione vanno tenute in conto nel calcolo ed espressione dei risultati.

Di norma, utilizzare diluente a temperatura ambiente per evitare danni ai microrganismi dovuti ad improvvise variazioni di temperatura. Omogeneizzare in conformità alle raccomandazioni della ISO 7218. Se necessario, attendere 15 minuti perché le particelle di dimensioni maggiori possano depositarsi.

In caso di conta delle spore, è necessario effettuare una scottatura per 10 min a 80 °C (seguita da un rapido raffreddamento) della sospensione iniziale immediatamente dopo la sua preparazione.

Di seguito in tabella si riportano sia i diluenti di utilizzo generale che quelli utilizzati per scopi particolari con le relative applicazioni. Per le composizioni e ulteriori dettagli si rimanda alla ISO6887-5.

| Diluenti per utilizzo generale (ISO 6887-5) | Diluenti per scopi particolari* (ISO 6887-5)                      | Applicazione  |
|---|---|---|
| Soluzione di sale peptonato                 | Soluzione di sodio citrato  | Formaggio e latte in polvere (roller)   |
| Soluzione di Ringer "un quarto concentrata" | Soluzione di idrogeno fosfato dipotassico                         | Formaggio, latte in polvere (roller), latte fermentato, alcuni caseinati, siero di latte in polvere acido e panna acida |
| Soluzione di peptone                        | Diluente per utilizzo generale con soluzione di $\alpha$ -amilasi | Alimenti contenenti amido   |
| Soluzione tampone di fosfato                | Acqua peptonata tamponata con violetto di bromocresolo            | Prodotti acidi  |
| Acqua peptonata tamponata                   |   |   |

\* da utilizzare solo per la preparazione delle sospensioni iniziali

### **Allestimento delle diluizioni decimali successive**

Trasferire 1 ml della sospensione iniziale in una provetta contenente 9 ml di diluente sterile di utilizzo generale alla temperatura appropriata. Miscelare accuratamente (preferibilmente con un agitatore meccanico per un periodo compreso tra 5 e 10 sec) per ottenere una diluizione di  $10^{-2}$ . Se necessario, ripetere il procedimento, partendo dalla diluizione  $10^{-2}$  e cambiando pipetta ad ogni diluizione successiva, fino ad ottenere le diluizioni appropriate per l'analisi del campione. Allestire le diluizioni in funzione del prodotto (tipologia/contaminazione attesa) e/o dell'eventuale limite di riferimento.

Iniziare la preparazione delle diluizioni decimali successive entro 30 minuti dalla preparazione della sospensione iniziale.

### **Semina**

La semina (nella massa o in superficie secondo quanto indicato dal metodo) deve essere effettuato entro 45 minuti dalla preparazione della sospensione iniziale.

## Controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

La qualità microbiologica di un terreno può essere verificata mediante il controllo di:

- produttività (capacità di un terreno di favorire la crescita del/i microorganismo/i di interesse)
- selettività (capacità di un terreno di inibire la crescita di una varietà di specie microbiche favorendo selettivamente la crescita di uno o pochi tipi di microrganismi);
- specificità (capacità del terreno evidenziare caratteristiche differenziali, del microorganismo di riferimento – valutazione qualitativa).

### Produttività

Può essere valutata quantitativamente attraverso il Rapporto di Produttività ( $P_R$ ):

$$P_R = N_S / N_0$$

dove:

$N_S$  = conta microbica totale del microorganismo di riferimento sul terreno da testare

$N_0$  = conta microbica totale del medesimo microorganismo sul relativo terreno di riferimento non selettivo (ottenuta da una o più piastre, dovrebbe essere ~ 100 ufc)

Per i terreni selettivi il  $P_R$  dovrebbe essere  $\geq 0,5$ ; per quelli non selettivi  $\geq 0,7$ .

La verifica qualitativa della produttività è invece effettuata attraverso la valutazione dell'entità di crescita del microorganismo di riferimento nel terreno da testare (se liquido, la crescita viene valutata in termini di torbidità): 0= crescita assente; 1 = crescita debole; 2 = crescita buona

### Selettività

-La valutazione quantitativa della selettività prevede l'inoculo del terreno selettivo da testare e di un terreno di riferimento non selettivo con diverse diluizioni di un microorganismo non target. Il fattore di selettività ( $S_F$ ) è calcolato come:

$$S_F = D_0 - D_S$$

dove:

$D_0$  = la diluizione più alta che determina crescita sul terreno di riferimento non selettivo

$D_S$  = la diluizione più alta che determina una crescita comparabile sul terreno selettivo da testare

$S_F$ ,  $D_0$  e  $D_S$  sono espressi in unità di  $\log_{10}$

Il  $S_F$  qualora non diversamente specificato nella scheda del terreno, deve avere valore  $\geq 2$ .

-Valutazione qualitativa della selettività: la crescita del microorganismo non target deve essere inibita parzialmente o totalmente nei terreni selettivi testati (se liquidi la torbidità deve essere assente/leggera).

### Specificità

La specificità della reazione prodotta dal microrganismo di riferimento della specificità viene valutata qualitativamente nel terreno da testare

La tabella di seguito riassume i controlli di qualità previsti dalla ISO 11133:2014 per le diverse tipologie di terreni.

| Tipologia di terreno                     | Parametro da testare | Metodo       |             |
|--|----------------------|--------------|-------------|
|  |                      | Quantitativo | Qualitativo |
| Liquido selettivo (per numerazione)      | Produttività         | x            |             |
|  | Selettività          |              | x           |
| Solido selettivo (per numerazione)       | Produttività         | x            |             |
|  | Selettività          |              | x           |
|  | Specificità          |              | x           |
| Liquido selettivo (di arricchimento)     | Produttività         |              | x           |
|  | Selettività          |              | x           |
| Solido selettivo (per ricerca)           | Produttività         |              | x           |
|  | Selettività          |              | x           |
|  | Specificità          |              | x           |
| Solido non selettivo (per numerazione)   | Produttività         | x            |             |
| Liquido non selettivo (di arricchimento) | Produttività         |              | x           |
| Diluenti                                 | Produttività         | x            |             |
| Solido non selettivo (per ricerca)       | Produttività         |              | x           |

Di seguito nel testo, ogni metodo riportato è corredato dalle indicazioni per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014. I microrganismi di riferimento della produttività, della selettività e della specificità sono codificati secondo WDCM (World Data Centre for Microorganisms, <http://www.wfcc.info>). I ceppi contrassegnati con “b” sono da utilizzare obbligatoriamente mentre tra quelli contrassegnati con “d” è sufficiente sceglierne uno.

Per la composizione dei terreni si rimanda alle ISO indicate. Tutti i terreni e reagenti citati sono disponibili in forma commerciale e l'utilizzo si intende a formula completa. Nella scelta dei prodotti commerciali verificare che le composizioni corrispondano a quelle indicate nelle corrispondenti ISO

## Conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati

Secondo la norma ISO 7218 i Laboratori che operano in regime di assicurazione della qualità secondo i principi della norma ISO 17025, per i metodi di conta in piastra possono utilizzare 1 piastra per diluizione quando vengano effettuate almeno due diluizioni successive.

Viceversa, quando venga eseguita soltanto una diluizione o se il Laboratorio non opera in qualità, le tecniche di numerazione devono essere eseguite utilizzando 2 piastre/diluizione tenendo conto di questa differenza procedurale nel calcolo della conta.

Utilizzare piastre con conte comprese tra 10 e 300 colonie.

### Formula generale (conta delle colonie totali o tipiche)

$$N = \sum C/V(n_1+0,1n_2)d$$

dove:

N = numero di colonie (ufc/g o ml)

$\sum C$  = somma delle colonie su tutte le piastre selezionate per la conta

V = volume dell'inoculo in ogni piastra (ml)

n1 = numero delle piastre selezionate alla prima diluizione

n2 = numero delle piastre selezionate alla seconda diluizione

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione selezionata

Arrotondare il risultato a 2 cifre significative.

Esprimere il risultato preferibilmente come un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per la appropriata potenza di 10, oppure come numero intero con due cifre significative. Riportare il risultato come il numero "N" di microrganismi per millilitro (prodotti liquidi ) o per grammo (altri prodotti).

### *Conta delle colonie utilizzando una piastra per diluizione*

#### *Esempio:*

prima diluizione considerata ( $10^{-2}$ ): 168 colonie

seconda diluizione considerata ( $10^{-3}$ ): 14 colonie

inoculo di 1 ml per piastra

$$N = \sum C/V \times 1,1 \times d = 168 + 14/1 \times 1,1 \times 10^{-2} = 182/0,011 = 16\ 545 \text{ da arrotondare ed riportare come } 17\ 000 \text{ oppure } 1,7 \times 10^4 \text{ microrganismi per ml o g}$$

### *Basse conte (1 piastra/diluizione)*

Come riportare il risultato se la piastra seminata con il campione o la sospensione iniziale o la prima diluizione utilizzata contiene meno di 10 colonie

| N° colonie nella piastra alla 1 <sup>a</sup> dil. | Calcolo              | Espressione del risultato                                    |
|---|----------------------|--|
| almeno 4 colonie                                  | $N_s = C/V \times d$ | Numero <u>stimato</u> di microrganismi /g o ml               |
| da 3 a 1 colonia                                  |                      | Microrganismi <u>presenti</u> ma < $4/V \times d$ per g o ml |
| 0 colonie   |                      | Microrganismi < $1/V \times d$ per g o ml                    |

Basse conte (2 piastre/diluizione)

Come riportare il risultato se entrambe le due piastre seminate con il campione o la sospensione iniziale o la prima diluizione utilizzata contengono meno di 10 colonie

| N° colonie in entrambe le piastre alla prima diluizione | Calcolo                                    | Espressione del risultato                                  |
|---|--|--|
| almeno 4 colonie  | $N_s = \frac{\sum C}{V} \times n \times d$ | Numero <u>stimato</u> di microrganismi per g o ml          |
| 0 colonie   |  | Microrganismi <u>inferiori</u> a $1/V \times d$ per g o ml |

dove:

$\sum C$  = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

V = volume dell'inoculo applicato su ciascuna piastra , in millilitri

n = n° di piastre considerato ( in questo caso = 2)

d = fattore di diluizione

Esempio: Il risultato di una conta di 8 e 9 colonie alla prima diluizione considerata ( $10^{-2}$ ) è ottenuto da:  
 $N_s = 8 + 9/1 \times 2 \times 10^{-2} = 17/0,02 = 850$  quindi il numero stimato di microrganismi è 850 oppure  $8,5 \times 10^2$  per ml o g



### **Metodi di calcolo dopo identificazione o conferma (utilizzando 1 piastra per diluizione)**

Quando il metodo richiede una fase di identificazione, occorre procedere alla conferma di un dato numero di colonie presunte o sospette (in genere almeno 5) da ognuna delle piastre considerare per la conta delle colonie.

*Di seguito nel testo con il termine "confermate" verrà indicato il numero di colonie effettivamente confermate su almeno 5 colonie testate/piastra.*

*Con il termine "identificate" verrà indicato il numero di colonie confermate per piastra estrapolato sulla percentuale delle conferme ottenute*

Dopo questo passaggio, il numero "a" di colonie "identificate" (cioè che soddisfano i criteri della fase di conferma) per ciascuna piastra considerata, viene calcolato usando la formula:

$$a = (b/A) \times C$$

dove:

A = n° di colonie sospette sottoposte a identificazione per piastra

b = n° di colonie confermate per piastra

C = n° totale di colonie sospette contate per piastra

Il risultato ottenuto, e corrispondente al numero di colonie identificate per ciascuna piastra considerata, va arrotondato a numero intero.

Il numero N o Ns di microrganismi identificati per ml o g di campione viene quindi calcolato sostituendo nella formula di conta utilizzata il numero C (colonie totali per piastra) con il numero a (colonie identificate per piastra).

|                     | <b>C</b><br><b>Colonie tot sospette<br/>per piastra</b> | <b>A</b><br><b>Colonie sospette<br/>testate per piastra</b> | <b>b</b><br><b>Colonie confermate<br/>per piastra</b> | <b>a</b><br><b>Colonie identificate<br/>per piastra</b> |
|---------------------|---|---|---|---|
| 1 <sup>a</sup> dil. | 66  | 8   | 6   | 50  |
| 2 <sup>a</sup> dil. | 4   | 4   | 4   | 4   |

*Esempio:*

prima diluizione considerata ( $10^{-3}$ ): 66 colonie

seconda diluizione considerata ( $10^{-4}$ ): 4 colonie

inoculo di 1 ml / piastra

Dalla piastra alla prima diluizione vengono testate 8 colonie delle quali 6 vengono confermate. Per proporzione, il numero di colonie identificate su questa prima piastra corrisponde a 50

Dalla piastra alla seconda diluizione vengono testate 4 colonie che vengono tutte confermate. Per proporzione, il numero di colonie identificate su questa seconda piastra corrisponde a 4.

Questi valori ottenuti vengono quindi inseriti nella formula di calcolo, ottenendo:

$$N = \sum a / V \times 1,1 \times d = 50 + 4 / 1 \times 1,1 \times 10^{-3} = 49.090$$

Dopo arrotondamento il numero di microrganismi è 49 000 oppure  $4,9 \times 10^4$  per millilitro o per grammo di prodotto.

## Casi speciali

### 1° caso

|                |                  | Colonie totali per piastra | Presenza colonie tipiche o confermate |
|----------------|------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| d <sub>1</sub> | 10 <sup>-2</sup> | >300                       | si                                    |
| d <sub>2</sub> | 10 <sup>-3</sup> | 33                         | no                                    |

Espressione del risultato: microrganismi per g o ml  $< 1/V_2 \times d_2$  e  $> 1/V_1 \times d_1$  cioè microrganismi  $< 1000$  e  $> 100$  /ml o g di prodotto

### 2° caso

|                |                  | Colonie totali per piastra | Presenza colonie tipiche o confermate |
|----------------|------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| d <sub>1</sub> | 10 <sup>-2</sup> | >300                       | no                                    |
| d <sub>2</sub> | 10 <sup>-3</sup> | 33                         | no                                    |

Espressione del risultato:

microrganismi per g o ml  $< 1/V_2 \times d_2$  cioè microrganismi  $< 1000$ /ml o g di prodotto

Conta delle colonie utilizzando due piastre per diluizione

Per la validità del risultato, si ritiene necessario contare piastre con un numero massimo totale di 300 colonie (numero massimo contabile di colonie tipiche o presunte = 150 / piastra)

### *Esempio:*

prima diluizione considerata (10<sup>-2</sup>): 168 e 215 colonie

seconda diluizione considerata (10<sup>-3</sup>): 14 e 25 colonie

$N = \sum C/V \times 2,2 \times d = 168 + 215 + 14 + 25 / 1 \times 2,2 \times 10^{-2} = 422 / 0,022 = 19.182$  da arrotondare come 19.000 oppure  $1,9 \times 10^4$  microrganismi per ml o g

### Metodi di calcolo dopo identificazione o conferma (utilizzando 2 piastre/diluizione)

Analogamente a quanto sopra descritto per la conta effettuata con una piastra per diluizione, procedere alla conferma di almeno 5 colonie sospette per ciascuna piastra considerata per la conta delle colonie (= totale almeno 20 colonie).

Esempio:

|                     |                  |                        | C                                | A                                    | b                              | a                                |
|---------------------|------------------|------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
|                     |                  |                        | Colonie tot sospette per piastra | Colonie sospette testate per piastra | Colonie confermate per piastra | Colonie identificate per piastra |
| 1 <sup>a</sup> dil. | 10 <sup>-3</sup> | 1 <sup>o</sup> piastra | 66                               | 8                                    | 6                              | 50                               |
|                     |                  | 2 <sup>o</sup> piastra | 80                               | 9                                    | 6                              | 53                               |
| 2 <sup>a</sup> dil. | 10 <sup>-4</sup> | 1 <sup>o</sup> piastra | 4                                | 4                                    | 4                              | 4                                |
|                     |                  | 2 <sup>o</sup> piastra | 7                                | 5                                    | 4                              | 6                                |

I valori ottenuti (a) vengono quindi inseriti nella formula di calcolo, ottenendo:

$$N = \sum a / V \times 2,2 \times d = 50 + 53 + 6 + 4 / 1 \times 2,2 \times 10^{-3} = 51.364$$

Dopo arrotondamento il numero di microrganismi è 51 000 oppure  $5,1 \times 10^4$  per millilitro o per grammo di prodotto.

### Casi speciali

1° caso

|                |                  | Colonie totali per piastra | Presenza colonie tipiche o confermate |
|----------------|------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| d <sub>1</sub> | 10 <sup>-2</sup> | >300                       | sì                                    |
|                |                  | >300                       | sì                                    |
| d <sub>2</sub> | 10 <sup>-3</sup> | 33                         | no                                    |
|                |                  | 35                         | no                                    |

Espressione del risultato:

microrganismi per g o ml  $< 1/V_2 \times d_2$  e  $> d_1 / 1/V_1 \times d_1$  cioè microrganismi  $< 1000$  e  $> 100$  per ml o g di prodotto

2° caso

|                |                  | Colonie totali per piastra | Presenza colonie tipiche o confermate |
|----------------|------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| d <sub>1</sub> | 10 <sup>-2</sup> | >300                       | no                                    |
|                |                  | >300                       | no                                    |
| d <sub>2</sub> | 10 <sup>-3</sup> | 33                         | no                                    |
|                |                  | 35                         | no                                    |

Espressione del risultato:

microrganismi per g o ml  $< 1/V_2 \times d_2$  cioè microrganismi  $< 1000$  per ml o g di prodotto

L'elenco riporta gli schemi di lavoro dei diversi metodi che, nell'ambito della presente pubblicazione, sono prevalentemente intesi per il controllo microbiologico dei prodotti a base di latte delattosato:

- Conta di microrganismi - colonie a 30°C con la tecnica dell'inseminazione in profondità  
ISO 4833-1:2013
- Conta di Stafilococchi coagulasi-positivi (*Staphylococcus aureus* e altre specie). Tecnica che utilizza il terreno agar Baird-Parker  
ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003
- Conta di Stafilococchi coagulasi-positivi (*Staphylococcus aureus* e altre specie).Tecnica che utilizza il terreno agar al plasma di coniglio e al fibrinogeno  
ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003
- Conta delle colonie di *Enterobacteriaceae*  
ISO 21528-2:2004
- Conta di *Pseudomonas spp.* - Campo di applicazione: latte e derivati  
ISO/TS 11059:2009
- Conta dei microrganismi caratteristici dello yogurt (*Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) – Tecnica della conta a 37 °C  
ISO 7889:2003
- Conta dei batteri lattici mesofili – Tecnica della conta a 30 °C  
ISO 15214:1998
- Conta delle colonie di *Escherichia coli* beta-glucuronidasi positivo  
ISO 16649-2:2001
- Conta di *Listeria monocytogenes*  
ISO 11290-2: 1998/Amd 1:2004
- Ricerca di *Listeria monocytogenes*  
ISO 11290-1: 1996/Amd 1:2004
- Ricerca di *Salmonella spp.*  
ISO 6579:2002
- Stabilità microbiologica del latte UHT e sterilizzato
- Schema di lavoro per la rilevazione delle enterotossine stafilococciche di tipo A, B, C, D ed E riferito al metodo dell'EU-RL per gli Stafilococchi coagulasi positivi compreso *S. aureus* (versione 5, 2010)

Gli schemi sono stati realizzati secondo le rispettive norme di riferimento al solo fine di consultazione e non hanno valenza ufficiale. Pertanto non sostituiscono né integrano le norme alle quali l'utilizzatore deve comunque fare riferimento.

Per facilità di lettura, le differenti fasi dei metodi sono schematizzate nella **facciata sinistra** dando risalto alla suddivisione nelle diverse giornate di lavoro.

Queste **sono colorate in maniera diversa** e la stessa colorazione è mantenuta per tutti i metodi (es: per tutti i metodi, le fasi di lavoro della prima giornata sono riportate su campo colore arancio, quelle della seconda giornata su campo giallo e così via).

Nella **facciata destra** le stesse colorazioni sono utilizzate per le note e le indicazioni a corredo delle fasi descritte nella giornata corrispondente (es: una nota contrassegnata con colore arancio si riferisce ad una fase relativa alla prima giornata di lavoro).

