

KAKOVOST PROBIOTIČNIH PREHRANSKIH DOPOLNIL NA SLOVENSKEM TRGU V LUČI ZAKONODAJE O ZDRAVSTVENIH TRDITVAH NA ŽIVILIH

QUALITY OF PROBIOTIC SUPPLEMENTS ON THE SLOVENIAN MARKET IN THE LIGHT OF LEGISLATION ON HEALTH CLAIMS ON FOODSTUFFS

AVTOR / AUTHOR:

Dr. Petra Mohar Lorbeg, dipl. živil. tehnol.
Znan. svet. dr. Bojana Bogovič Matijašič*,
dipl. živil. tehnol.

*Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek
za zootehniko, Inštitut za mlekarstvo in probiotike,
Grobje 3, 1230 Domžale*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: bojana.bogovic@bf.uni-lj.si

POVZETEK

Trg probiotikov v Evropski uniji je močno zaznamovala Uredba o prehranskih in zdravstvenih trditvah za živila, ki je v Sloveniji stopila v polno veljavo leta 2013. Kljub prizadevanju industrije in kopičenju znanstvenih dokazov o učinkih probiotikov na gostitelja v registru dovoljenih zdravstvenih trditvev za živila še vedno ni nobene za probiotike. Poleg tega raziskovalci že vrsto let opozarjajo na nezadostno kakovost probiotičnih izdelkov glede vsebnosti in živosti deklariranih mikroorganizmov. Namen te raziskave je bil ugotoviti, kako se omenjene regulatorne spremembe odražajo na označevanju in kakovosti probiotičnih prehranskih dopolnil iz slovenskih lekarn. Ugotovili smo, da se je večina proizvajalcev odzvala na nova pravila, saj so opustili navajanje zdravstvenih trditvev. Kakovost izdelkov se je nekoliko izboljšala, saj jih je 42 % popolnoma ustrezalo deklaraciji, medtem ko je bilo v raziskavi iz leta 2009 takšnih le 25 %.

KLJUČNE BESEDE:

probiotična prehranska dopolnila, zdravstvene trditve, kakovost probiotičnih izdelkov, PCR

ABSTRACT

The EU probiotics market has been strongly affected by the Regulation on nutrition and health claims for foods, which came into full effect in Slovenia by 2013. Despite efforts of the industry and accumulation of scientific evidence on the effects of probiotic microorganisms to the host, there are still no probiotic claims in the EU register of authorised health claims for foods. In addition, researchers have been pointing out for many years the insufficient quality of probiotic products related to the content and viability of declared microorganisms. The aim of the present study was to determine how these regulatory changes are reflected in the labeling and quality of probiotic supplements from Slovenian pharmacies. We found out that most producers considered the new rules, as they abandoned the health claims on the labels. The overall quality of the products on the market was slightly improved, as 42 % of them were in agreement with the label compared to only 25 % in the previous testing in 2009.

KEY WORDS:

probiotic food supplements, health claims, quality of probiotic products, PCR

1 UVOD

Probiotične bakterije zaužijemo pretežno z živil in prehranskimi dopolnili, v manjši meri pa z zdravili in živila za posebne prehranske namene. Za prehranska dopolnila v Evropski uniji (EU) na splošno veljajo zakonska določila in smernice, ki urejajo varnost, kakovost in označevanje živil. V Sloveniji je za prehranska dopolnila od leta 2014 pristojno Ministrstvo za zdravje, pri čemer nadzor nad prehranskimi dopolnili izvaja Zdravstveni inšpektorat RS (ZIRS). Pomembnejše novosti je leta 2013 prinesel Pravilnik o prehranskih dopolnilih (1), ki je ukinil zahtevo po prijavljanju prehranskih dopolnil, ki so v prometu v Sloveniji. Obveščanje o novem prehranskem dopolnilu, preden pride na slovenski trg, pa je obvezno za tista prehranska dopolnila, ki so označena z zdravstvenimi trditvami (2, 3). Za to področje je pristojna Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, ki deluje v okviru Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