## Schema di lavoro riferito alla norma ISO 4833-1:2013 per la conta di microrganismi

### Conta delle colonie a 30 °C con la tecnica dell'inseminazione in profondità

|     |   |
|-----|---|
| 1 g | <p><b>Preparazione della sospensione madre</b> (X g/ml di campione + 9X g/ml di diluente = 10<sup>-1</sup>) e allestimento delle <b>diluizioni successive</b>.</p> <p><b>Semina nella massa</b><br/>Trasferire in ciascuna di 2 piastre Petri 1ml del campione (se liquido) e/o di tutte le diluizioni preparate e aggiungere PCA. Se possibile e appropriato, ridurre la semina alle diluizioni decimali (almeno due consecutive) che possano produrre conte comprese tra 10 e 300 colonie/piastra.</p> <p><b>Incubazione</b> a 30 °C ± 1 °C per 72 h ± 3 h.</p> |
| 2 g |   |
| 3 g |   |
| 4 g | <p><b>Conta delle colonie e calcolo dei risultati</b></p> <p><i>ved. indicazioni generali: conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati</i></p>   |

Versare 12-15 ml di PCA (mantenuto a 44-47°C) per piastra Petri, miscelare accuratamente ruotando le piastre, e lasciar solidificare.

Non lasciar passare più di 45 minuti tra il termine della preparazione della sospensione madre (o della prima diluizione in caso di prodotto liquido) e la piastratura del terreno. In caso si preveda che il prodotto in esame contenga microrganismi con crescita superficiale o che rendano difficile la lettura, effettuare un doppio strato versando circa 4 ml di terreno a 44-47 °C sulla superficie delle piastre solidificate.

Se possibile, limitare la conta alle piastre con meno di 300 colonie. Esaminare le piastre in condizioni di luce soffusa. Esaminare attentamente gli elementi dubbi, eventualmente con l'aiuto di un ingrandimento per distinguere colonie da sostanze estranee. Le colonie diffuse (se coprono meno di un quarto della piastra) vanno considerate colonie singole e sommate a tutte le colonie sulla parte rimanente della piastra.

*Conta delle colonie totali (formula generale), calcolo ed espressione dei risultati: ved. indicazioni generali per i metodi di conta descritti ed espressione dei risultati*

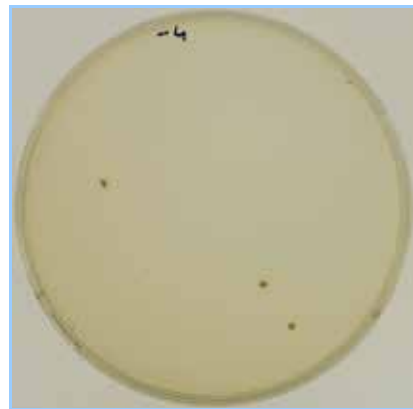
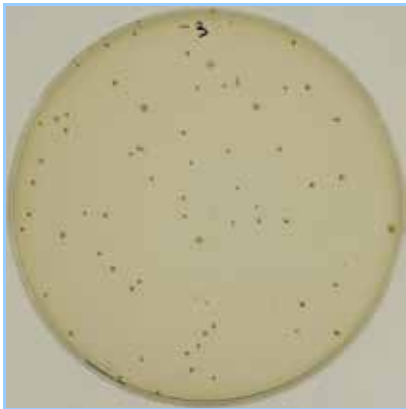
#### Controlli di qualità dei terreni \*

| Terreno      | Parametro    | Ceppi di controllo                                       | WDCM                        | Terreno di riferimento | Incubazione               | Criterio             |
|--------------|--------------|--|-----------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|
| PCA<br>m PCA | Produttività | <i>B. subtilis</i><br><i>subsp.</i><br><i>spizizenii</i> | 00003 <sup>b</sup>          | TSA                    | (72 ± 3) h /<br>(30±1) °C | P <sub>R</sub> ≥ 0,7 |
|              |              | <i>E. coli</i>   | 00012 <sup>b</sup><br>00013 |                        |                           |                      |
|              |              | <i>S. aureus</i>   | 00034                       |                        |                           |                      |

\* ved indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

Conta delle colonie a 30 °C



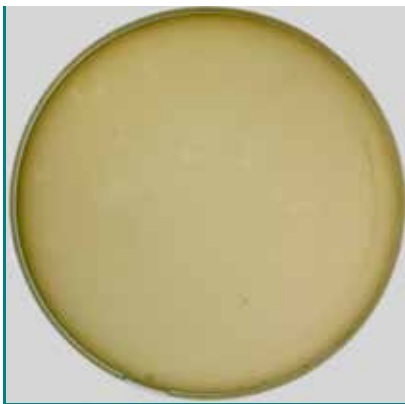


Conta delle colonie su mPCA dopo 72 h di incubazione a 30 °C (diluizioni seminate: da  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ )

Conta delle colonie a 30 °C



Terreno mPCA non inoculato



Terreno mPCA inoculato con latte UHT delattosato mantenuto a 55 °C per 7 giorni (a sinistra) e a 30 °C per 15 giorni (a destra): assenza di crescita microbologica in entrambi i campioni (vedere schema per la stabilità microbologica del latte UHT e sterilizzato)

Conta delle colonie a 30 °C

**Schema di lavoro riferito alla norma ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003  
per la conta di Stafilococchi coagulasi-positivi  
(*Staphylococcus aureus* e altre specie).**

**Tecnica che utilizza il terreno agar Baird-Parker**

|     |   |
|-----|---|
| 1 g | <p><b>Preparazione della sospensione madre</b> (X g/ml di campione + 9X g/ml di diluente = <math>10^{-1}</math>) e allestimento delle <b>diluizioni successive</b>.</p> <p><b>Semina in superficie</b> (terreno Baird Parker) di 0,1 ml del campione di prova (se liquido) oppure della sospensione iniziale (in caso di altri prodotti) e/o delle diluizioni successive preparate.</p> <p><b>Incubazione</b> delle piastre a 35 °C o a 37 °C per 48 h <math>\pm</math> 2 h</p>   |
| 2 g |   |
| 3 g | <p><b>Selezione delle colonie</b><br/>Contrassegnare le colonie tipiche (Cc). Marcare anche tutte le colonie atipiche presenti (Cnc).</p> <p><b>Subcolture in BHI</b><br/>Scegliere 5 colonie atipiche (<i>Anc</i>) e 5 tipiche (<i>Ac</i>) da ogni piastra di due diluizioni successive (=10 prove di conferma /piastra/diluizione) e <i>subcoltarle in altrettante provette contenenti BHI</i></p> <p><b>Incubazione</b> a 37 °C <math>\pm</math> 1 °C per 24 h <math>\pm</math> 2h</p>                                 |
| 4 g | <p><b>Prove di conferma (coagulasi)</b></p> <p>0,1 ml coltura in BHI + 0,3 ml plasma<br/>Incubazione a 37°C <math>\pm</math> 1 per 5 h <math>\pm</math> 1</p> <p><b>Calcolo</b> del numero di stafilococchi coagulasi - positivi identificati per ogni piastra selezionata (<b>a</b>)</p> <p><b>Calcolo</b> del numero di stafilococchi coagulasi - positivi identificati presenti nell'aliquota di prova (<b>N</b>)<br/><i>ved. indicazioni generali: conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati</i></p> |

Per conte basse, i limiti di conta possono essere innalzati di un fattore 10 seminando 1 ml del campione di prova (se liquido) oppure della sospensione iniziale (in caso di altri prodotti ) su 3 piastre

- Colonie tipiche(48h) : diametro di 1,5-2,5mm nere o grigie, lucenti e convesse circondate da evidente alone chiaro che può essere parzialmente opaco , con o senza anello opalescente a contatto con le colonie.
- Colonie atipiche Cnc (48h): diametro 1,5-2,5mm. Nere lucenti, alone assente o chiaro e poco visibile; anello opalescente assente o poco evidente oppure 4 grigie senza alone chiaro.

*Nota: i ceppi di stafilococchi coagulasi positivi isolati da prodotti caseari sviluppano frequentemente colonie atipiche.*

Effettuare la prova della coagulasi (ved. specifiche produttore) aggiungendo anche un controllo negativo (BHI non inoculato). Dopo 4-6h dall'inizio dell'incubazione verificare la formazione di grumi di plasma capovolgendo la provetta. Se la prova è negativa, ripetere l'esame dopo 24 h di incubazione.

Colonie rivelate coag+ (bnc e bc): il volume del grumo occupa più della metà del volume originale del liquido.

| n° di piastre                           | Colonie  | Conta colonie/piastra | N° colonie subcolturate | N° colonie confermate coag+ | N°colonie identificate coag+/piastra | N° stafilococchi coag + identificati /g o ml |
|---|----------|-----------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| n <sub>1</sub><br>(1 <sup>a</sup> dil.) | atipiche | (Cnc)                 | (Anc)                   | (bnc)                       | a <sub>1<sup>a</sup>dil</sub>        | N  |
|   | tipiche  | (Cc)                  | (Ac)                    | (bc)                        |                                      |  |
| n <sub>2</sub><br>(2 <sup>a</sup> dil.) | atipiche | (Cnc)                 | (Anc)                   | (bnc)                       | a <sub>2<sup>a</sup>dil</sub>        |  |
|   | tipiche  | (Cc)                  | (Ac)                    | (bc)                        |                                      |  |

"a" corrisponde al n° di colonie identificate coag + su ciascuna piastra ed è calcolato come:  
 $a = (bc/Ac) \cdot Cc + (bnc/Anc) \cdot Cnc$

"N" corrisponde al n° di stafilococchi coag + identificati presenti per g o ml dell'aliquota di prova ed è calcolato come:  
 $N = \sum a/V(n_1 + 0,1 n_2) d$

*ved. indicazioni generali per i metodi di conta descritti (calcolo dopo identificazione o conferma)*

Conta di Stafilococchi coagulasi positivi su BP

### Controlli di qualità dei terreni \*

| Terreno           | Parametro    | Ceppi di controllo   | WDCM               | Terreno di riferimento | Incubazione                               | Criterio             |
|-------------------|--------------|--|--------------------|------------------------|---|----------------------|
| Baird-Parker (BP) | Produttività | <i>S. aureus</i> <sup>°</sup>  | 00034 <sup>b</sup> | TSA                    | Da (24 ± 2)h<br>a (48 ± 2)h/<br>(37±1) °C | P <sub>R</sub> ≥ 0,5 |
|                   |              |  | 00032              |                        |   |                      |
|                   | Selettività  | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>  | 00012<br>00013     | --                     | (48 ± 2)h/<br>(37±1) °C                   | Inibizione<br>totale |
|                   | Specificità  | <i>S. saprophyticus</i> <sup>b °°</sup><br><i>S. epidermidis</i> <sup>°°</sup> | 00159<br>00036     | --                     | Da (24 ± 2)h<br>a (48 ± 2)h/<br>(37±1) °C | --                   |
| BHI               | Produttività | <i>S. aureus</i>   | 00034              | --                     | 24 ± 2)h/<br>(37±1)                       | Torbidità<br>1-2     |

\* ved indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

Reazione caratteristica su BP:

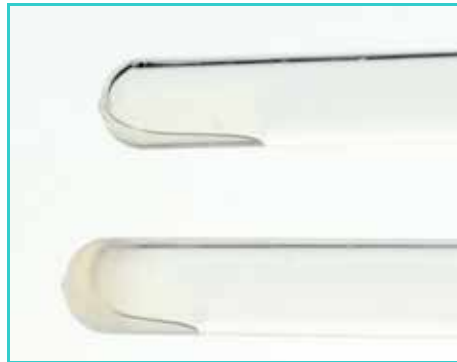
<sup>°</sup> colonie nere o grigie con alone chiaro (chiarificazione dell'egg yolk)

<sup>°°</sup> colonie nere o grigie senza alone chiaro su BP

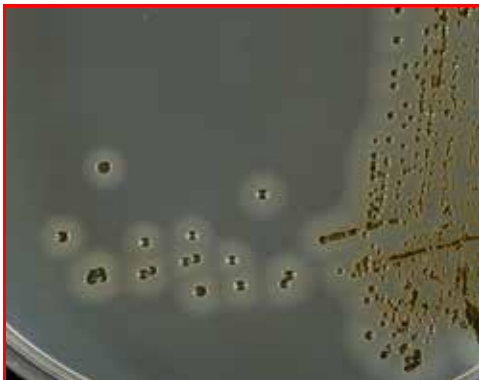
Conta di Stafilococchi coagulasi positivi su BP



*S. aureus* coagulasi positivo su Baird Parker (ISO 6888-1)



Test di conferma della coagulasi (ripresa dopo 5 h di incubazione a 37 °C). Dall'alto: controllo negativo *S. aureus* coagulasi positivo



*S. aureus* coagulasi positivo su RPFA (ISO 6888-2)

**Schema di lavoro riferito alla norma ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003  
per la conta di Stafilococchi coagulasi-positivi  
(*Staphylococcus aureus* e altre specie)**

**Tecnica che utilizza il terreno agar al plasma di coniglio e al fibrinogeno**

1 g

**Preparazione della sospensione madre** (X g/ml di campione + 9X g/ml di diluente =  $10^{-1}$ )  
e allestimento delle **diluizioni successive**.

**Semina nella massa**

Trasferire in ciascuna di 2 piastre Petri 1ml del campione (se liquido) e/o di tutte le diluizioni preparate. Versare immediatamente del terreno agar al plasma di coniglio e al fibrinogeno (RPFA) (3 mm di spessore).

Miscelare accuratamente l'inoculo con il terreno e lasciare solidificare.

**Incubazione** delle piastre a  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  o  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per 18-24 h

2 g

**Conta delle colonie e calcolo dei risultati**

*ved. indicazioni generali: conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati*



- Stafilococchi coagulasi -positivi: Batteri che formano colonie tipiche sulla superficie di un terreno di coltura selettivo e che sviluppano una reazione positiva alla coagulasi, qualora la prova sia effettuata seguendo il metodo specificato nella ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003
- Conta degli stafilococchi coagulasi -positivi: Determinazione del numero di stafilococchi coagulasi -positivi rinvenuti per ml o g di campione, qualora la prova sia eseguita in conformità al metodo specificato dalla ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003

In caso di preparazione in laboratorio, utilizzare il terreno completo appena preparato per evitare l'eventuale precipitazione del plasma.

*Se viene utilizzato un supplemento disponibile in commercio, seguire le istruzioni del produttore per la preparazione dello stesso e del terreno completo (es. temperatura del terreno base).*

La temperatura di incubazione è concordata tra le parti interessate ed è indicata nel rapporto di prova.

Se necessario incubare nuovamente per ulteriori 18h-24h.

Dopo un periodo di incubazione sufficiente gli stafilococchi formano colonie caratteristiche nere o grigie o addirittura bianche di piccole dimensioni, circondate da un alone di precipitazione indicante l'attività della coagulasi. Le colonie di *Proteus* possono mostrare all'inizio dell'incubazione un aspetto simile a quello delle colonie di stafilococchi coag +, comunque dopo 24-48h acquistano l'aspetto di una coltura diffusa di colore più o meno tendente al marrone.

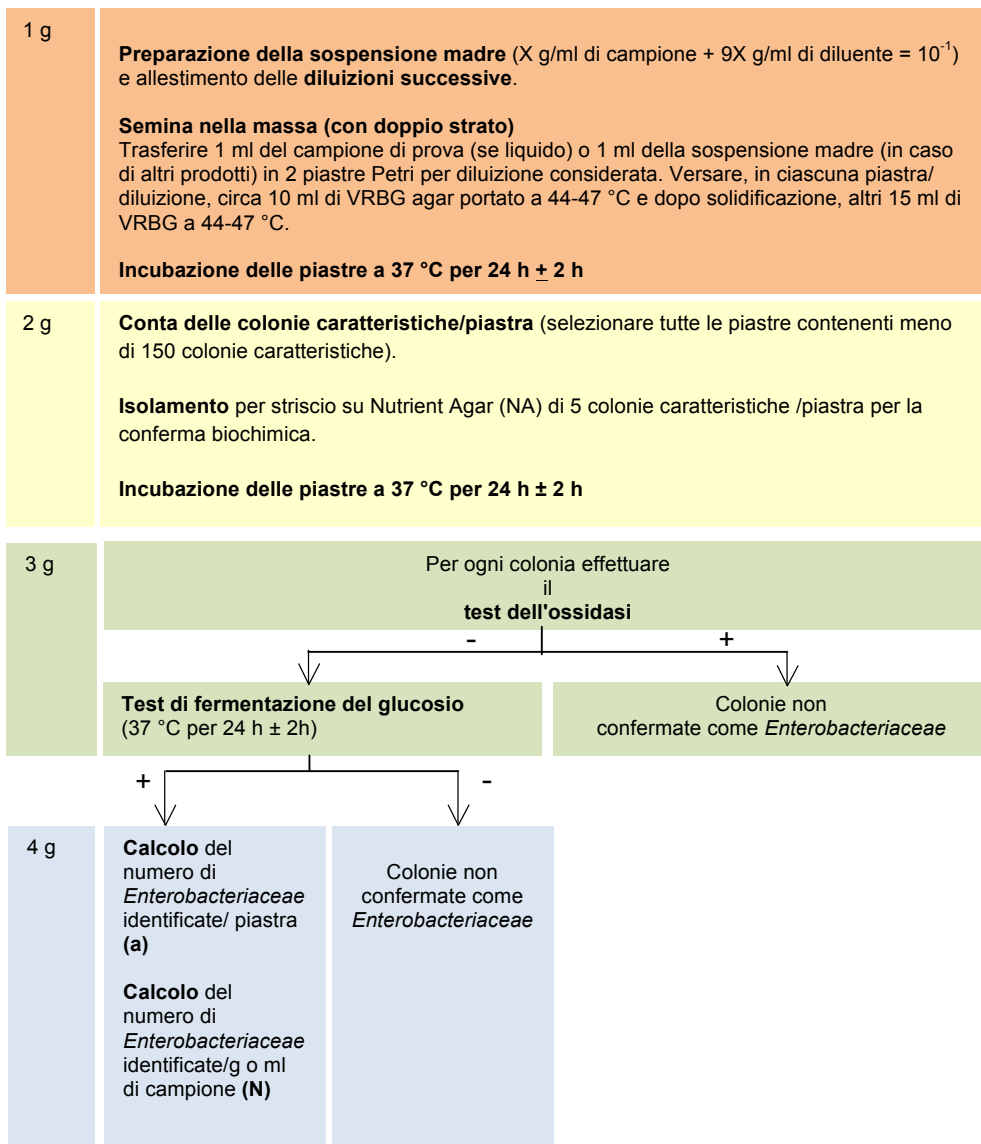
#### Controlli di qualità dei terreni\*

| Terreno | Parametro688 | Ceppi di controllo            | WDCM                        | Terreno di riferimento | Incubazione                              | Criterio  |
|---------|--------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------|--|---|
| RPFA    | Produttività | <i>S. aureus</i> <sup>o</sup> | 00034 <sup>b</sup><br>00032 | TSA                    | Da (24 ± 2)h<br>a (48 ± )h/<br>(37±1) °C | PR ≥ 0,5  |
|         | Selettività  | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>   | 00012<br>00013              | --                     | (48 ± 2)h/<br>(37±1) °C                  | Inibizione totale                                   |
|         | Specificità  | <i>S. saprophyticus</i>       | 00159 <sup>b</sup>          | --                     | Da (24 ± 2)h<br>a (48 ± )h/<br>(37±1) °C | Sviluppo di colonie nere o grigie senza alone opaco |
|         |              | <i>S. epidermidis</i>         | 00036                       |                        |  |   |

\* ved indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

Conta di Stafilococchi coagulasi positivi su BP agar al plasma di coniglio e al fibrinogeno

## Schema di lavoro riferito alla norma ISO 21528-2:2004 per la conta delle colonie di *Enterobacteriaceae*



Conta di *Enterobacteriaceae*

— *Enterobacteriaceae*: microorganismi che su VRBG agar formano colonie caratteristiche da rosa a rosso o porpora (con o senza alone di precipitazione), fermentano glucosio e mostrano una reazione negativa al test dell'ossidasi nelle condizioni specificate dalla norma ISO 21528-2:2004.

Alcune *Enterobacteriaceae* possono presentare colorazione atipica: in assenza di colonie caratteristiche sceglierne 5 di colore biancastro.

Test dell'ossidasi: sono disponibili dischetti pronti all'uso. Si rimanda alle istruzioni del produttore.  
In caso di negatività al test dell'ossidasi procedere al test di fermentazione del glucosio (semina per infissione in Glucose Agar) sul resto della stessa colonia

ved. indicazioni generali: conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati

#### Controlli di qualità dei terreni\*

| Terreno | Parametro    | Ceppi di controllo                   | WDCM                        | Terreno di riferimento | Incubazione               | Criterio             |
|---------|--------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|
| VRBG    | Produttività | <i>E. coli</i> **                    | 00012 <sup>d</sup><br>00013 | TSA                    | (24 ± 2)h/<br>(37 ± 1) °C | P <sub>R</sub> ≥ 0,5 |
|         |              | <i>S. Typhimurium</i> <sup>d**</sup> | 00031                       |                        |                           |                      |
|         |              | <i>S. Enteritidis</i> <sup>d**</sup> | 00030                       |                        |                           |                      |
|         | Selettività  | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup>      | 00009<br>00087              | --                     | (24 ± 2)h/<br>(37 ± 1) °C | Inibizione totale    |

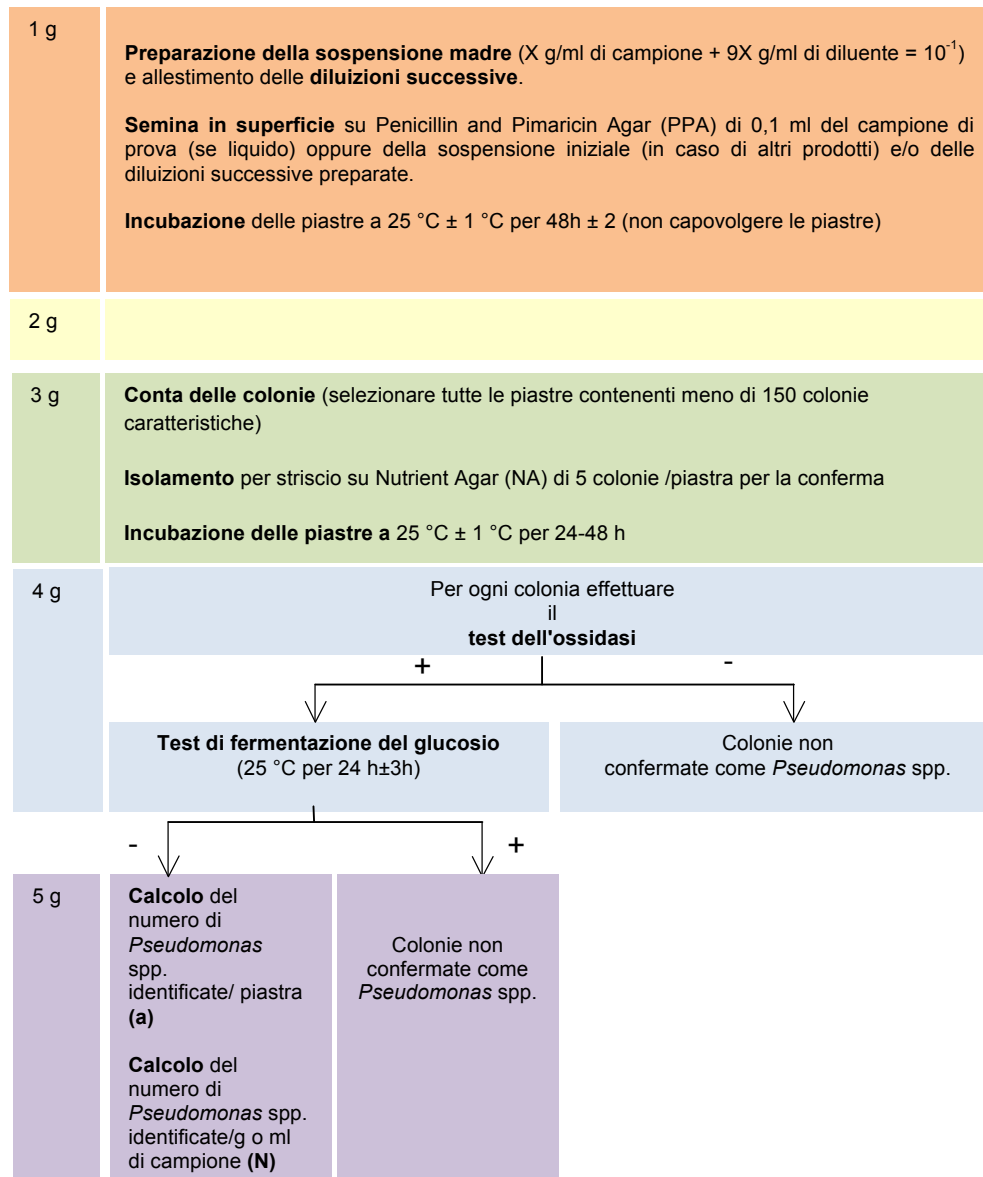
\* ved indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

Reazione caratteristica su VRBG:

\*\* Colonie da rosa a rosso con o senza alone di precipitazione

Conta di *Enterobacteriaceae*

## Schema di lavoro riferito alla norma ISO/TS11059:2009 per la conta di *Pseudomonas* spp.



Conta di *Pseudomonas* spp.

- *Pseudomonas* spp.: specie di batteri del genere *Pseudomonas* che sviluppano colonie sul terreno PPA a 25 °C e che mostrano le caratteristiche biochimiche descritte (colonie ossidasi positive, e negative per la fermentazione del glucosio) nelle condizioni specificate dalla norma ISO/TS 11059:2009

Terreno PPA:

Aggiungere asepticamente al terreno *Pseudomonas* agar base sterile e mantenuto tra 44 °C e 47 °C:

- 0,1 ml di soluzione di Penicillina\* filtrata (conc. finale: 100 000 UI/l)
- 0,1 ml di soluzione di Pimaricina\*\* sterile (conc. finale: 0,01 g/l).

Le piastre possono essere conservate al buio a 5 °C ± 3 °C per non più di 1 giorno.

\*

|  |                    |
|--|--------------------|
| Penicillin G, potassium salt   | 10 <sup>6</sup> UI |
| H <sub>2</sub> O   | 10 ml              |
| Sterilizzare per filtrazione. Conservare a 5 °C ± 3 °C per 1 settimana o a -20 °C per 6 mesi |                    |

\*\*

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Pimaricin (natamycin) | 0,1 g |
| H <sub>2</sub> O      | 10 ml |

Sterilizzare in autoclave a 110 °C per 20 min. Aliquotare e conservare a -20 °C per 6 mesi (altrimenti utilizzare nel giorno di preparazione)

**Test dell'ossidasi:** sono disponibili dischetti pronti all'uso. Si rimanda alle istruzioni del produttore. Il test è considerato positivo quando si osserva viraggio al viola a partire da 5 s ed entro 30 s

**Test di fermentazione del glucosio:** il test è considerato negativo quando in presenza di crescita batterica e dopo opportuna incubazione, non si osserva sviluppo di colorazione gialla all'interno della provetta di Purple Glucose Agar. Alcuni ceppi di *Pseudomonas* possono determinare lo sviluppo di colorazione gialla ma solo sulla superficie dell'agar, per ossidazione del glucosio.

ved. indicazioni generali: conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati

#### Controlli di qualità dei terreni\*

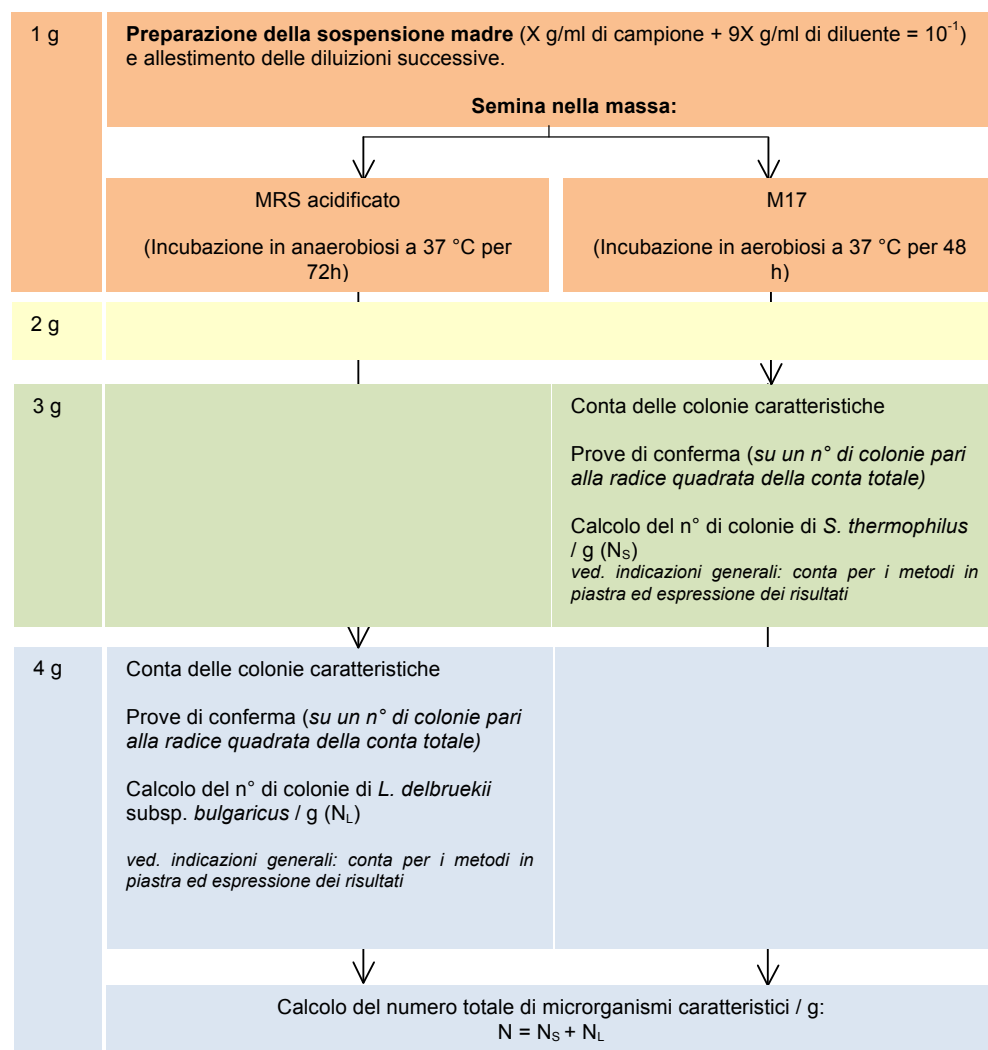
| Terreno | Parametro    | Ceppi di controllo          | WDCM                | Terreno di riferimento | Incubazione             | Criterio             |
|---------|--------------|-----------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| PPA     | Produttività | <i>P. fluorescens</i>       | 00115 <sup>b</sup>  | TSA                    | (48 ± 2)h/<br>(25±1) °C | P <sub>R</sub> ≥ 0,5 |
|         |              | <i>P. aeruginosa</i>        | 00025               |                        |                         |                      |
|         | Selettività  | <i>E. coli</i> <sup>b</sup> | 00012<br>o<br>00013 | --                     |                         | Inibizione totale    |

\* ved indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

Conta di *Pseudomonas* spp.

## Schema di lavoro riferito alla norma ISO 7889:2003 per la conta dei microrganismi caratteristici dello yogurt

### Tecnica della conta a 37 °C



Conta dei microrganismi caratteristici dello yogurt



- *S. thermophilus*: microrganismo termofilo che nelle condizioni specificate nella norma ISO 7889:2003 forma su M17 colonie lenticolari di 1-2 mm di diametro. Al microscopio si presentano come catenelle di cocchi o diplococchi
- *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*: microrganismo termofilo che nelle condizioni specificate nella norma ISO 7889:2003 forma su MRS acidificato colonie lenticolari di 1-3 mm di diametro. Al microscopio si presentano come bastoncelli

Aggiustare il pH del terreno MRS con acido acetico in modo che dopo la sterilizzazione sia  $5,4 \pm 0,1$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Trasferire in ciascuna di 2 piastre Petri 1ml del campione (se liquido) e/o di tutte le diluizioni preparate e aggiungere 15 ml di terreno MRS acidificato (raffreddato a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) / piastra.

Verificare che il pH della base del terreno M17 dopo la sterilizzazione sia  $6,8 \pm 0,1$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aggiungere alla base (raffreddata a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) una soluzione sterile di lattosio al 10 % portata a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  per ottenere il terreno completo con lattosio allo 0,5 %.

Trasferire in ciascuna di 2 piastre Petri 1 ml del campione (se liquido) e/o di tutte le diluizioni preparate e aggiungere 15 ml di terreno M17 completo ( $44-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



In caso di crescita assente o estremamente lenta si raccomandano le seguenti possibili condizioni alternative:



| <i>S. thermophilus</i>   | <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>   |
|--|---|
| Aumento <i>T</i> incubazione (39-42 °C e 45 °C per 24h in aerobiosi) | Aumento <i>T</i> incubazione (40-42 °C e 45 °C per 48 h in anaerobiosi)   |
| Riduzione del contenuto in β-glicerofosfato                          | Incubazione fino a 5-6 gg   |
| Modifica del pH  | Modifica del pH   |
|  | Eventuale utilizzo di LBA a $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 72h in anaerobiosi |

| Prove di conferma | <i>S. thermophilus</i> | <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> |
|-------------------|------------------------|---|
| Gram              | +                      | +   |
| Catalasi          | -                      | -   |
| Spore             | -                      | -   |

Conta dei microrganismi caratteristici dello yogurt



## Schema di lavoro riferito alla norma ISO 15214:1998 per la conta dei batteri lattici mesofili

### Tecnica della conta a 30 °C

|     |  |
|-----|--|
| 1 g | <p><b>Preparazione della sospensione madre</b> (X g/ml di campione + 9X g/ml di diluente = <math>10^{-1}</math>) e allestimento delle <b>diluizioni successive</b>.</p> <p><b>Semina nella massa</b><br/>Trasferire in ciascuna di 2 piastre Petri 1ml del campione (se liquido) e/o di tutte le diluizioni preparate e aggiungere 15 ml di terreno MRS acidificato (raffreddato a <math>47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}</math>) / piastra.<br/><i>Alternativamente si può procedere con la semina in superficie con incubazione in condizioni di anaerobiosi o di microaerofilia</i></p> <p><i>Se possibile e appropriato, ridurre la semina alle diluizioni (almeno due diluizioni decimali consecutive) che possano produrre conte comprese tra 10 e 300 colonie/piastra.</i></p> <p><b>Incubazione a 30 °C per 72 h <math>\pm</math> 3 h.</b></p> |
| 2 g |  |
| 3 g |  |
| 4 g | <p><b>Conta delle colonie e calcolo dei risultati</b><br/><i>ved. indicazioni generali: conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati</i></p>   |

- Batteri lattici mesofili: batteri che a 30 °C sviluppano colonie nel terreno solido selettivo (MRS a pH 5,7) nelle condizioni specificate dalla norma ISO 15214:1998

Aggiustare il pH del terreno MRS in modo che dopo la sterilizzazione sia  $5,7 \pm 0,1$  a 25 °C

Le colonie tipiche si presentano compatte, con aspetto piumoso, piccole, opache e bianche. Su MRS possono svilupparsi anche altri microorganismi diversi dai batteri lattici, pertanto può essere necessario confermare le colonie con colorazione di Gram e con il test della catalasi (i batteri lattici sono Gram + e catalasi -).

#### Controlli di qualità dei terreni\*

| Terreno | Parametro    | Ceppi di controllo          | WDCM               | Terreno di riferimento | Incubazione            | Criterio             |
|---------|--------------|-----------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| MRS     | Produttività | <i>L. sakei</i>             | 00015 <sup>b</sup> | MRS già verificato     | (72 ± 3) h / (30±1) °C | P <sub>R</sub> ≥ 0,7 |
|         |              | <i>L. lactis</i>            | 00016 <sup>d</sup> |                        |                        |                      |
|         |              | <i>P. pentosaceus</i>       | 000158             |                        |                        |                      |
|         | Selettività  | <i>E. coli</i> <sup>d</sup> | 00012              | --                     | (72 ± 3) h / (30±1) °C | Inibizione totale    |
|         |              |                             | o<br>00013         |                        |                        |                      |
|         |              |                             | <i>B. cereus</i>   |                        |                        |                      |

\* ved indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

Conta dei batteri lattici mesofili

## Schema di lavoro riferito alla norma ISO 16649-2:2001 per la conta delle colonie di *Escherichia coli* beta-glucuronidasi positivo

1 g

**Preparazione della sospensione madre** (X g/ml di campione + 9X g/ml di diluente =  $10^{-1}$ ) e allestimento delle **diluizioni successive**.

**Semina nella massa**

Trasferire in ciascuna di 2 piastre Petri 1ml del campione (se liquido) e/o di tutte le diluizioni preparate. Versare circa 15 ml di TBX (raffreddato a 44°C-47°C) in ogni piastra Petri

**Incubazione** a 44°C ± 1°C per 18-24 h (l'incubazione non deve superare le 24 h)

2 g

**Conta delle colonie e calcolo dei risultati**

*ved. indicazioni generali: conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati*

- *Escherichia coli* beta-glucuronidasi positivi: batteri che a 44 °C formano tipiche colonie blu su terreno TBX nelle condizioni specificate dalla norma U ISO 16649-2:2001

Se si sospetta la presenza di cellule stressate pre-incubare per 4 h a 37°C e quindi portare la temperatura di incubazione a 44°C per 18-24 h (non superare i 45°C)

Applicare la formula generale quando almeno una piastra tra quelle destinate alla conta contiene un minimo di 15 colonie blu:

$N = \sum a/V (n_1 + 0,1 \cdot n_2)$  d dove  $\sum a$  = somma delle colonie contate su tutte le piastre di 2 diluizioni successive di cui almeno una contenga 15 colonie blu

#### Controlli di qualità dei terreni\*

| Terreno | Parametro    | Ceppi di controllo              | WDCM   | Terreno di riferimento | Incubazione             | Criterio                      |
|---------|--------------|---------------------------------|--|------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| TBX     | Produttività | <i>E. coli</i>                  | 00012 <sup>d</sup><br>00013 <sup>d</sup><br>00202 <sup>b</sup> | TSA                    |                         | $P_R \geq 0,5$                |
|         | Selettività  | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009<br>00087   | --                     | (21 ± 3)h/<br>(44±1) °C | Inibizione totale             |
|         | Specificità  | <i>C. freundii</i>              | 00006 <sup>b</sup>   | --                     |                         | colonie di colore verde-beige |
|         |              | <i>P. aeruginosa</i>            | 00025  |                        |                         |                               |

*E. coli* WDCM 00013: forte produttore di β-glucuronidasi

*E. coli* WDCM 00201: debole produttore di β-glucuronidasi

\* vedi indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

Conta di *E. coli* beta-glucuronidasi positivo

## Schema di lavoro riferito alla norma ISO 11290-2: 1998/Amd 1:2004

### per la conta di *Listeria monocytogenes*

|     |  |
|-----|--|
| 1 g | <b>RIVITALIZZAZIONE</b>  |
|     | <b>Preparazione della sospensione madre</b><br>(Xg o Xml di campione + 9X g o 9X ml di BPW)<br><br><b>Incubazione</b> a 20 °C ± 2 °C per 1 h ± 5 min |
|     | Allestimento delle diluizioni decimali successive e isolamento su ALOA<br><br><b>Incubazione</b> a 37°C ± 1°C per 24 h ± 3                           |


|     |   |
|-----|---|
| 2 g | <b>Conta delle colonie caratteristiche presuntive su ciascuna piastra</b>   |
|     | <b>Conferma delle colonie selezionate</b><br>(Seguire lo schema per le prove di conferma riportato nello schema per la ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> ) |

Dopo conferma:

**Calcolo del n° di colonie conformi ai criteri di identificazione per piastra (a)**

**Calcolo del n° di *L. monocytogenes* per g o ml di campione (N)**

*ved. indicazioni generali: conta per i metodi in piastra ed espressione dei risultati*



### **Preparazione della sospensione madre**

Quando sullo stesso campione devono essere eseguiti entrambi i metodi (ISO 11290-1 e 2), utilizzare come diluente HALF FRASER BROTH base con la sola aggiunta di ferro (III) ammonio citrato.

Dopo l'allestimento delle diluizioni decimali per la numerazione di *Listeria monocytogenes*, aggiungere alla sospensione madre gli agenti selettivi e procedere con il metodo per la ricerca *Listeria monocytogenes*.

L'uso di questa procedura dovrebbe essere riportata nel rapporto di prova.

### **Isolamento su ALOA**

inoculare 0,1 ml delle diluizioni, per piastra di ALOA, in doppio (spatolare l'inoculo evitando di toccare il bordo della piastra e lasciarlo assorbire per 15' a t. a). Invertire le piastre e incubare.

Per stimare bassi numeri di *Listeria monocytogenes*, distribuire 1.0 ml della sospensione iniziale su una piastra Petri da 140 mm o su tre piastre da 90 mm, in duplicato.