V EU trenutno prehranskih dopolnil s probiotičnimi mikroorganizmi ni dovoljeno označevati, predstavljati ali oglaševati z zdravstvenimi trditvami, ker v registru prehranskih in zdravstvenih trditvev za živila še ni nobene dovoljene zdravstvene trditve za probiotike (4). Razlog za to tiči v zelo strogih stališčih Evropske agencije za varnost hrane (EFSA) glede zdravstvenih trditvev. Z namenom zagotavljanja visoke ravni varstva potrošnikov tudi na tem področju je leta 2006 izšla Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (5). Za odobritev zdravstvene trditve za živila, med katera uvrščamo tudi prehranska dopolnila, je treba predložiti agenciji EFSA trdne znanstvene dokaze, pridobljene v obsežnih kontroliranih kliničnih raziskavah. Kljub dolgoletnim raziskavam in prizadevanjem raziskovalcev in industrije ter številnim znanstvenim dokazom za posamezne probiotične seve zaenkrat skozi sito presoje organov EFSA še ni prišla nobena zdravstvena trditvev za probiotike. Edina primera odobritve uporabe zdravstvenih trditvev za probiotike na področju Evrope (brez Rusije), v Švici, sta »podpora prebavi s skrajšanjem časa prehoda« za probiotični sev HOWARU *Bifidobacterium lactis* HN019 (Danone, DuPont), ki ga je

Švicarski zvezni urad za varno hrano in veterino odobril leta 2014, ter »prispeva k normalnemu delovanju prebavil z izboljšanjem konsistence blata in skrajšanjem časa prehoda« za *Lactobacillus casei* Yakult, ki ga je isti organ odobril leto kasneje (6).

Drugje po svetu je nadzor nad prehranskimi dopolnili, vključno s probiotičnimi, zelo različno urejen. V Kanadi, na primer, so lahko probiotična prehranska dopolnila, ki jih uvrščajo v t. i. »naravne izdelke za zdravje«, opremljena z informativnimi zdravstvenimi trditvami, ki jih po presoji dokumentacije odobri organizacija *Health Canada* (7, 8). V ZDA ima podobno vlogo *Food and drug administration* (FDA), ki pri prehranskih dopolnilih dovoljuje trditve o zmanjšanju tveganja za razvoj bolezni (9, 10). Bolj razširjene so trditve, ki opisujejo vlogo določene sestavine (npr. probiotičnih bakterij) pri vzdrževanju zdravja oz. vpliv na določene funkcije organizma, ne smejo pa omenjati bolezni in za razliko od zdravstvenih trditvev ne potrebujejo odobritve s strani FDA pred vstopom izdelka na trg. V azijsko-pacifiški regiji probiotične izdelke, kot so pri nas prehranska dopolnila, uvrščajo v kategorijo funkcionalne hrane. V Indiji nova zakonodaja, ki bo stopila v veljavo 2018, ne bo dovoljevala trditvev o zdravljenju bolezni, pač pa trditve o izboljšanju funkcij, ohranjanju zdravja, zmanjševanju tveganja za bolezni, vplivanju na imunski sistem in proti staranju (11, 12). Na Japonskem je leta 2015 začela veljati nova zakonodaja, ki je dopolnila prejšnji strožji sistem Foshu (*food for specified health uses*) in ki dopušča uporabo odobrenih trditvev o delovanju tudi pri živilih (13).

V Sloveniji je Uredba o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih, po prehodnem obdobju, ko je začel tudi register dovoljenih zdravstvenih trditvev (Register Skupnosti v zvezi s prehranskimi in zdravstvenimi trditvami, 20. člen Uredbe 1924/2006) (2-5), stopila v polno veljavo z letom 2013, ko je Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin začela izvajati inšpekcijski nadzor. Na nove zahteve so se morali odzvati tudi številni proizvajalci probiotičnih živil in prehranskih dopolnil, pri katerih so bile bolj ali manj neposredne zdravstvene trditve zelo razširjene. Te omejitve ne veljajo za zdravila s probiotiki ali za živila za posebne zdravstvene namene s probiotiki, ki sodijo v domeno Zakona o zdravilih (14) oz. Pravilnika o živilih za posebne zdravstvene namene (15).

Slovenska raziskava iz leta 2009 o kakovosti probiotičnih izdelkov, naprodaj v slovenskih lekarnah (16), kot tudi sorodne raziskave v drugih evropskih državah v tistem obdobju so pokazale vrsto pomanjkljivosti tovrstnih izdelkov, med katerimi so prevladovala nedoseganje deklariranega števila živih probiotičnih bakterij, odsotnost deklariranih



bakterij in uporaba nepravilnih ali pomanjkljivih imen prisotnih sevov (17-22).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 PROBIOTIČNI IZDELKI

Probiotične izdelke smo kupili v lekarnah in spletnih lekarnah v Sloveniji. Do analize smo jih shranjevali v razmerah, navedenih na ovojnini izdelka.

2.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA DEKLARIRANIH BAKTERIJSKIH SKUPIN Z METODO ŠTETJA NA PLOŠČAH

Število mikroorganizmov posameznih skupin, rodov oz. vrst smo ugotavljali z nacepljanjem vzorcev na selektivna gojišča. Število bifidobakterij smo ugotavljali v skladu s standardom ISO 29981:2010 (23): gojišče TOS (Yakult) z mupirocinom (50 mg/L), anaerobna inkubacija, 72 ur pri 37 °C. Skupno število laktobacilov smo ugotavljali na gojišču Rogosa (Merck) z anaerobno inkubacijo 72 ur pri 37 °C. Število laktobacilov vrste *Lactobacillus acidophilus* smo ugotavljali v skladu z ISO 20128:2006 (24) na gojišču MRS (Merck) z dodatkom klindamicina (0,1 mg/L) in ciprofloksacina (10 mg/L), z anaerobno inkubacijo 72 ur pri 37 °C. Število bakterij vrste *Streptococcus thermophilus* smo ugotavljali na gojišču M17 (Merck), po 24-urni inkubaciji pri 37 °C. Število enterokokov smo ugotavljali na gojišču CAE (HiMedia) z dodatkom 2,3,5-tripenteniltetrazolijevega klorida (0,01 %) po 72-urni inkubaciji pri 37 °C. Za ugotavljanje števila bakterij vrste *Bacillus coagulans* smo primarne razredčitve vzorcev najprej 10 min segrevali pri 80 °C ter nato nacepili na gojišče TSA, ki smo ga inkubirali 72 ur pri 30 °C.

2.2 IZOLACIJA DNA

Za ugotavljanje prisotnosti deklariranih bakterijskih vrst smo uporabili DNA, ki smo jo izolirali iz mešanice kolonij, zraslih na ustreznih selektivnih gojiščih. Pri izdelkih, pri katerih nismo uspeli potrditi določenih vrst, smo uporabili še DNA, izolirano neposredno iz izdelka. DNA smo izolirali z uporabo komercialnega kompleta reagentov Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Najprej smo bakterijske celice lizirali, tako da smo suspenziji bakterijskih kolonij oz. su-

spenziji izdelka (30 do 50 mg izdelka v 600 µl 50 mM EDTA, pH 8,0) dodali lizocim (10 mg/ml; Sigma) in mutanolizin (25 U/ml; Sigma) ter inkubirali 60 min pri 37 °C. Ostale korake izolacije smo izvedli po navodilih proizvajalca.