### **Prove di conferma**

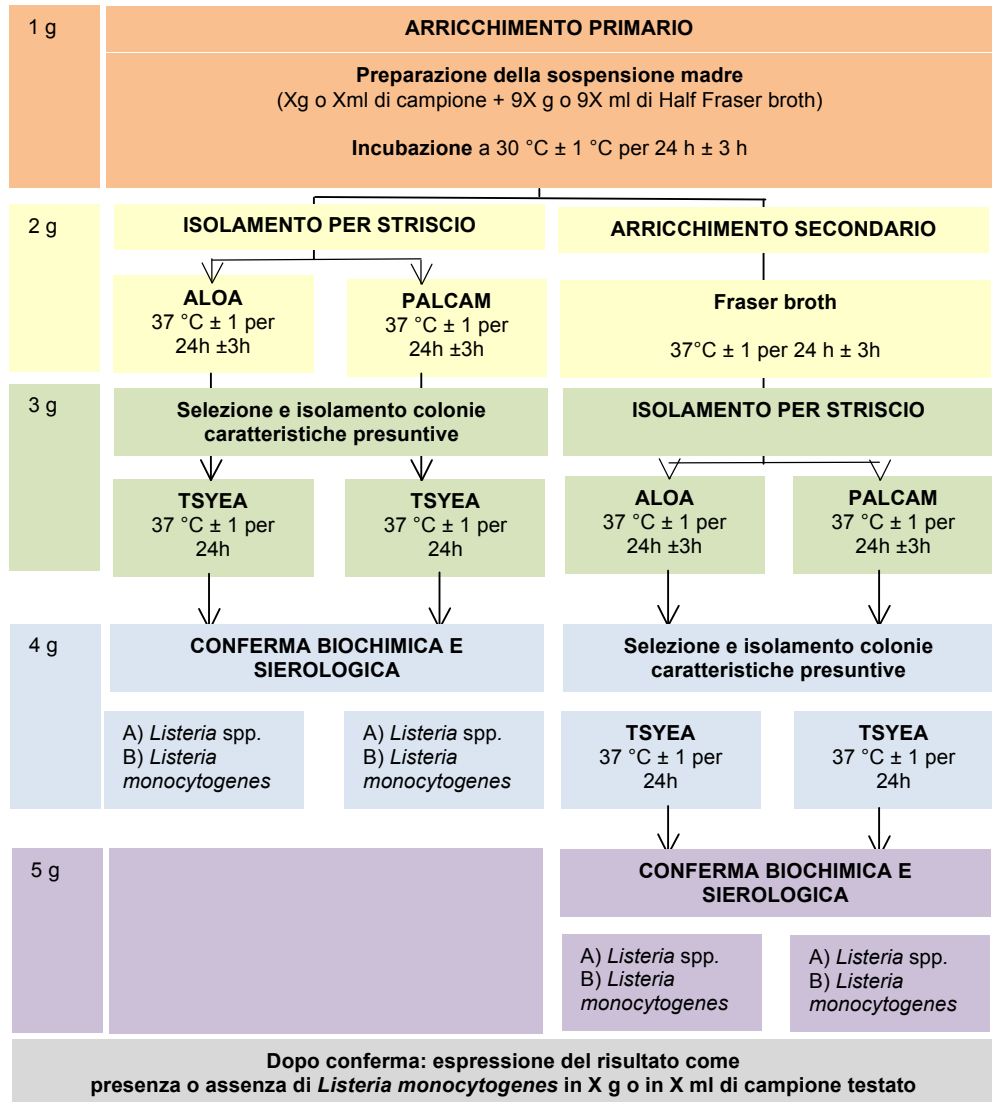
Seguire lo schema per le prove di conferma riportato nella parte per la ricerca di *Listeria monocytogenes*

Selezionare 5 colonie caratteristiche presuntive da ogni piastra considerata per la conta (possibilmente due diluizioni successive).

Se una piastra contiene < di 5 colonie presuntive, selezionarle tutte per la conferma.

## Schema di lavoro riferito alla norma ISO 11290-1: 1996/Amd 1:2004

### per la ricerca *Listeria monocytogenes*



Ricerca di *Listeria monocytogenes*





Arricchimento secondario:  
0,1 ml brodocoltura in 10 ml di Fraser Broth



Il viraggio del Fraser al nero indica l'idrolisi dell'esculina

*L. monocytogenes* su ALOA: (vedi foto)  
colonie verde-blu con alone opaco; alone debole o assente in caso di stress.



*Listeria* spp. su PALCAM: colonie di 1,5-2 mm di diametro, grigio-verdi (24 h) o verdi (48 h), a volte con centro nero (24 h) o con depressione centrale (48 h), ma sempre circondate da alone nero.

*Se necessario incubare per ulteriori 24 h ± 3h*

Nota: ALOA (terreno selettivo primario) e PALCAM (terreno selettivo secondario): è consentito l'uso di terreni con identica formulazione.

Selezionare 5 colonie caratteristiche presuntive da ALOA e PALCAM. Se una piastra contiene meno di 5 colonie presuntive di *Listeria* spp., selezionarle tutte per la conferma dopo isolamento su TSYEA.

*Se necessario incubare per ulteriori 24 h ± 3*



*Listeria* spp. su TSYEA: colonie di 1-2mm di diametro, convesse, incolori, opache e bordo intero.

Eseguire le prove di conferma dalle colonie isolate su TSYEA



Ricerca di *Listeria monocytogenes*



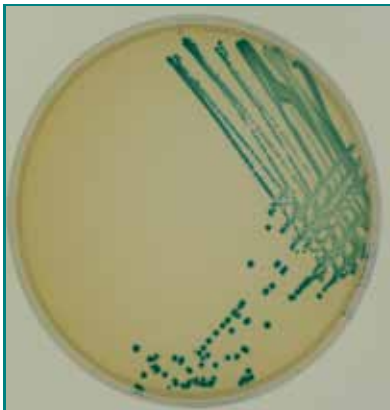
Da sinistra:

**Isolamento di *Listeria ivanovii* e *Listeria monocytogenes* su ALOA**

Colonie tipiche circondate da una zona chiara di precipitazione.

Un componente nella formulazione dell'ALOA è il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucopiranoside, un substrato enzimatico per una  $\beta$ -D-glucosidasi, espressa da tutte le *Listeria* spp. Un secondo substrato, L- $\alpha$ -fosfatidilinositolo, è idrolizzato dalla fosfolipasi C fosfatidil inositolo specifica (PI-PLC), un fattore di virulenza espresso soltanto dalle due specie patogeniche *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii*.

Le foto evidenziano come su ALOA le colonie di *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* siano morfologicamente identiche



**Isolamento di *Listeria innocua* su ALOA**

Colonie tipiche prive di aloni di precipitazione per *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* e *Listeria gray*.

## PROVE DI CONFERMA

(ISO 11290-1: 1996/Amd 1:2004 e ISO 11290-2: 1998/Amd 1:2004)

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>A) CATALASI</b>            | Dispensare una goccia di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> su un vetrino porta oggetti. Stemperarvi 1 colonia prelevata da TSYEA. L'immediato sviluppo di ossigeno gassoso indica una reazione positiva. <i>Listeria</i> spp. è catalasi +.  |
| <b>B) MOTILITÀ</b>            | 1) Trasferire una colonia da TSYEA a TSYEB. Incubare a 25°C per 8-24 h (fino a intorbidimento del terreno). Trasferire una goccia un'ansa su un vetrino da microscopio, coprire con un coprioggetto ed esaminare al microscopio. <i>Listeria</i> spp., <i>bastoncelli</i> mobili.<br>Nota: colture cresciute al di sopra dei 25°C potrebbero perdere la mobilità.<br>Oppure:<br>2) Seminare una colonia per infissione da TSYEA a Motility Agar. Incubare a 25°C per 48 h. La crescita di <i>Listeria</i> spp. intorno al canale di infissione produce un tipico aspetto a ombrello. |
| <b>C) COLORAZIONE DI GRAM</b> | Eeguire la colorazione di Gram su una colonia prelevata da TSYEA. <i>Listeria</i> spp. è Gram+ e di forma bastoncellare.   |



*Listeria* spp. su Motility Agar

## B) Conferma di *Listeria monocytogenes*

|  |   |
|--|---|
| <b>D) EMOLISI</b> (vedi foto)                  | <p>1) Seminare per infissione una colonia prelevata da TSYEA in sheep blood agar. Includere un controllo positivo (<i>L. monocytogenes</i>) e un controllo negativo (<i>L. innocua</i>), incubare a 37°C per 24 h ± 2 h. <i>Listeria monocytogenes</i> mostra caratteristiche di β-emolisi differenti da altre specie emolitiche del genere <i>Listeria</i>.</p> <p>Oppure:</p> <p>2) Trasferire una colonia da TSYEA in 150µl di TSYEB. Incubare a 37°C per 2 h. Aggiungere 150 µl di una sospensione di emazie da sheep blood. Incubare a 37°C per 15'-60', refrigerare a 3°C ± 2 per circa 3 h. Esaminare per l'attività emolitica. Se la reazione non è chiara, rimettere a 3°C ± 2 per altre 3 h.</p>  |
| <b>E) UTILIZZO DEI CARBOIDRATI</b> (vedi foto) | <p>Possono essere utilizzati kit commerciali per la conferma biochimica di <i>Listeria monocytogenes</i> e per l'utilizzo si rimanda alle specifiche del produttore.</p>  |
| <b>F) CAMP TEST</b> (vedi foto)                | <p>Eseguire strisci su agar sangue secondo il modello riportato in figura. Incubare a 37°C per 18-24 h. E' considerata reazione positiva una pronunciata zona di β-emolisi all'intersezione del ceppo test con ognuna delle colture di <i>S. aureus</i> (NCTC 1803 o ATCC 25923) e <i>R. equi</i> (NCTC 1621 o ATCC 6939). Una reazione positiva con <i>S. aureus</i> appare come piccola zona di aumento di emolisi che si estende solo fino a 2 mm dal ceppo test ed entro la debole zona emolitica dovuta alla crescita della coltura di <i>S. aureus</i>; una reazione positiva con <i>R. equi</i> si osserva come un'ampia (da 5mm a 10 mm) punta a freccia di emolisi. La reazione è considerata negativa se una piccola zona di debole emolisi si estende solo fino a circa 1 mm all'intersezione del ceppo test con la zona di diffusione della coltura di <i>R. equi</i>. <i>L. monocytogenes</i> mostra una reazione <i>S. aureus</i><sup>+</sup> e <i>R. equi</i><sup>-</sup> (una sottile zona di emolisi all'intersezione con la coltura di <i>R. equi</i>).</p> |

| Specie                  | Emolisi        | Produzione di acido |         | Camp test        |                |
|-------------------------|----------------|---------------------|---------|------------------|----------------|
|                         |                | Ramnosio            | Xilosio | <i>S. Aureus</i> | <i>R. Equi</i> |
| <i>L. monocytogenes</i> | + <sup>b</sup> | + <sup>a</sup>      | -       | +                | -              |
| <i>L. innocua</i>       | -              | V                   | -       | -                | -              |
| <i>L. ivanovii</i>      | (++)           | -                   | +       | -                | +              |
| <i>L. seeligeri</i>     | (+)            | -                   | +       | (+)              | -              |
| <i>L. welshimeri</i>    | -              | V                   | +       | -                | -              |
| <i>L. grayi</i>         | -              | V                   | -       | -                | -              |

a = Descritti rari isolati di *L. monocytogenes* Ramnosio-negativi

b = Descritti rari ceppi di *L. monocytogenes* non emolitici

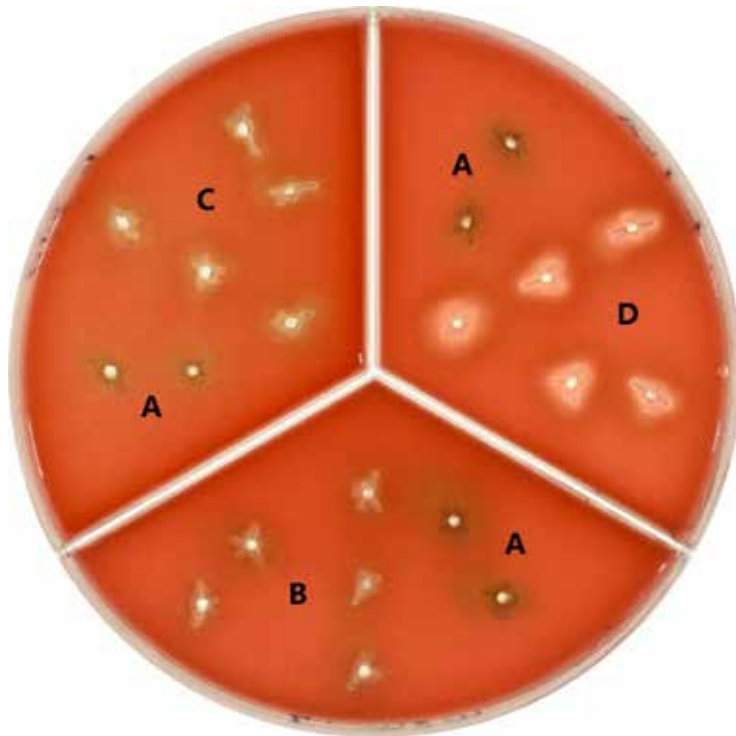
V = REAZIONE VARIABILE

(+) = REAZIONE DEBOLE

(++) = Attività emolitica più forte

+ = POSITIVITÀ > 90%

- = NESSUNA REAZIONE



#### **Particolare dell'attività $\beta$ -emolitica di tre specie del genere *Listeria***

L'emolisi è visibile come zona di chiarificazione intorno al punto di infissione e di lesione del terreno (Columbia Agar con il 5% di sangue di montone).

**A** - *Listeria innocua*: specie non emolitica e non patogena. (controllo A nei tre settori della piastra).

**B** - *Listeria monocytogenes*: l'attività emolitica è dovuta all'azione della proteina listeriolisina (LLO).

**C** - *Listeria seeligeri*: l'attività emolitica è dovuta all'azione della proteina seeligerolisina (SLO). Attività di  $\beta$ -emolisi più debole se comparata alle altre due specie emolitiche, come risultato di una bassa espressione del gene codificante.

**D** - *Listeria ivanovii*: l'attività emolitica è legata all'espressione della proteina ivanolisina (ILO). *L. ivanovii* mostra una  $\beta$ -emolisi più accentuata, per l'espressione di una sfingomielinasi non presente nelle altre specie.



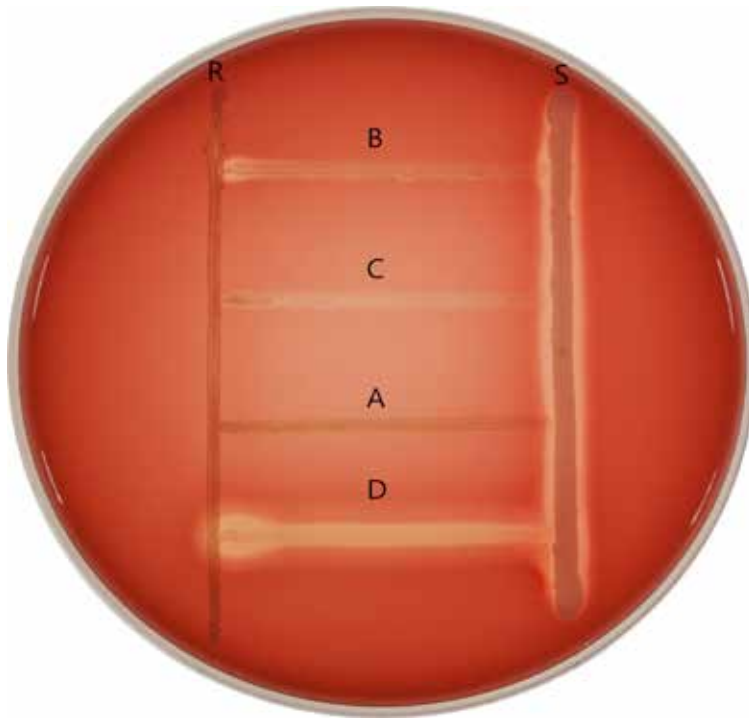
**Listeria spp. - fermentazione dei carboidrati su galleria API Listeria**

Dall'alto:

*Listeria monocytogenes*

Controllo negativo

*Listeria innocua*



***Listeria* spp. - CAMP test**

**R** *Rodococco equi* (ATCC 6939)

**S** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

**B** *Listeria monocytogenes* S<sup>+</sup>/R<sup>-</sup>

**C** *Listeria seeligeri* S<sup>-</sup>/R<sup>+</sup> Visibile una  $\beta$ -emolisi lungo lo striscio ma assenza di emolisi sinergica all'intersezione con i ceppi ATCC

**A** *Listeria innocua* Nessuna attività emolitica

**D** *Listeria ivanovii* S<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>



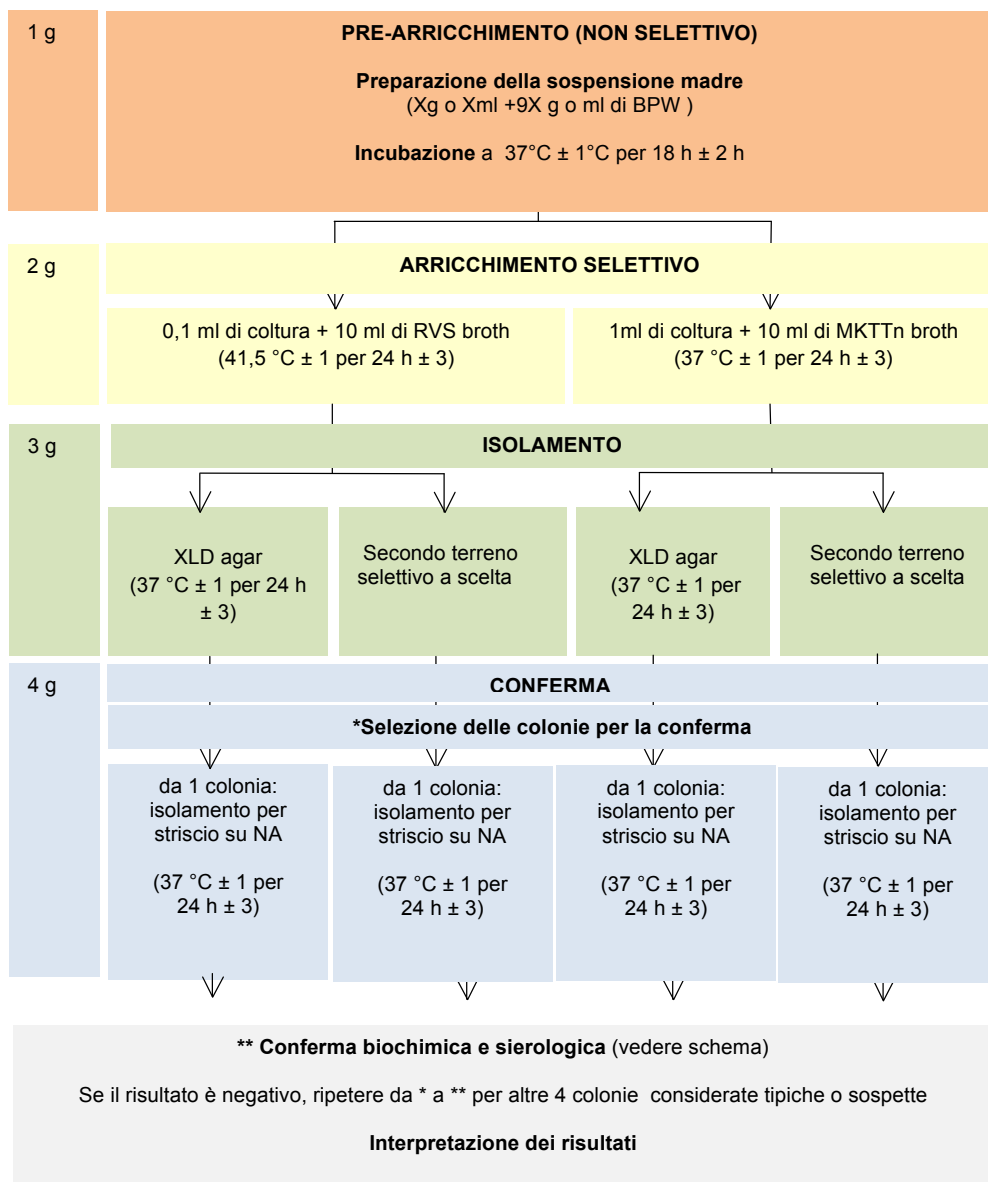
**Controlli di qualità dei terreni \***


| Terreno                      | Parametro                         | Ceppi di controllo              | WDCM                       | Terreno di riferimento       | Incubazione              | Criterio                 |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ALOA ISO (11290-2)           | Produttività                      | <i>L. monocytogenes 4b</i>      | 00021                      | TSA                          | (44 ± 4) h / (37 ± 1) °C | Pr ≥ 0,5                 |
|                              |                                   | <i>L. monocytogenes 1/2a</i>    | 00109                      |                              |                          |                          |
|                              | Selettività                       | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     | 00012<br>00013             |                              |                          | Inibizione totale (0)    |
|                              |                                   | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009<br>00087             |                              |                          |                          |
|                              | Specificità                       | <i>L. innocua</i>               | 00017                      |                              |                          |                          |
|                              | ALOA ISO (11290-1)                | Produttività                    | <i>L. monocytogenes 4b</i> |                              |                          | 00021                    |
| <i>L. monocytogenes 1/2a</i> |                                   |                                 | 00109                      |                              |                          |                          |
| Selettività                  |                                   | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     | 00012<br>00013             | Inibizione totale (0)        |                          |                          |
|                              |                                   | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009<br>00087             |                              |                          |                          |
| Specificità                  |                                   | <i>L. innocua</i>               | 00017                      |                              |                          |                          |
| Fraser                       |                                   | Produttività                    | <i>L. monocytogenes 4b</i> | 00021 <sup>d</sup>           |                          | (48 ± 2) h / (37 ± 1) °C |
|                              | + <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     |                                 | 00012<br>00013             |                              |                          |                          |
|                              | + <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> |                                 | 00009<br>00087             |                              |                          |                          |
|                              | <i>L. monocytogenes 1/2a</i>      |                                 | 00109                      |                              |                          |                          |
|                              | + <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     |                                 | 00012<br>00013             |                              |                          |                          |
|                              | + <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> |                                 | 00009<br>00087             |                              |                          |                          |
|                              | Selettività                       | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     | 00012<br>00013             | Inibizione totale (0) su TSA |                          |                          |
|                              |                                   | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009<br>00087             |                              | < 100 colonie su TSA     |                          |

| Terreno          | Parametro    | Ceppi di controllo                | WDCM                              | Terreno di riferimento | Incubazione                      | Criterio   |  |
|------------------|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------------------------|--|--|
| Half-Fraser      | Produttività | <i>L. monocytogenes 4b</i>        | 00021 <sup>b</sup>                | —————                  | (24 ± 2) h /<br>(30 ± 1) °C      | > 10<br>colonie<br>su ALOA   |  |
|                  |              | + <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     | 00012<br>00013                    |                        |                                  |  |  |
|                  |              | + <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009<br>00087                    |                        |                                  |  |  |
|                  |              | <i>L. monocytogenes 1/2a</i>      | 00109                             |                        |                                  |  |  |
|                  |              | + <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     | 00012<br>00013                    |                        |                                  |  |  |
|                  | Selettività  |                                   | + <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009<br>00087         | —————                            |  |  |
|                  |              |                                   | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>       | 00012<br>00013         |                                  |  |  |
|                  |              |                                   | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup>   | 00009<br>00087         |                                  |  |  |
|                  |              |                                   |                                   | 00012<br>00013         |                                  |  |  |
|                  |              |                                   |                                   | 00009<br>00087         |                                  |  |  |
| TSYEB            | Produttività | <i>L. monocytogenes 4b</i>        | 00021 <sup>b</sup>                | —————                  | (21 ± 3) h /<br>(25 ± 1) °C      | Torbidità<br>(1-2) <sup>f</sup>  |  |
|                  |              | <i>L. monocytogenes 1/2a</i>      | 00109                             |                        |                                  |  |  |
| TSYEA            | Produttività | <i>L. monocytogenes 4b</i>        | 00021 <sup>b</sup>                | —————                  | (21 ± 3) h /<br>(37 ± 1) °C      | Buona<br>Crescita<br>(2)   |  |
|                  |              | <i>L. monocytogenes 1/2a</i>      | 00109                             |                        |                                  |  |  |
| BPW <sup>m</sup> | Diluizione   | <i>E. coli</i>                    | 00012 <sup>b</sup><br>00013       | TSA                    | 45 min – 1 h<br>/20 °C -<br>25°C | ±30 %<br>colonie/<br>T <sub>0</sub> (±30<br>% della<br>conta<br>originale) |  |
|                  |              | <i>S. aureus</i>                  | 00034 <sup>b</sup>                |                        |                                  |  |  |
|                  |              |                                   |                                   |                        |                                  |  |  |


\* ved indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

**Schema di lavoro riferito alla norma ISO 6579:2002  
per la ricerca di *Salmonella* spp. (parte 1)**






Utilizzare il diluente a temperatura ambiente altrimenti, in caso di grandi quantità di campione, portarlo a 37 °C ± 1°C prima dell'utilizzo



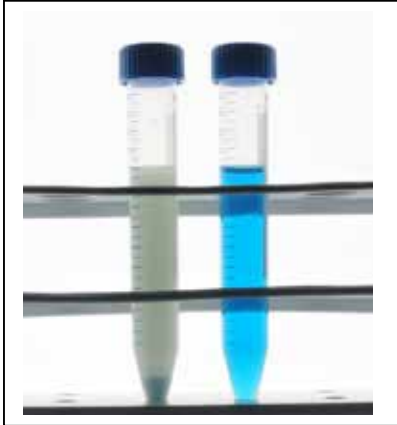
Il secondo terreno selettivo è a scelta del laboratorio tra BGA, bismuth sulfite agar, chromogenic agar etc...



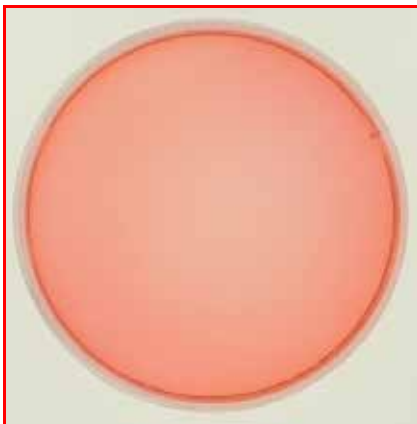
Colonie tipiche su XLD: centro nero e zona trasparente di colore rossastro.  
Varianti H<sub>2</sub>S negative (es.: S. Paratyphi A): rosa con centro rosa più scuro.  
Lattosio +: gialle con o senza annerimento.

Selezionare almeno 1 colonia considerata tipica o sospetta e isolare per striscio su Nutrient Agar (NA). Se su una piastra ci sono meno di 5 colonie tipiche o sospette selezionare tutte le colonie tipiche o sospette presenti.  
In caso di studi epidemiologici si raccomanda di eseguire le conferme a partire da almeno 5 colonie/piastra di NA.

*In caso di positività o di presunta positività inviare il ceppo/ ceppi ad un Centro di Riferimento per Salmonella per la tipizzazione definitiva.*



Terreni non inoculati per l'arricchimento selettivo: MKTn a sinistra e RVS a destra



Terreno XLD non inoculato



*Salmonella* Typhimurium su XLD



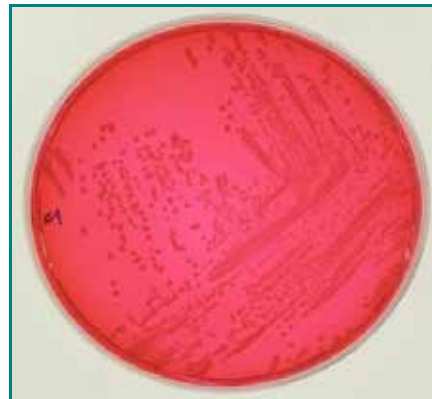
Terreno cromogeno non inoculato



*Salmonella Typhimurium* su terreno cromogeno



Terreno BGA non inoculato



*Salmonella Typhimurium* su BGA

## PROVE DI CONFERMA

### ISO 6579:2002 (parte 2)

#### A) Conferma biochimica

|  |  |
|--|--|
| TSI agar a becco di clarino (37°C ± 1 °C per 24 h ± 3 h) | Colture tipiche di <i>Salmonella</i> : superficie rossa, fondo giallo (acido da glucosio) con formazione di gas. (Nota: <i>Salmonelle</i> lattosio +: superficie gialla). Nel 90 % dei casi si nota annerimento dell'agar per formazione di idrogeno solforato |
| Prove biochimiche differenziali                          | Ureasi, lisina decarbossilasi, β-galattosidasi, produzione di acetoina, produzione di indolo. Per i dettagli vedere EN/ ISO 6579.<br>In alternativa, possono essere utilizzati kit commerciali per il cui utilizzo si rimanda alle specifiche del produttore.  |

#### Interpretazione

|                                  | S. Typhi |     | S. Paratyphi A |     | S. Paratyphi B |   | S. Paratyphi C |   | Altri ceppi |                |
|----------------------------------|----------|-----|----------------|-----|----------------|---|----------------|---|-------------|----------------|
|                                  | reazione | %   | reazione       | %   | reazione       | % | reazione       | % | reazione    | %              |
| TSI acido da glucosio            | +        | 100 | +              | 100 | +              |   | +              |   | +           | 100            |
| TSI gas da glucosio              | -        | 0   | +              | 100 | +              |   | +              |   | +           | 92             |
| TSI acido da lattosio            | -        | 2   | -              | 100 | -              |   | -              |   | -           | 1              |
| TSI acido da saccarosio          | -        | 0   | -              | 0   | -              |   | -              |   | -           | 1              |
| TSI idrogeno solforato           | +        | 97  | -              | 10  | +              |   | +              |   | +           | 92             |
| Idrolisi dell'urea               | -        | 0   | -              | 0   | -              |   | -              |   | -           | 1              |
| Decarbossilazione della lisina   | +        | 98  | -              | 0   | +              |   | +              |   | +           | 95             |
| Reazione della β-galattosidasi   | -        | 0   | -              | 0   | -              |   | -              |   | -           | 2 <sup>a</sup> |
| Reazione di Voges-Proskauer (VP) | -        | 0   | -              | 0   | -              |   | -              |   | -           | 0              |
| Produzione di indolo             | -        | 0   | -              | 0   | -              |   | -              |   | -           | 1              |

a: *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* può dare reazione + o - al lattosio ma è sempre β-galattosidasi +



## B) Conferma sierologica

|   |  |
|---|--|
| 1) Eliminazione dei ceppi autoagglutinanti          | Eeguire 1) e 2) utilizzando una stessa colonia. La fase 2 viene eseguita solo su ceppi NON autoagglutinanti  |
| 2) Ricerca della presenza degli antigeni O-Vi- e H- | In commercio sono disponibili sieri anti-Vi e sieri anti-O e anti-H sia monovalenti che polivalenti. Assicurarsi che la scelta ricada su sieri in grado di garantire l'identificazione di tutti i sierotipi di <i>Salmonella</i> |

### Interpretazione

| Reazioni biochimiche | Auto - agglutinazione | Reazioni sierologiche              | Interpretazione                         |
|----------------------|-----------------------|------------------------------------|---|
| tipiche              | No                    | Positività agli antigeni O, Vi e H | Ceppi considerati <i>Salmonella</i>     |
| tipiche              | No                    | Negatività a tutte le reazioni     | Ceppi presunti <i>Salmonella</i>        |
| tipiche              | Si                    | Non testati                        |   |
| non tipiche          | No/Si                 | Positività agli antigeni O, Vi e H | Ceppi non considerati <i>Salmonella</i> |
| non tipiche          | No/Si                 | Negatività a tutte le reazioni     |   |



Prova di conferma biochimica per l'utilizzazione di 3 zuccheri (lattosio, saccarosio e glucosio) su TSI.

Da sinistra:

Terreno non inoculato

*Salmonella* Enteritidis

*Salmonella* Typhimurium.

*Salmonella* Enteritidis

|              |                                |
|--------------|--------------------------------|
| Fondo giallo | glucosio positivo              |
| Fondo nero   | produzione idrogeno solforato  |
| Slant rosso  | saccarosio / lattosio negativo |

*Salmonella* Typhimurium

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| Fondo nero  | produzione idrogeno solforato  |
| slant rosso | saccarosio / lattosio negativo |



Galleria API 20E non inoculata



Galleria API 20E inoculata con *Salmonella* Typhimurium

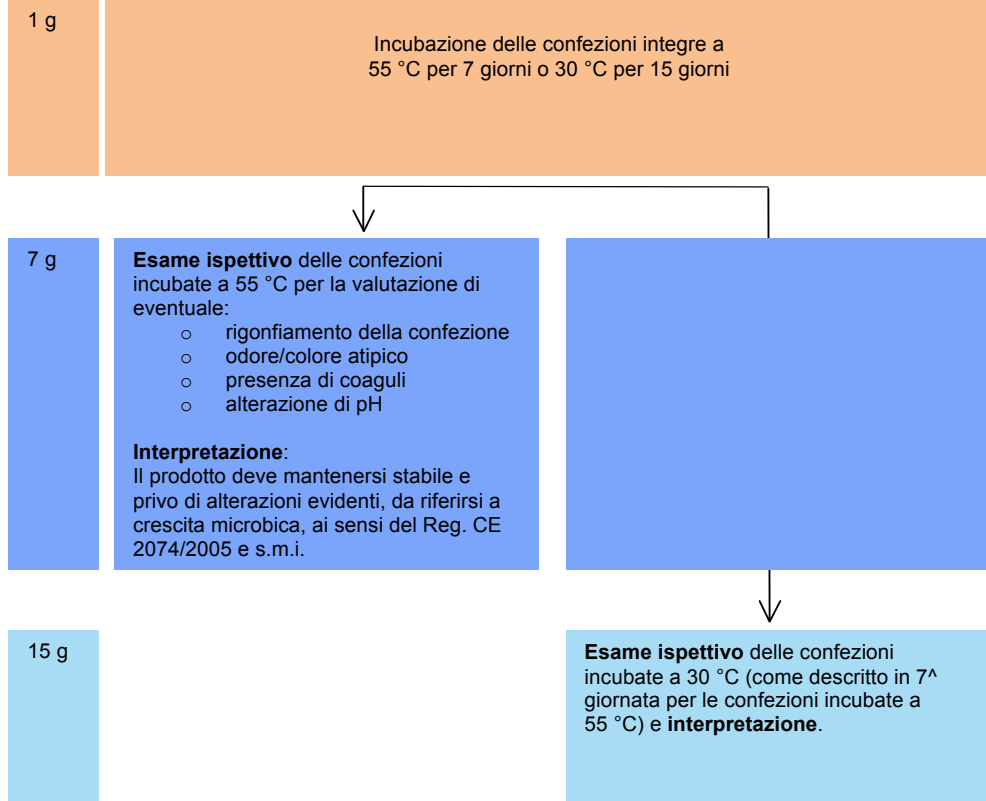
### Controlli di qualità dei terreni \*

| Terreno     | Parametro                       | Ceppi di controllo              | WDCM                | Incubazione                  | Criterio                          |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| BPW         | Produttività                    | S. Typhimurium <sup>d</sup>     | 00031               | (18 ± 2)h /<br>(37 ± 1) °C   | Torbidità<br>(1-2)                |
|             |                                 | S. Enteritidis <sup>d</sup>     | 00030               |                              |                                   |
| MKTn        | Produttività                    | S. Typhimurium <sup>d</sup>     | 00031               | (24 ± 3)h /<br>(37 ± 1) °C   | >10 colonie su XLD/BGA            |
|             |                                 | S. Enteritidis <sup>d</sup>     | 00030               |                              |                                   |
|             | + <i>E. coli</i> <sup>d</sup>   | 00012 o 00013                   |                     |                              |                                   |
|             | + <i>P. aeruginosa</i>          | 00025                           |                     |                              |                                   |
| Selettività | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     | 00012 o 00013                   | ≤100 colonie su TSA |                              |                                   |
|             | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009 o 00087                   | ≤10 colonie su TSA  |                              |                                   |
| RVS         | Produttività                    | S. Typhimurium <sup>d</sup>     | 00031               | (24 ± 3)h /<br>(41,5 ± 1) °C | >10 colonie su XLD/BGA            |
|             |                                 | S. Enteritidis <sup>d</sup>     | 00030               |                              |                                   |
|             | + <i>E. coli</i>                | 00012 o 00013                   |                     |                              |                                   |
|             | + <i>P. aeruginosa</i>          | 00025                           |                     |                              |                                   |
| Selettività | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     | 00012 o 00013                   | ≤100 colonie su TSA |                              |                                   |
|             | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009 o 00087                   | ≤10 colonie su TSA  |                              |                                   |
| XLD         | Produttività                    | S. Typhimurium <sup>d</sup>     | 00031               | (24 ± 3)h /<br>(37 ± 1) °C   | Crescita buona                    |
|             | Selettività                     | S. Enteritidis <sup>d</sup>     | 00030               |                              |                                   |
|             |                                 | <i>E. coli</i> <sup>d</sup>     | 00012 o 00013       |                              | Crescita o parziale<br>inibizione |
|             |                                 | <i>E. faecalis</i> <sup>d</sup> | 00009 o 00087       | Totale inibizione            |                                   |
| NA          | Produttività                    | S. Typhimurium <sup>d</sup>     | 00031               | (24 ± 2)h /                  | Crescita buona                    |
|             |                                 | S. Enteritidis <sup>d</sup>     | 00030               | (37 ± 1) °C                  |                                   |

d = ceppi a scelta (di questi, uno è da utilizzare obbligatoriamente)

\* ved indicazioni generali per i controlli di qualità dei terreni secondo ISO 11133:2014

## Stabilità microbiologica del latte UHT e sterilizzato



Un latte delattosato che dopo incubazione a 55°C per 7 giorni presenti imbrunimento come unica alterazione, deve essere considerato microbiologicamente stabile. La variazione osservata è infatti dovuta alla reazione di Maillard (imbrunimento non enzimatico) e quindi indipendente dalle condizioni microbiologiche del prodotto.

In caso di alterazioni non inequivocabilmente attribuibili a crescita microbica (cioè diverse da: rigonfiamenti della confezione, odore atipico, presenza di coaguli ...) procedere ad idoneo accertamento microbiologico per verificare la sterilità del campione, mediante Conta Batterica Totale (ISO 4833-1).



Campioni di latte UHT delattosato appartenenti allo stesso lotto di produzione.

Dopo incubazione in confezioni integre rispettivamente a 30 °C per 15 giorni (a sinistra) e a 55 °C per 7 giorni (a destra), l'esame ispettivo non ha evidenziato alterazioni attribuibili a crescita microbica.

I due campioni sono stati travasati in contenitori di vetro appositamente per la ripresa fotografica.

Stabilità microbiologica del latte UHT e sterilizzato

**Schema di lavoro per la rilevazione delle enterotossine stafilococciche di tipo A, B, C, D ed E riferito al metodo dell'EU-RL per gli Stafilococchi coagulasi positivi compreso *S. aureus* (versione 5, 2010)**

|     |  |
|-----|--|
| 1 g | <b>Estrazione</b>  |
|     | Prodotti liquidi: miscelare bene il campione e prelevare 25 ml<br>Prodotti solidi: pesare 25 g ± 0,1 g di prodotto e aggiungere 40 ml di H <sub>2</sub> O distillata a 38 °C ± 2 °C. Omogenare e lasciar diffondere la tossina a t.a. per almeno 30 minuti   |
|     | Portare a pH 3,5 – 4,0 con HCl 5N e 1 N facendo attenzione a non scendere sotto 3,0: nel caso, avviare una nuova analisi con altri 25 g di prodotto  |
|     | Centrifugare (3130 g /15 min/ t.a.)  |
|     | Trasferire il surnatante in un becker e verificare che il pH sia < 4,5 altrimenti portare il pH tra 3,5 e 4,0 e ripetere la centrifugazione  |
|     | Neutralizzare il surnatante con NaOH 5N e 1N fino a pH 7,5-8,0 facendo attenzione a non superare 9,0: nel caso, avviare una nuova analisi con altri 25 g di prodotto   |
|     | Centrifugare (3130 g /15 min/ t.a.)  |
|     | Recuperare la fase acquosa neutralizzata   |
|     | Concentrazione per dialisi<br>5 °C ± 3 °C overnight  |
| 2 g | <b>Recupero dell'estratto concentrato</b>  |
|     | <p align="center"><b>Rilevazione immunoenzimatica con Vidas SET2 o Ridascreen SET total</b></p> <p>Conservare l'estratto a 5 °C ± 3 °C se l'analisi è eseguita entro 48 h altrimenti a ≤ - 18 °C per tempi più lunghi.</p> <p>Utilizzare il Vidas SET2 solo per saggi eseguiti immediatamente dopo l'estrazione.</p> |

Rilevazione delle enterotossine stafilococciche

#### Concentrazione per dialisi

Preparare un tubo da dialisi\* di 50-60 cm secondo le istruzioni del produttore e risciacquare internamente ed esternamente con H<sub>2</sub>O distillata.  
Trasferire all'interno del tubo la fase acquosa neutralizzata; assicurare le estremità e trasferire in una vaschetta contenente una soluzione di PEG al 30% (w/v). Lasciare completamente immerso overnight a 5 °C ± 3 °C

\*Membrana da dialisi MWCO: 6000-8000 Daltons; larghezza piatta: 23 mm ± 2 mm (Spectra/Por ref: 132 650, Spectrum)  
Chiusure: l=35 mm (Spectra/Por ref: 132 736 Spectrum)

#### Recupero dell'estratto

Dopo aver sciacquato la parte esterna del tubo con H<sub>2</sub>O distillata per rimuovere le tracce di PEG, recuperare scrupolosamente il contenuto (5,0-5,5 g) sfregando le pareti interne del tubo l'una contro l'altra aiutandosi con movimenti manuali e utilizzando qualche goccia di PBS.