2.3 POTRJEVANJE PRISOTNOSTI DEKLARIRANIH BAKTERIJSKIH VRST S PCR

Prisotnost posameznih vrst probiotičnih bakterij smo ugotavljali s pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo (PCR), pri čemer smo uporabili za posamezno vrsto specifične začetne oligonukleotide, in sicer za *Bifidobacterium (B.) animalis* ssp. *lactis*, *B. longum* (25), *B. bifidum*, *B. longum* ssp. *infantis* (26) in *B. breve* (27); *Lactobacillus (L.) acidophilus*, *L. paracasei*, *L. casei* (28), *L. plantarum*, *L. salivarius* (29), *L. reuteri* in *L. rhamnosus* (30), *L. gasseri* (27) in *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (31); *Enterococcus faecium* (32); *Streptococcus thermophilus* (33) in *Bacillus coagulans* (34).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Pregled ponudbe prehranskih dopolnil s probiotičnimi bakterijami oz. z živimi mlečnokislinskimi bakterijami ali bifidobakterijami v slovenskih lekarnah v letu 2016 je pokazal, da se izbor tovrstnih izdelkov delno pokriva z izborom iz leta 2009 (8 izdelkov), nekaterih izdelkov ni več naprodaj (13 izdelkov), nekaj pa je novih (10 izdelkov) (16). Naleteli smo tudi na probiotični izdelek, ki je uvrščen v skupino živil za posebne zdravstvene namene. V pregled smo ga vključili zato, ker je po sestavi in formulaciji zelo podoben sorodnim izdelkom, ki se tržijo kot prehranska dopolnila. Opisi na ovojnini ali priloženih lističih pri sedmih izdelkih, s katerimi smo se srečali že leta 2009, so bili precej spremenjeni (preglednica 1).

Večina so proizvajalci opustili navajanje pomoči pri vzpostavitvi porušene črevesne mikroflore, blagodejnega delovanja na imunski sistem, preventivnega delovanja pri dietah in nekaterih bolezenskih stanjih (driska odraslih in otrok, driska ob antibiotični terapiji, kronične vnetne bolezni črevesja, atopijski dermatitis, različne alergije in kronična zaprtja), prispevanja k dobri presnovi nujno potrebnih hranilnih snovi ali boljšega počutja oseb v zrelih letih. Omenjeni opisi, ki smo jih zasledili v prejšnji raziskavi, sicer niso ne-

Table 1: Descriptions on the probiotic dietary supplements from Slovenian pharmacies

Opis v času predhodne raziskave (2009)	Opis danes
»pomembni pri hitrem vzpostavljanju bakterijske flore in delovanja črevesja po zdravljenju z antibiotiki, diareji, stresu in prehranskih motnjah«	»žive mlečnokislinske bakterije in vitamini«; na spletu: »izdelek je koristen med in po zdravljenju z antibiotiki, pri zaprtju na potovanju, pri zastrupitvah doma in na počitnicah, kadar imamo oslABLJENO odpornost, tudi zaradi stresa«
»za osebe v zrelih letih – po 50. letu starosti, da bi ostale aktivne, vitalne, da bi se dobro počutile«; »probiotiki prispevajo k dobri presnovi esencialnih hranilnih snovi v prebavilih«; »aktivator zdravja, prehransko dopolnilo z živimi kulturami mlečnokislinskih bakterij, vitamini, minerali, rastlinskimi izvlečki in luteinom«	»bakterije v kombinaciji z ostalimi sestavinami sodelujejo pri presnovi in pomagajo ohraniti zdrav imunski sistem«
»pomaga ohraniti in vzpostavljati ravnovesje v črevesni mikrofli, ki preprečuje razmnoževanje škodljivih MO«	»probiotične tablete«; »ta bakterija je prilagojena na bivanje v prebavilih in je varna (klinične študije)«
»pomaga hitro uravnorežiti črevesno floro pri spremenjenih črevesnih funkcijah«; »probiotične bakterije zagotavljajo normalno prebavno in imunsko funkcijo črevesja«	»kombinacija probiotičnih kultur in vitaminov skupine B«; »mlečnokislinske bakterije (probiotične kulture) so sestavni del črevesne mikroflore, ki zagotavlja normalno prebavo in imunsko funkcijo črevesja«
»ta bakterija sodi med naravno mikrofloro materinega mleka pri zdravih materah«; »v telesu nastopa kot naravna sestavina črevesne flore«; »pomaga ohraniti in vzpostavljati ravnovesje v črevesni mikrofli, ki preprečuje razmnoževanje škodljivih MO«	»probiotične tablete«; »ta bakterija je prilagojena na bivanje v prebavilih in je varna (klinične študije)«
»izdelek je namenjen za ohranjanje ravnorežja v črevesni mikrofli med zdravljenjem z antibiotikom in po njem ter s tem poveča raven koristnih bakterij v črevesju«	»žive probiotične bakterije, ki se optimalno dopolnjujejo in so običajno prisotne v naših prebavilih«
»vpliva na ravnovesje črevesne flore«	Izdelka ni več na trgu
»prispeva k dobri presnovi nujno potrebnih hranilnih snovi (vitamini, minerali)«	Izdelka ni več na trgu
»probiotične bakterije, ki jih ta prašek vsebuje, delujejo zaviralno na škodljive bakterije in tako pomagajo vzdrževati ravnorežje v črevesni mikrofli«	Izdelka ni več na trgu
»za izboljšanje splošnega počutja pri zaprtju«; »za izboljšanje normalne prebave«	Izdelka ni več na trgu
»uravnava ravnorežje mikroflore v gastrointestinalnem traktu v primeru diareje, gastrointestinalnih infekcij pri zdravljenju z antibiotiki«; »spodbuja imunski sistem«; »zmanjša alergične reakcije«	Izdelka ni več na trgu