Trasferire l'estratto concentrato in una beuta di vetro.

#### Rilevazione immunoenzimatica

##### Esecuzione Vidas SET2

Determinazione del test value (TV):

$$TV = RFV_{\text{campione}} / RFV_{\text{standard}}$$

Interpretazione:

Presenza di enterotossina A-E in 25 g di campione per  $TV \geq 0,13$

##### Esecuzione Ridascreen SET total

Controllo di qualità a 450/630 nm:

Assorbanza del controllo positivo  $\geq 1,0$

Assorbanza del controllo negativo  $\leq 0,1$

Determinazione del cut-off:

Valore cut-off = Assorbanza del controllo neg + 0,15

Interpretazione:

Presenza di enterotossina A-E in 25 g di campione per Assorbanza del campione  $\geq \text{cut off}$

Rilevazione delle enterotossine stafilococciche

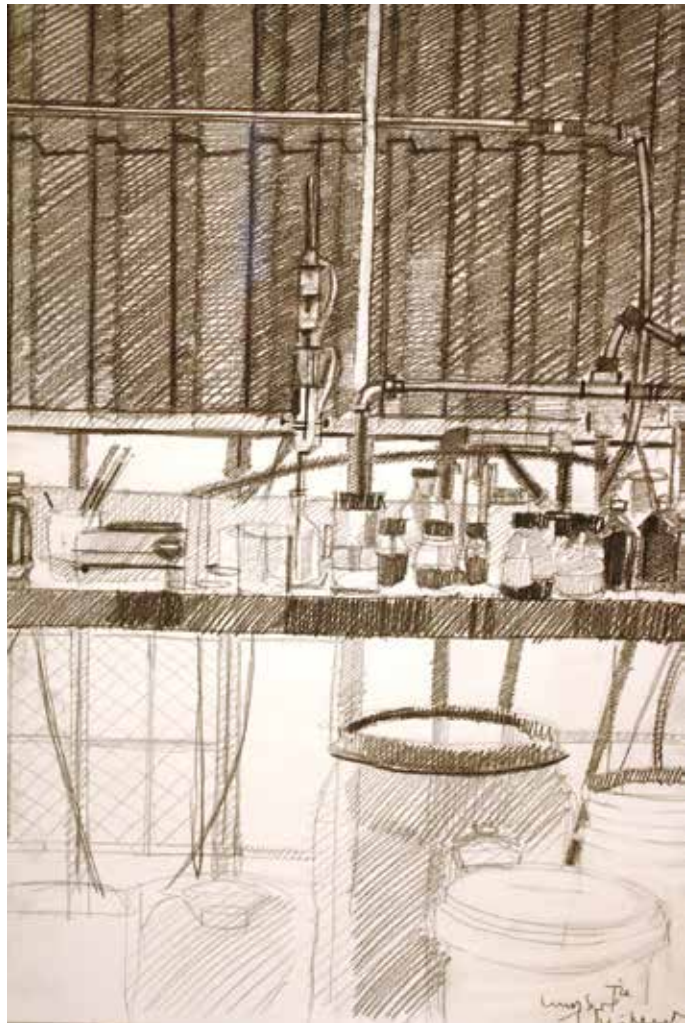


LE IMMAGINI PRESENTI SONO ORIGINALI E DI PROPRIETÀ  
DELL' ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Si ringraziano

Bruno Ballatore, Massimo Delle Femmine, Luigi Nicoletti e Antonio Sesta  
del Settore Attività Editoriali dell'ISS

# APPENDICE



Alla pagina precedente:

JOACHIM SCHÖNFELDT - “*Alchimia*”

Disegno a matita dell'artista nato a Pretoria (Sudafrica) nel 1958

**Biennale Venezia 2015\*\***

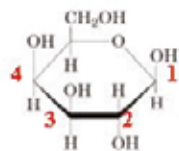


## RIPASSANDO BIOCHIMICA...

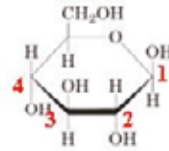


## LATTOSIO

Come è noto, il lattosio è uno zucchero sintetizzato nella ghiandola mammaria grazie al sistema della *lattosio-sintasi*, che lega una molecola di D-galattosio con una di D-glucosio.

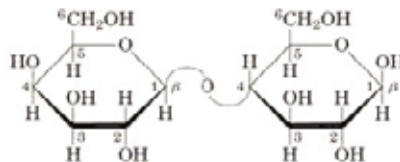


**$\beta$ -D-galattosio**



**$\beta$ -D-glucosio**

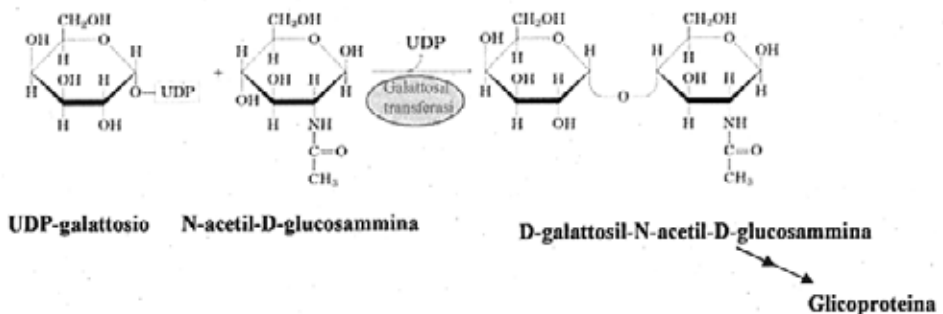
Nella formazione del lattosio, si realizza un legame fra l'OH in posizione 1 del galattosio e l'OH in posizione 4 del glucosio, con eliminazione di una molecola di H<sub>2</sub>O.



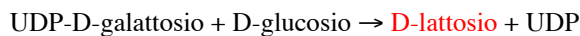
**Lattosio forma  $\beta$**



La **produzione del lattosio** avviene dunque nella ghiandola mammaria solo durante la lattazione. L'enzima coinvolto nella biosintesi, la **galattosio-transferasi**, è presente in tutti i tessuti dell'organismo, in cui di solito catalizza una reazione che non porta a formazione di lattosio, ma di glicoproteine, come si vede nello schema seguente:



La **galattosio-transferasi** trasferisce le unità di galattosio dell'UDP-galattosio (forma attiva del galattosio) al glucosio, producendo lattosio.



In questa reazione l'enzima prende il nome di **lattosio-sintasi**. L' **$\alpha$ -lattalbumina** è, invece, una sub-unità che modifica la specificità della lattosio-sintasi; la sua formazione nella ghiandola mammaria, regolata dall'ormone che promuove la lattazione, porta alla creazione di un complesso  **$\alpha$ -lattalbumina-galattosil-transferasi**, cioè della lattosio-sintasi. Lo schema seguente mostra la reazione che avviene nella ghiandola mammaria.



Contenuto di lattosio nel latte di alcune specie di mammiferi d'allevamento:

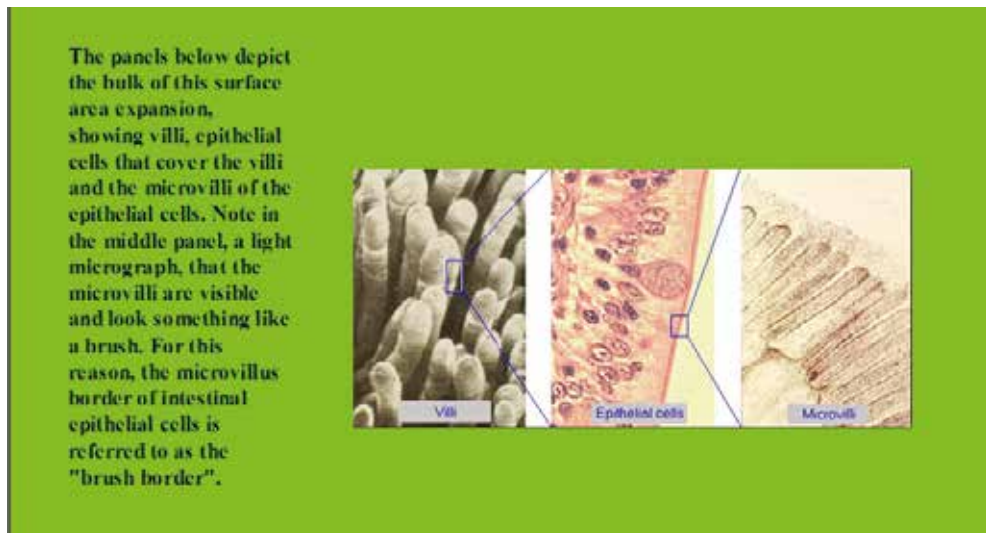
DONNA 7.0 g/100 ml; ASINA 6.2 g/100 ml; CAVALLA 6.0 g/100 ml; LAMA 5.3 g/100 ml; MUCCA 4.6 g/100 ml; PECORA 4.4 g/100 ml; CAPRA 4.4 g/100 ml; CAMMELLO 4.1 g/100 ml; SUINO 4 g/100 ml; RENNA 2.4 g/100 ml; CONIGLIA 1.8 g/100 ml.



### *Come viene demolito il lattosio nell'intestino*

Una volta prodotto, il lattosio per poter essere utilizzato come fonte energetica deve essere idrolizzato, cioè scisso nei due monosaccaridi costituenti.

Questo processo avviene sulla superficie esterna delle cellule epiteliali che rivestono l'intestino tenue.



(da [www.morothery.co.uk](http://www.morothery.co.uk))

La scissione avviene con l'intervento di almeno tre enzimi: **lattasi**; **lattosio-permeasi**; **transacetilasi**.

### *Lattasi*

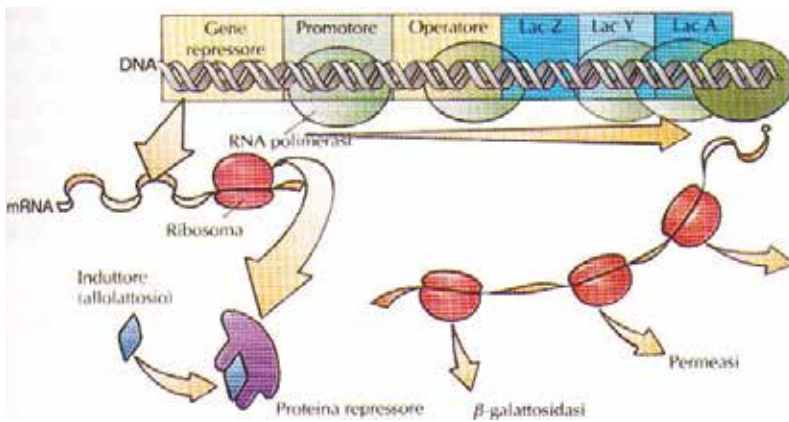
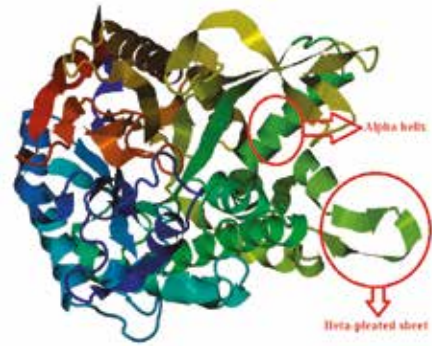
La lattasi è una proteina che agisce da enzima. Gli enzimi sono sostanze chimiche che velocizzano i processi biologici. Viene usualmente prodotta da quasi tutti gli individui, ad ecce-



zione di quelli che non la sintetizzano a sufficienza nelle cellule che tappezzano il lume dell'intestino tenue.

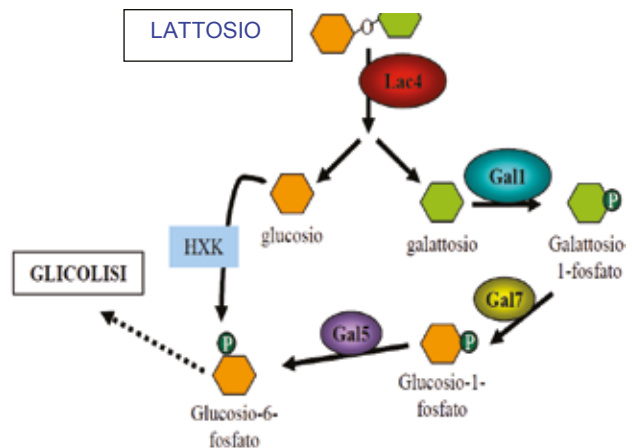
Queste cellule assorbono i nutrienti nel tratto intestinale. Il gene responsabile della produzione della lattasi è denominato LCT ed è collocato sul cromosoma 21.

Danni a questo gene possono compromettere la produzione o la funzione della lattasi, che è quella di "spezzare" le molecole di lattosio, uno zucchero non assorbito dall'intestino se prima non viene ridotto a molecole più piccole. Senza lattasi, il lattosio rimane nel tratto digestivo e non può essere usato dall'organismo (da <http://livestrong.com>).



Le unità monosaccaridiche così formate sono trasportate dentro le cellule che rivestono l'intestino, da cui passano nel sangue per raggiungere il fegato. In questo tessuto vengono fosforilate, cioè convertite in una forma ad elevata energia che viene incanalata nella via glicolitica.

La cellula assume il lattosio grazie all'attività della permeasi Lac12; la  $\beta$ -galattosidasi Lac4 scinde lo zucchero in glucosio e galattosio. Il glucosio viene fosforilato dall'esochinasi (HXK) ed entra nella via glicolitica come glucosio-6-fosfato; il galattosio viene prima fosforilato, poi convertito in glucosio-1 fosfato (in una reazione che impiega UDP-glucosio e libera UDP-galattosio) e infine in glucosio-6-fosfato. Il glucosio-6-fosfato così prodotto entra infine nella via glicolitica.

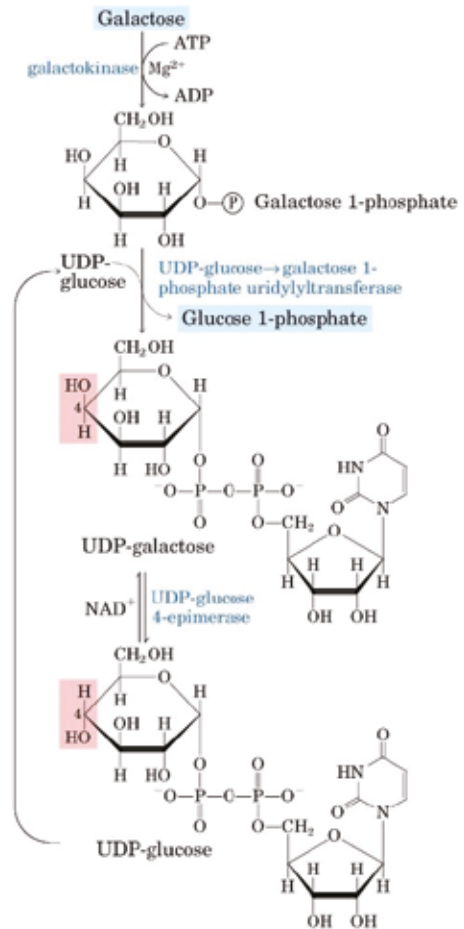
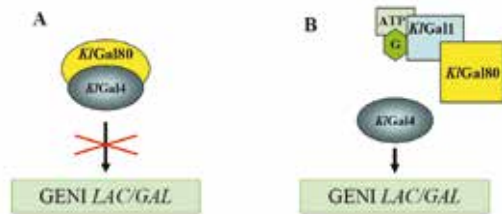




Mentre il glucosio viene fosforilato ed inserito direttamente, il galattosio deve prima essere convertito in glucosio, secondo le reazioni di seguito schematizzate:

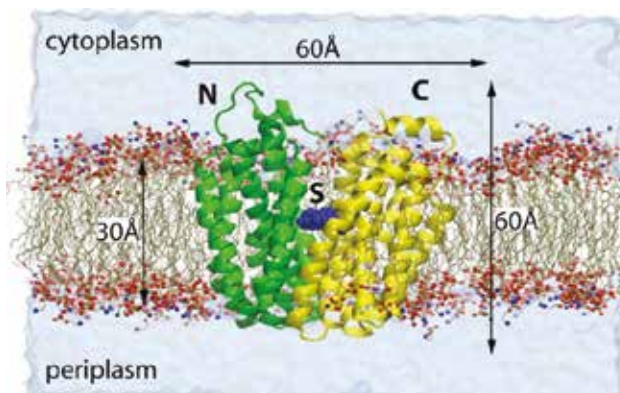
- 1) galattosio + ATP  $\rightarrow$  galattosio-1-fosfato + ADP ad opera della **galattochinasi**
- 2) galattosio-1-fosfato + UDP-glucosio  $\rightarrow$  UDP-galattosio + **glucosio-1-fosfato** ad opera della **UDP-glucosio:galattosio-1-fosfato uridiltrasferasi**
- 3) UDP-galattosio  $\rightarrow$  UDP-glucosio ad opera della **UDP-glucosio 4-epimerasi** con intervento del NAD<sup>+</sup>

Il galattosio subisce ulteriori trasformazioni. In presenza di galattosio e ATP nelle cellule, il gene *K/Gal1* si lega a *K/Gal80*, che altrimenti bloccherebbe il gene *K/Gal4*, impedendo l'espressione dei geni *LAC/GAL*, responsabili della reazione di assorbimento del galattosio.



### Lattosio-permeasi

Le molecole di mono- e di-saccaridi possono essere trasportate essenzialmente attraverso due sistemi di trasporto, denominati **PEP-PTS** e **sistema Permeasico**.

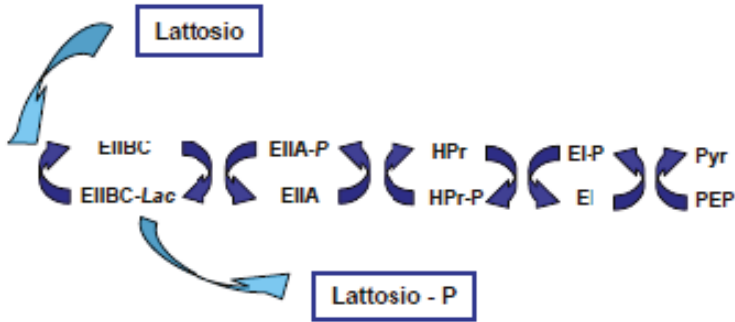


(Struttura della lattosio-permeasi, da Kabac, 2005)

La stessa molecola può essere trasportata attraverso il sistema PEP-PTS oppure attraverso il sistema Permeasico. Analogamente, alcuni zuccheri vengono trasportati attraverso il sistema PEP-PTS, mentre altri mediante il sistema Permeasico.

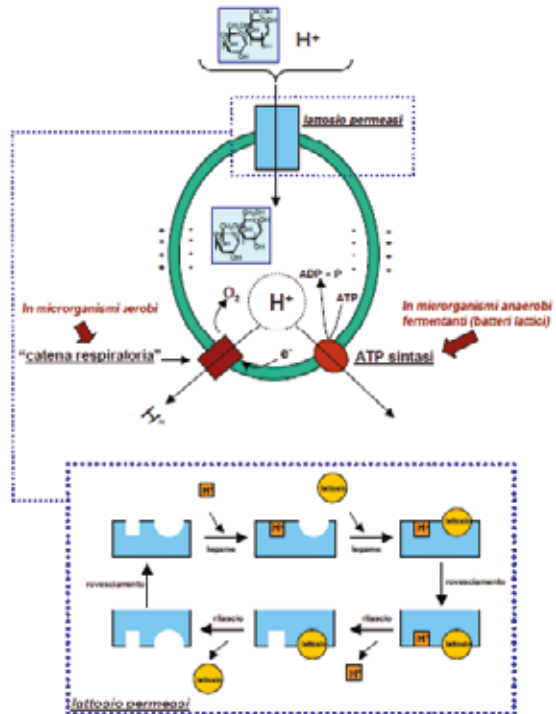
**SISTEMA PEP-PTS PER IL TRASPORTO DEL LATTOSIO**

Il legame fosfato ad alta energia nel fosfo-enol-piruvato è trasferito sequenzialmente da EI a Hpr, EIIA (tutti a livello citoplasmatico e non specifici per il lattosio), EIIB e EIIC (entrambi sulla membrana e specifici per il lattosio) e infine al lattosio. Il lattosio viene quindi trasportato nel citoplasma cellulare come **lattosio-fosfato (lattosio-P)**.

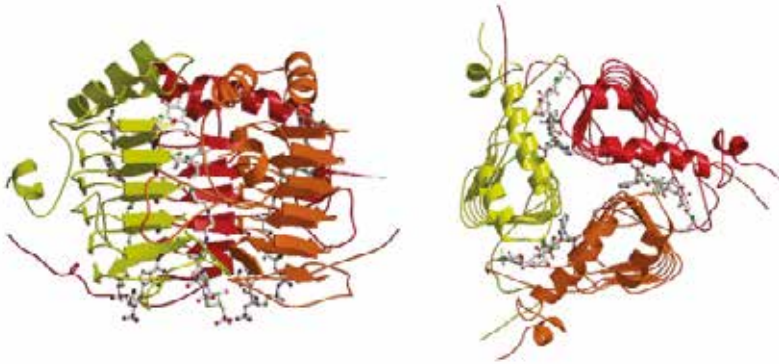


**SISTEMA PERMEASICO PER IL TRASPORTO DEL LATTOSIO**

Il lattosio trasporta con sé un H<sup>+</sup> attraverso una permeasi specifica per il disaccaride. Una volta all'interno della cellula, a causa di un cambiamento di conformazione della permeasi, lattosio e H<sup>+</sup> vengono rilasciati nel citoplasma.



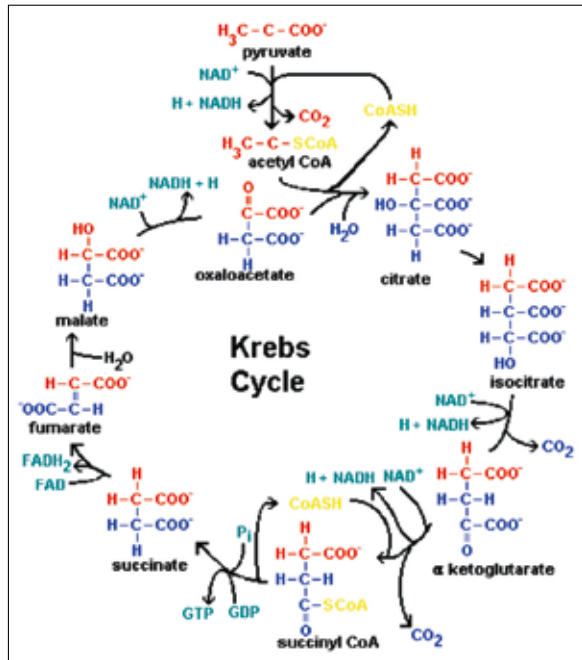
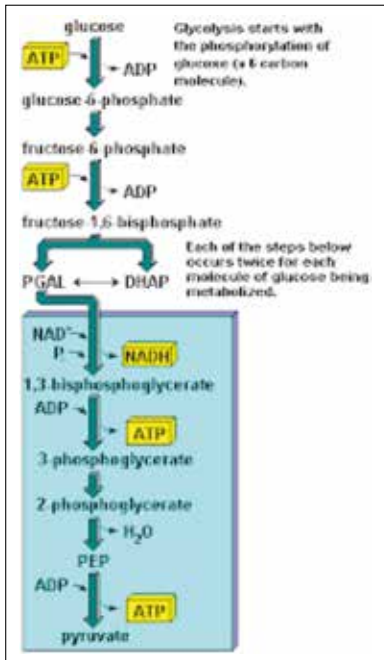
## Transacetilasi



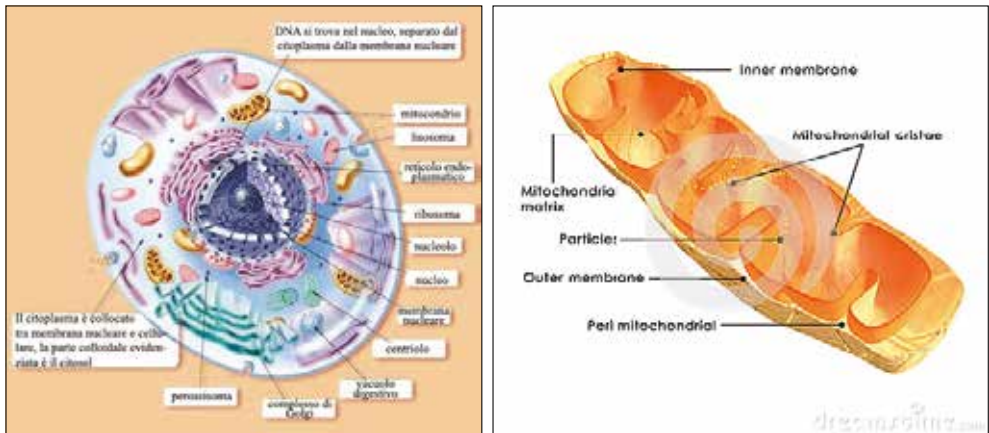
(Struttura della transacetilasi, da Roderick, 2005)

Questo enzima aggiunge gruppi acetilici al lattosio, quando entra nella cellula e partecipa alla glicolisi. Ciascun gruppo acetilico, contenente due atomi di carbonio, si lega a un coenzima, formando un composto denominato acetil-coenzima-A. Le reazioni che seguono si inseriscono nel ciclo di Krebs per produrre energia dal metabolismo dei carboidrati.

## ACETIL-COENZIMA-A



Glicolisi (anaerobia) nel citoplasma. Reazioni del ciclo di Krebs (aerobie) nei mitocondri.

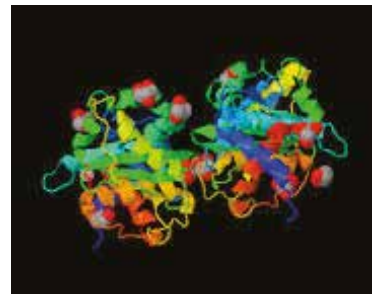


Schema del citoplasma di una cellula (a sinistra) e struttura di un mitocondrio (a destra).

## GLI ENZIMI DELLA DEMOLIZIONE DEL LATTOSIO PRESENTI NEL LATTE

Nel latte, indipendentemente dalla specie che lo produce, si trova un elevato numero di enzimi (fino a 60), riconducibili a lipasi, proteasi, perossidasi, xantina ossidasi, lisozima, amilasi, **idrolasi**. Appartengono alle idrolasi tutti i fermenti della digestione intestinale dei grassi, delle proteine e dei **carboidrati**, e gli **enzimi intracellulari** dei **lisosomi**.

Le idrolasi vengono suddivise, in rapporto al tipo di substrato su cui agiscono, in: peptidiche, che catalizzano la scissione del legame peptidico; glucosidiche, che operano la scissione dei **glucosidi**; **esterasi carbossiliche**, che scindono gli esteri degli acidi carbossilici; **fosfatasi**, che idrolizzano gli esteri dell'acido fosforico; **pirofosfatasi**, attive sull'acido pirofosforico e sui suoi esteri; amminoidrolasi, che scindono le **ammine** in ammoniaca e idrossi-composti; ammidoidrolasi, che provocano la scissione idrolitica delle **ammidi**.



*Cosa sanno fare certi microrganismi sul lattosio...*

La fermentazione del lattosio è possibile solo da parte di quei microrganismi che sono in grado di produrre sia il trasportatore di membrana **lattosio-permeasi** (codificato dal *gene LAC12*) sia l'enzima  **$\beta$ -galattosidasi** (*LAC4 gene*), che idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio. In laboratorio la ricerca a scopo diagnostico di questa proprietà viene fatta con il *test* della Beta-galattosidasi.

## IN VITRO...



### RICERCA IN LABORATORIO DELLA BETA-GALATTOSIDASI (TEST ONPG)

La fermentazione del lattosio è uno dei *test* classici per l'identificazione di molti microrganismi. La metodica abituale si basa sulla dimostrazione della produzione di acido dopo che il disaccaride è stato scisso in glucosio e galattosio dall'enzima beta-galattosidasi. È tuttavia necessario che il lattosio possa penetrare all'interno della cellula, grazie all'azione di una specifica permeasi, affinché la scissione possa avvenire.

Il *test* ONPG permette di mettere in evidenza la presenza dell'enzima beta-galattosidasi indipendentemente dalla presenza dell'enzima permeasi. In altre parole, è possibile distinguere i lattosio fermentanti lenti (che possiedono la beta-galattosidasi) dai non fermentanti il lattosio (che non possiedono la beta-galattosidasi).

Il reattivo utilizzato è il galattoside sintetico Orto-Nitro-Fenil- $\beta$ -D-Galattopiranoside (ONPG) che non necessita di permeasi per penetrare nella cellula e che viene idrolizzato dai microrganismi come il lattosio.

Poiché il gruppo orto-nitrofenolo è cromogenico, quando l'ONPG viene scisso in soluzione alcalina si forma una soluzione gialla (da <http://trucheck.it/biologia>).





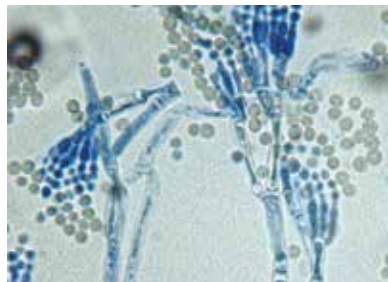
E IN VIVO...

### **Microrganismi, lattosio e Gorgonzola**

*Quando i batteri lattici (e il *Penicillium roqueforti*) fanno la differenza creando un prodotto "lactose-free".*

Nel formaggio Gorgonzola DOP il **lattosio è consumato dai microrganismi lattici** nel corso della fermentazione che accompagna il processo di caseificazione. Il Gorgonzola DOP, correttamente stagionato, **non ne contiene che tracce** o quantitativi estremamente ridotti: Si tratta dunque di un formaggio di norma **molto ben tollerato anche da chi presenta difficoltà a digerire questo zucchero** ([www.gorgonzola.com](http://www.gorgonzola.com)).

La nascita di questo formaggio (a pasta molle, bianca, con venature verdastre) viene fatta risalire all'anno 879, nella zona di Gorgonzola, alle porte di Milano, anche se qualcuno la colloca a Pasturo, in Valsassina. La città di Gorgonzola rimase comunque il centro di produzione di quel formaggio, chiamato "Stracchino di Gorgonzola" o "Stracchino verde".



La leggenda narra che il Gorgonzola sia stato prodotto per sbaglio da un casaro distratto che, per correre dall'amata, lasciò la cagliata fresca appesa a un gancio in una cantina umida. Il giorno seguente, per riparare all'errore, aggiunse la cagliata fresca del mattino. Assaggiando il formaggio ottenuto, lo trovò ottimo e quell'errore fece la sua fortuna.



Oggi la produzione del Gorgonzola DOP (*Denominazione di Origine Protetta*) è ammessa nelle provincie illustrate nella cartina e si realizza con latte bovino pastorizzato con aggiunta di fermenti lattici che conferiscono le caratteristiche venature. La stagionatura si protrae per almeno 50 giorni per il tipo dolce ed oltre 80 giorni per il tipo piccante.

| VALORI NUTRIZIONALI (valori medi per 100 gr.)         |                  |
|---|------------------|
| NUTRITIONAL VALUES (average values per 100 gr.)       |                  |
| ENERGIA ENERGY  | 1299 KJ 314 Kcal |
| GRASSI FAT  | 27 g             |
| di cui: of which:                                     |                  |
| ACIDI GRASSI SATURI SATURATED FATTY ACIDS             | 19 g             |
| ACIDI GRASSI MONOINSATURI MONOINSATURATED FATTY ACIDS | 6,1 g            |
| ACIDI GRASSI POLISATURI POLYSATURATED FATTY ACIDS     | 0,7 g            |
| CARBOIDRATI CARBOHYDRATES                             | 0 g              |
| di cui ZUCCHERI of which SUGARS                       | 0 g              |
| PROTEINE PROTEIN                                      | 18 g             |
| SALE SALT   | 1,6 g            |
| CALCIO CALCIUM  | 530 mg - 66%     |
| FOSFORO PHOSPHORUS                                    | 280 mg - 40%     |

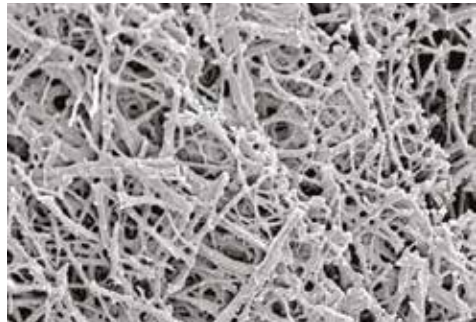


## GLUTINE

Le proteine del glutine possono essere divise in due frazioni principali secondo la loro solubilità in etanolo e cioè *gliadine* solubili e *glutenine* insolubili. Entrambe le frazioni consistono di numerosi componenti proteici, parzialmente connessi attraverso legami di tipo non-covalente e covalente.



“Il cesto di pane, 1926”,  
olio di Salvador Dalí (1904-1989).



Struttura del glutine vista  
al microscopio elettronico a scansione.

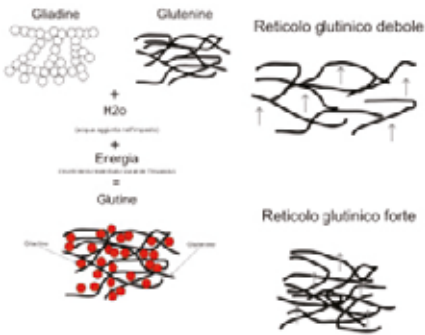
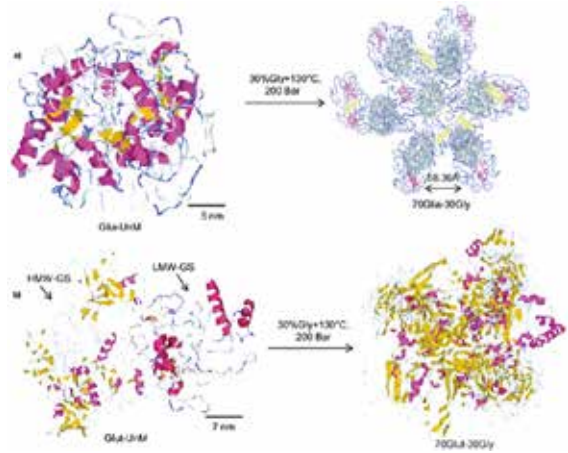
Ciascuna proteina è poi formata da due o tre domini, nei quali uno solo di essi presenta una sequenza ripetitiva di glutammina e prolina (Belitz e Coll., 1996).

Le *gliadine* ( $C_{29}H_{41}N_7O_9$ ) sono proteine legate da ponti disolfuro, di peso molecolare compreso tra 28.000 e 55.000, classificate (a seconda della loro struttura primaria) in alfa/beta, gamma ed omega.





Le **glutenine** sono proteine aggregate, legate da ponti disolfuro, comprendenti unità ad elevato peso molecolare (da 67.000 a 88.000) e unità a basso peso molecolare (da 32.000 a 35.000). Recentemente si è visto che le glutenine sono un miscuglio eterogeneo di molecole polipeptidiche in cui si trovano strutture ordinate e disordinate di forma asimmetrica, dotate di larghe superfici in grado di favorire interazioni e aggregazioni (Wieser, 2007).



Le proteine del glutine giocano un ruolo decisivo nel determinare la qualità della farina, conferendole capacità di assorbire acqua, coesività, viscosità ed elasticità nella pasta.

In particolare, le molecole di glutenina ad elevato peso molecolare, assieme alle altre proteine del grano, formano un reticolo glutinoso continuo nella pasta, coesivo grazie ai legami covalenti e non-covalenti che uniscono fra di loro i polipeptidi. La miscela diventa elastica perché le interazioni e le

conformazioni delle proteine della farina cambiano sotto l'effetto della contrazione, con tendenza a rinvenire allo stato minimo d'energia (Bietz & Huebner, 1980).

La digestione di queste proteine, da cui l'organismo ricava gran parte degli aminoacidi necessari, avviene nel canale digerente mediante reazioni di idrolisi operate dagli enzimi proteasi (gastriche e pancreatiche) e peptidasi (intestinali). Per l'azione combinata di questi enzimi, le proteine alimentari vengono completamente risolte negli aminoacidi costituenti che si offrono così in forma libera all'assorbimento intestinale. Specifici trasportatori, situati nell'orletto a spazzola degli enterociti, introducono gli aminoacidi nelle cellule della mucosa, con estrusione di ioni  $\text{Na}^+$ . Da qui passano per libera diffusione nel circolo portale e da questo vengono convogliati al fegato. Solo in alcuni individui avviene che dei polipeptidi, costituiti da 8-10 aminoacidi provenienti da parziale digestione del glutine, possano essere assorbiti come tali (Siliprandi & Tettamanti, 1998).

## LETTURE CONSIGLIATE

- 1) Belitz H.D. *e Coll.*, Structure and function of gluten proteins, *Cereal Chem.* 1996, 63, 336-341.
- 2) Bietz A. & Huebner F.R., Structure of glutenin: achievements at the northern regional center, *J. Ann. Technol. Agric.* 1980, 29, 249-277.
- 3) Dusty Carroll, Lesson Plan 4: Getting to know Lactase, <http://www.sas.upenn.edu/>
- 4) Enck P, Whitehead WE., Lactase deficiency and lactose malabsorption. A review, *Z. Gastroenterol.* 1986, 24, 125-134.

- 5) Kaback HR, Structure and mechanism of the lactose permease, *C. R. Biol.* 2005, 328(6), 557-567.
- 6) Robbins & Cottran, *Le basi patologiche delle malattie*, VII ed., Elsevier, 2006.
- 7) Roderick Steven L., The lac operon galactoside acetyltransferase, *C. R. Biol.* 2005, 328, 568-575.
- 8) Shahani KM, Kwan AJ, Friend BA, Role and significance of enzymes in human milk, *Am. J. Clin. Nutr.* 1980, 33, 1861-1868.
- 9) Siliprandi N. & Tettamanti O., *Biochimica Medica*, II Ed., Piccin, Padova, 1998.
- 10) Starling E.H., *Principi di fisiologia umana*, traduz. Giulio Stella, Piccin, Padova, 1959.
- 11) Substrate Transport in Lactose Permease, <http://www.ks.uiuc.edu/>
- 12) Wieser H., Chemistry of gluten proteins, *Food Microbiol.* 2007, 24, 115-119.



# *RICETTE GLUTEN-FREE*

dalla **BBC**



Traduzione di  
SILVANA  
BIANCHINI RANGOZZI

## Ingredienti

- 200 g di farina bianca senza glutine
- 1 cucchiaino di sale
- 3 cucchiaini di polvere lievitante senza glutine
- 284 ml di latte intero con una spruzzata di limone
- 1 cucchiaino di concentrato di pomodoro (conserva)
- 2 cucchiaini di olio d'oliva
- 3 uova
- 25 g di parmigiano
- 50 g di pomodori secchi sott'olio (6 o 8) tagliati grossolanamente



# Pane senza glutine ai pomodori secchi

*(Gluten-free sundried tomato bread)*

## Preparazione

Preriscaldare il forno a 180°C se ventilato (o a 160°C se statico). Mescolare la farina, il sale e la polvere lievitante in una larga ciotola.

In un'altra ciotola separata frullare il latte, le uova, il concentrato di pomodoro e l'olio.

Incorporare gli ingredienti del frullato alle farine.

Infine aggiungere i pomodori secchi e metà del parmigiano.

*Una veloce ricetta per la preparazione di una pagnotta senza glutine, pronta in un'ora circa perché non necessita di lievitazione.*

- TEMPO DI PREPARAZIONE: 15 MINUTI
- TEMPO DI COTTURA: 1 ORA
- DIFFICOLTÀ: FACILE
- RESA: UNA PAGNOTTA

Imburrare o rivestire con carta da forno una teglia per pane (da 900 g) e versare il composto. Cospargere la superficie con il resto del parmigiano. Cuocere in forno per 50 o 60 minuti (fare comunque la prova dello stecchino). Estrarlo dalla teglia e farlo raffreddare su una rastrelliera.



## Ingredienti

- 2 cucchiaini d'olio d'oliva
  - 1 cipolla tagliata
  - 1 carota media tagliata
  - 2 gambi di sedano tagliati
  - 1 spicchio d'aglio schiacciato
  - 500 g di carne di manzo tritata
  - Qualche fogliolina di timo fresco
  - 1 scatola da 400 g di passata di pomodoro
  - 150 ml di brodo di manzo
  - 1 cucchiaino di salsa *Worcester*
  - 1 manciata di prezzemolo intero
- PER LA GUARNIZIONE:**
- 225 g di farina senza glutine
  - ½ cucchiaino di polvere lievitante
  - 50 g di formaggio Red Leicester grattugiato\*
  - 1 cucchiaino di timo fresco
  - 1 cucchiaino di prezzemolo fresco tritato
  - 50 ml di yogurt naturale magro





# Medaglioni di manzo senza glutine o “Terrina del Principe”

(Thane Prince's gluten-free cobbler)

## Preparazione

Mettere l'olio in una pentola e cuocervi la cipolla finché diventa trasparente. Aggiungere carota, sedano e aglio e far dorare il tutto. Mettere la carne trita e mescolarla bene, rompendola con un cucchiaio, girando spesso finché la carne è ben rosolata e scura. Aggiungere quindi il timo, la passata di pomodoro, il brodo, la salsa *Worcester* e il prezzemolo. Assaggiare il condimento e aggiustare il gusto. Coprire e sobbollire per 15 minuti. Preriscaldare il forno a 200°C se statico, a 180°C se ventilato. Setacciare la farina e la polvere lievitante e sfregare con del burro, aggiungere il

*Delizioso piatto di carne fatto con cura e senza glutine.*

- TEMPO DI PREPARAZIONE: 20 MINUTI
- TEMPO DI COTTURA: 40-45 MINUTI
- DIFFICOLTÀ: FACILE
- RESA: 3 O 4 PORZIONI

formaggio *Red Leicester* grattugiato\* e le erbe, quindi lo yogurt e mescolare il soffice impasto. Porlo su una tavola leggermente infarinata e lavorarlo delicatamente. Formare un rotolo di circa un centimetro e ricavare 9 medaglioni. Mettere il misto di carne in una pirofila, disporvi sopra l'impasto e spennellare con uova o latte. Cuocere per circa 20-25 minuti o finché la superficie risulti dorata ed il ripieno formi delle bollicine.



\* Sostituibile con il “Malga Mazze” (Vecchia Malga), stagionato 20 mesi del Monte Corno, sull'Altopiano di Asiago (Vicenza). Suggesto da Stefano Gadaleta di DottorVino – Good wine & food – a Sirmione (Brescia).

## Ingredienti

- 200 g di burro morbido (a temperatura ambiente)
- 200 g di zucchero raffinato
- 4 uova
- 175 g di mandorle tritate
- 250 g di patate schiacciate (già lessate)
- Zest (=buccia grattugiata) di 3 limoni (non trattati)
- 2 cucchiaini di polvere lievitante (senza glutine)

### PER LA COPERTURA E PIOGGIA (GLASSA):

- 4 cucchiai di zucchero granulato
- Il succo di un limone



# Torta senza glutine con glassa al limone

*(Gluten-free lemon drizzle cake)*

## Preparazione

Preriscaldare il forno ventilato a 180°C, se statico a 160°C.

Imburrare o foderare con carta da forno una tortiera rotonda del diametro di 20 cm. Sbattere

lo zucchero e il burro finché non

ottenete un composto chiaro e spumoso. Quindi aggiungete le

uova, una alla volta, e incorporatele bene. Infine aggiungere le

mandorle tritate, le patate schiacciate (fredde), lo *zest* di limone e

la polvere lievitante.

Rovesciare il composto nella tortiera, livellare la

superficie, quindi infornare

per 40-45 minuti. Fate

comunque la prova dello

stecchino, che deve essere

ben asciutto. Alla fine

togliere e far raffreddare su

una rastrelliera per almeno

10 minuti. Mescolare lo

zucchero granulato e il

succo del limone, quindi

versarlo con un cucchiaino

sopra la torta, lasciandolo cadere a pioggia su tutti i lati.

Fatela raffreddare completamente prima di tagliarla.

*Con uno speciale ingrediente a sorpresa, questa torta senza glutine resta morbida e ultrasoffice: stupirà tutti con le patate schiacciate!*

- TEMPO DI PREPARAZIONE: 30 MINUTI
- TEMPO DI COTTURA: 40 MINUTI, inclusa la cottura delle patate
- DIFFICOLTÀ: FACILE
- RESA: 8-10 PORZIONI



## Ingredienti

- 125 g di farina senza glutine
- 250 ml di latte di canapa o di latte di cocco
- 1 uovo intero
- Olio di semi di girasole o olio di riso
- Scorzette di arancia e sciroppo di agave per servire



# Pancakes senza glutine al latte

(Egg, dairy & gluten-free pancakes)

## Preparazione

Mettere la farina in una ciotola e formate una fontana al centro.

Versatevi l'uovo e un quarto di

latte. Usate una frusta elettrica per mixare, quindi aggiungete un altro quarto di latte.

Controllate che non ci siano grumi e completate con il latte rimasto. Agitate nuovamente prima di usare il composto.

Riscaldare una piccola pentola antiaderente con una spruzzata di olio. Quando è ben calda, usare una piccola quantità del composto, distribuendolo su tutta la superficie in modo uniforme.

- TEMPO DI PREPARAZIONE: 5 MINUTI
- TEMPO DI COTTURA: 25 MINUTI, PIÙ IL RIPOSO
- DIFFICOLTÀ: FACILE
- RESA: 6 PICCOLI PANCAKE

Cuocere per pochi minuti finché non risulti dorato, quindi girare e cuocere sull'altro lato.

Ripetere finché non avete terminato il composto (sempre mescolato prima!) e, se necessario, aggiungete un po' d'olio.

Servite con scorzette di arancia, sciroppo di agave (o di acero, più facile da trovare) o con marmellate, miele o altro, secondo i vostri gusti.





## Ingredienti

- 200 g di farina senza glutine
- 2 cucchiaini di sale
- 2 cucchiai di olio di oliva
- 7 g di lievito secco istantaneo
- 1 cucchiaio di rosmarino tritato
- 1 cucchiaio di pepe nero
- 125/150 ml di acqua tiepida
- 210 g di salsa di pomodoro
- 140 g di mozzarella affettata sottilmente
- ½ avocado affettato sottile
- 70 g di rucola
- Qualche pomodorino tagliato a metà
- 4 fette di prosciutto di Parma
- 4 fette di prosciutto cotto
- Olio di oliva
- Aceto balsamico



# Pizza con condimento fresco

(Fresh topped pizza)

## Preparazione

Preriscaldare il forno a 220°C se statico, a 200°C se ventilato o a gas.

Mettere quindi in un *robot* da cucina la farina, il sale, l'olio, il lievito, il rosmarino e il pepe. Azionare alla massima velocità finché il tutto non è ben mescolato.

Con le pale in funzione, aggiungere gradualmente l'acqua tiepida finché l'impasto non risulta ben soffice, ma non appiccicoso.

Togliere e impastare finché non è ben amalgamato.

*Questa pizza senza glutine diventerà il piatto preferito da dividere in famiglia!*

- TEMPO DI PREPARAZIONE: 15 MINUTI
- TEMPO DI COTTURA: 15 MINUTI,  
PIÙ 15 DI RIPOSO DOPO LA PREPARAZIONE
- DIFFICOLTÀ: FACILE
- RESA: 2 PORZIONI

Dimezzare ora l'impasto e stenderlo con l'aiuto di un mattarello, finché otterrete due dischi di circa 25 cm di diametro. La pasta deve essere sottile! Non formate bordi, quindi distribuite bene la salsa di pomodoro, fino ai bordi.

Infine cuocete nel forno (preriscaldato) per 12 o 15 minuti, comunque finché l'impasto non risulti croccante!

Disponete tutti gli

ingredienti freschi sul tavolo e lasciate che ognuno guarnisca la sua fetta come preferisce!





## Ingredienti

- 4 filetti (di circa 100 g ciascuno) di spigola
- Olio di oliva
- Per la salsa di capperi:
  - 1 cucchiaino di olio extra-vergine di oliva
  - *Zest* (buccia grattugiata) di un limone
  - 2 cucchiaini di succo di limone
  - 2 cucchiaini di capperi
  - 2 cucchiaini di mostarda di Digione senza glutine
  - 2 cucchiaini di prezzemolo tritato, più qualche fogliolina (facoltativo)



# Spigola al forno con salsa di limoni e capperi

*(Baked sea bass with lemon caper dressing)*

## Preparazione

Per la salsa mescolare l'olio con lo *zest* e il succo di limone, i capperi, la mostarda e un cucchiaino d'acqua.

Non aggiungere ora il prezzemolo, perché l'acidità del limone lasciato troppo a lungo può alterare il colore.

Preriscaldare il forno a 220°C se statico, a 200°C se ventilato o a gas.

*Questo raffinato piatto è perfetto per una cena, molto semplice e veloce da fare, non impegnativa l'esecuzione.*

- TEMPO DI PREPARAZIONE: 10 MINUTI
- TEMPO DI COTTURA: 10 MINUTI
- DIFFICOLTÀ: FACILE
- RESA: 4 PORZIONI



Rivestire la teglia con carta da forno.

Allineare i filetti di spigola, con la pelle verso l'alto, spennellare con l'olio e spargervi qualche fiocco di sale grosso.

Cuocere per 7 minuti o comunque finché la superficie risulti croccante al coltello.

Disporre quindi il pesce su piatti caldi, spargervi sopra con un cucchiaino la salsa (ora col prezzemolo) e, se volete, completate con qualche fogliolina intera.



# *ANTICHI SAPORI*



Alla pagina precedente:

*Camino trentino*, da “Pane di casa”, di Chiara Scudelotti,  
illustrazioni di Selene Conti, Francesca Mazzini, Giulia Pianigiani,  
Laura Toffaletti, II edizione, gennaio 2012

Si ringrazia per gentile concessione l'Editoriale Edizioni del Baldo  
di Castelnuovo del Garda (Verona),

## IL MONOCOCCO



Il **Monococco** (*Triticum monococcum* o **Farro minore**, famiglia delle Graminacee). Il nome “farro” è di origine italiana e comprende tre specie diverse: *T. monococcum* (Einkorn), *T. dicoccum* (Emmer), *T. spelta* (Spelt).

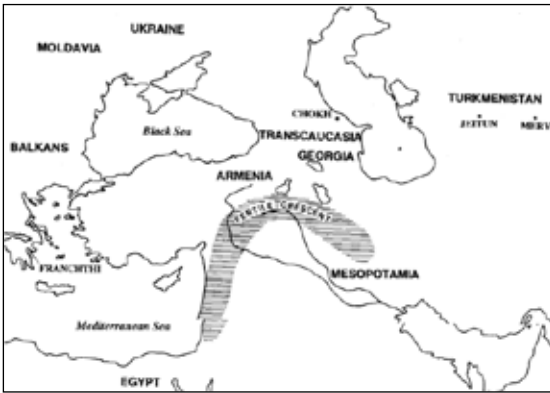
È stato il **primo cereale coltivato** dall’uomo almeno 7500 anni a.C. Venne soppiantato nel medioevo da specie più redditizie e solo di recente riscoperto per le sue proprietà nutrizionali molto elevate, superiori a quelle del grano tenero e duro, anche se lievita meno nella panificazione.

Il Monococco (di cui si conoscono oggi 16 varietà coltivate) ha un elevato contenuto di carotenoidi, un 18 % circa di proteine e l’**1.21% di glutine**. Questo fatto dipende da differenze cromosomiche del Monococco (appartenente ai **diploidi con 14 cromosomi**) rispetto agli altri cereali poliploidi (con 28 o 42 cromosomi, come nell’attuale frumento).



*I chicchi del frumento (Modern wheat = Triticum aestivum) e, a destra, il monococco (Einkorn = T. monococcum) (da thehealthyhomeeconomist.com)*

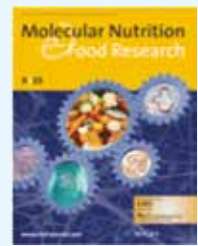




A sinistra: la fascia d'origine del *Triticum boeoticum*, progenitore del *T. monococcum* e, a destra, la mappa della diffusione del monococco in Europa migliaia di anni a.C.

Da ricerche fatte è stato dimostrato che l'idrolisi gastro-intestinale riduce drasticamente le proprietà stimolatorie sul sistema immunitario della gliadina contenuta nel *Triticum monococcum*, i cui peptidi (inclusi gli epitopi delle cellule-T) vengono degradati, mentre le gliadine del *Triticum aestivum* (frumento) sopravvivono alla digestione.

Dalle prove *in vitro* si è visto che le proteine del monococco sono sufficientemente diverse da quelle del comune grano esaploide, per cui esse determinano una bassa tossicità nei pazienti celiaci (Carmen Gianfrani et al., Extensive *in vitro* gastrointestinal digestion markedly reduces the immune-toxicity of *Triticum monococcum* wheat: Implication for celiac disease, Molecular Nutrition & Food Research 2015, 59, 1844-1854).



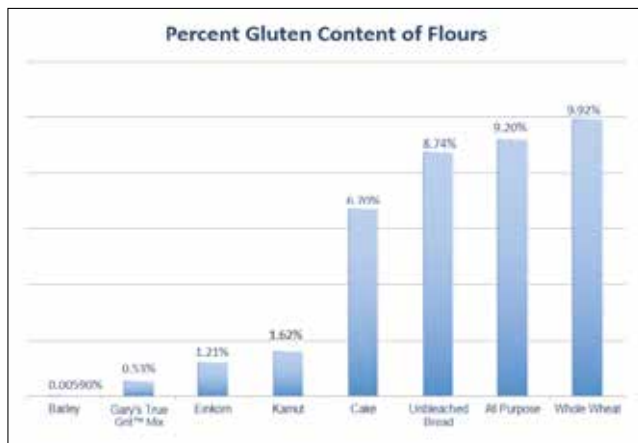
Il *Triticum monococcum* è la varietà "addomesticata" del *Triticum boeoticum*, specie selvatica di grano antichissima (circa 10.000 anni) con baccello, glume legnose (lolle) che rinchiudono stretti grani. La forma coltivata è simile a quella selvatica, tranne che la spiga rimane la stessa alla maturazione, mentre i semi sono più grandi. Viene considerato fra i "cereali coperti", poiché il suo nucleo non si libera dal rivestimento dei semi (gluma) con la trebbiatura ed è quindi difficile separare la lolla dal chicco.

Ha una resa bassa e un ciclo vitale di 11 mesi; è generalmente di altezza inferiore ai 70 cm e non è molto abbondante per quantità di chicchi; difatti sulla spiga ogni spighetta contiene in genere una sola cariosside fertile. Può crescere su terreni poveri, secchi e marginali, ove altre varietà di cereali non sopravviverebbero. Nasce spontaneamente nelle zone collinose della parte settentrionale della "Mezzaluna fertile" in Turchia, nei Balcani e in Giordania. (da slideplayer.it)



In Italia il *Triticum monococcum* viene coltivato anche in provincia di Brescia, sotto la denominazione di *Shebar*<sup>®</sup>. Il nome *Einkorn*, in tedesco, significa “un solo chicco”.

Se ne ricava una farina che può essere utilizzata per la preparazione di alimenti ipoallergenici, destinati a **celiaci e diabetici**, grazie al lento rilascio dell'amido.



Nel grafico sono riportati i contenuti percentuali di glutine delle farine di cereali più comuni. Il monococco ne contiene l'1.21%. Nella figura sopra sono confrontate la farina di monococco (Einkorn flour) e la farina c di grano per panificazione (Bread flour).

## Ingredienti

- 500 g di Farina di farro monococco
- 125 g di Pasta madre, rinfrescata da 3-4 ore
- 300 millilitri di Acqua, a temperatura ambiente
- 50 milligrammi di Olio extravergine d'oliva
- 2 cucchiaini da the di Sale



# *Pane con lievito madre e farina di farro monococco*

(da [worldrecipes.expo2015.org/it](http://worldrecipes.expo2015.org/it))

## *Preparazione*

1. In una ciotola sciogliete la pasta madre nell'acqua, aggiungete la farina di farro monococco e cominciate a impastare.
2. Dopo qualche minuto aggiungete l'olio extravergine di oliva e per ultimo il sale e continuate a lavorare l'impasto finché non avrà raggiunto una consistenza liscia e omogenea. Fate riposare in una ciotola coperta a temperatura ambiente fino al raddoppio del volume (4-6 ore).

3. Lavorate poi l'impasto su un tagliere infarinato, formate una pagnotta rotonda e disponetela su una teglia rivestita con carta da forno.
4. Fate lievitare ancora 1-2 ore, incidete la superficie dell'impasto con un taglio a reticolo e infornate, in forno già caldo, per 45 minuti circa (i primi 15 a 250 gradi, i restanti a 200).





NELLA STESSA COLLANA SONO STATI PUBBLICATI I SEGUENTI VOLUMI:

- |           |   |           |   |
|-----------|---|-----------|---|
| 1 - 1979  | Infezioni respiratorie del bovino   | 20 - 1988 | Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986  |
| 2 - 1980  | L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria                                 | 21 - 1989 | Le infezioni erpetiche del bovino e del suino   |
| 3 - 1980  | Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria                                      | 22 - 1989 | Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie   |
| 4 - 1980  | Gli antibiotici nella pratica veterinaria   | 23 - 1989 | La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa   |
| 5 - 1981  | La leucosi bovina enzootica   | 24 - 1989 | Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili   |
| 6 - 1981  | La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia                                     | 25 - 1990 | Mappaggio del genoma bovino   |
| 7 - 1982  | Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale                 | 26 - 1990 | Riproduzione nella specie suina   |
| 8 - 1982  | Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino                                   | 27 - 1990 | La nube di Chernobyl sul territorio bresciano   |
| 9 - 1983  | Zoonosi ed animali da compagnia   | 28 - 1991 | Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi  |
| 10 - 1983 | Le infezioni da Escherichia coli degli animali  | 29 - 1991 | La sindrome chetotica nel bovino  |
| 11 - 1983 | Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria                                  | 30 - 1991 | Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti   |
| 12 - 1984 | 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale                 | 31 - 1991 | Allevamento delle piccole specie  |
| 13 - 1984 | Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo                                 | 32 - 1992 | Gestione e protezione del patrimonio faunistico   |
| 14 - 1984 | 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione        | 33 - 1992 | Allevamento e malattie del visone   |
| 15 - 1985 | La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino | 34 - 1993 | Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino  |
| 16 - 1986 | Immunologia comparata della malattia neoplastica                                      | 35 - 1993 | Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale |
| 17 - 1986 | 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale                 | 36 - 1993 | Argomenti di patologia veterinaria  |
| 18 - 1987 | Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive               | 37 - 1994 | Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche                                |
| 19 - 1987 | Conigliocultura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing                       |           |   |

- 38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
- 39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica
- 40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro
- 41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali
- 42 - 1998 Umanesimo ed animalismo
- 43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio
- 44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria
- 45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti
- 46 - 2000 Animali, terapia dell'anima
- 47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2000
- 48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
- 49 - 2001 Tipizzare le salmonelle
- 50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria
- 51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina
- 52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte
- 53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento
- 54 - 2003 Proceedings of the 37<sup>th</sup> international congress of the ISAE
- 55 - 2004 Riproduzione e benessere in conigliocultura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo
- 56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina
- 57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
- 58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli
- 59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria
- 60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
- 61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito
- 62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2005
- 63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio
- 64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
- 65 - 2006 Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Equitation Science Symposium
- 66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione
- 67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo
- 68 - 2007 Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Veterinary Behaviour Meeting
- 69 - 2007 Atti del XXX corso in Patologia Suina
- 70 - 2007 Microbi e alimenti
- 71 - 2008 V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
- 72 - 2008 Proceedings of the 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress
- 73 - 2008 Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria
- 74 - 2009 La biosicurezza in veterinaria
- 75 - 2009 Atlante di patologia suina I
- 76 - 2009 Escherichia Coli
- 77 - 2010 Attività di mediazione con l'asino

- 78 - 2010 Allevamento animale e riflessi ambientali
- 79 - 2010 Atlante di patologia suina II  
PRIMA PARTE
- 80 - 2010 Atlante di patologia suina II  
SECONDA PARTE
- 81 - 2011 Esercitazioni di microbiologia
- 82 - 2011 Latte di asina
- 83 - 2011 Animali d'affezione
- 84 - 2011 La salvaguardia della biodiversità zootecnica
- 85 - 2011 Atti I Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
- 86 - 2011 Atti II Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
- 87 - 2011 Atlante di patologia suina III
- 88 - 2012 Atti delle Giornate di Coniglicoltura ASIC 2011
- 89 - 2012 Micobatteri atipici
- 90 - 2012 Esperienze di monitoraggio sanitario della fauna selvatica in Provincia di Brescia
- 91 - 2012 Atlante di patologia della fauna selvatica italiana
- 92 - 2013 Thermography: current status and advances in livestock animals and in veterinary medicine
- 93 - 2013 Medicina veterinaria (illustrato). Una lunga storia. Idee, personaggi, eventi
- 94 - 2014 La medicina veterinaria unitaria (1861-2011)
- 95 - 2014 Alimenti di origine animale e salute
- 96 - 2014 I microrganismi, i vegetali e l'uomo
- 97 - 2015 Alle origini della vita: le alghe
- 98 - 2015 Regimen Sanitatis Salerni
- 99 - 2015 Atti del VI Congresso Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
- 100 - 2015 Equus Frenatus. Morsi dalla Collezione Giannelli





*Finito di stampare da*

**litos**

Litos S.r.l. - Gianico (Bs)  
[www.litos.srl](http://www.litos.srl)

nel mese di giugno 2016

*Informazione ecologica:*

pubblicazione stampata con assenza di esalazioni alcoliche  
**Sistema Cesium®** brevetto **Philip Borman Italia**





ISBN 978-88-97562-15-3



9 788897 562153