»izboljša stanje bakterijske flore«; »probiotiki ugodno delujejo na prebavo in pomagajo vzdrževati črevesno mikrofloro«	Izdelka ni več na trgu
»pomaga pri vzpostavitvi porušene črevesne mikroflore«	Izdelka ni več na trgu
»blagodejno deluje na imunski sistem«; »vzpostavi probiotično ravnotežje«	Izdelka ni več na trgu
»blagodejni vpliv na prebavo, saj vzpostavi ravnovesje črevesne mikroflore«; »izdelek uporabljamo preventivno, pri dietah, pri bolezenskih stanjih: driska odraslih in otrok, preprečevanje driske ob antibiotični terapiji, kronične vnetne bolezni črevesja, atopijski dermatitis, različne alergije in kronična zaprtja«	Izdelka ni več na trgu
»naravni regulator črevesne flore, ki pomaga pri ohranjanju in vzpostavitvi ravnovesja normalne črevesne flore«	Izdelka ni več na trgu
»probiotiki sodelujejo pri krepitevi naravne obrambe telesa«	Izdelka ni več na trgu
Izdelka še ni bilo na trgu	»vsebuje žive kulture mlečnokislinskih bakterij«
Izdelka še ni bilo na trgu	»kombinacija 8 različnih vrst koristnih bakterij«
Izdelka še ni bilo na trgu	»probiotični kompleks s prebiotiki«:na spletu: »probiotični kompleks vsebuje probiotike ter prebiotike - oboji odlično vplivajo na samo prebavo in so nam v precejšnje pomoč«, »prehransko dopolnilo je primerno jemati ob terapijah z antibiotiki, saj tako nadomešča odmrle bakterije«
Izdelka še ni bilo na trgu	»vsebuje koristne bakterije in prebiotična vlakna«;»za osveževanje črevesne flore«;»priporočljivo po tretiranju z antibiotiki in po črevesnih infekcijah, za ponovno vzpostavitev mikrobnega ravnotežja«;na spletu: »vsebuje 7 različnih vrst koristnih probiotičnih bakterijskih kultur«, »priporočamo za namene dobre prebave in kot dodatek pri najrazličnejših antibiotičnih terapijah«, »zagotavlja vsesplošno dobro počutje«
Izdelka še ni bilo na trgu	»probiotik za usta, grlo in ušesa«
Izdelka še ni bilo na trgu	»probiotik z živimi mlečnokislinskimi bakterijami«
Izdelka še ni bilo na trgu	»probiotik za zdravo črevesje in prebavo«
Izdelka še ni bilo na trgu	»mlečnokislinske bakterije in probiotiki«
Izdelka še ni bilo na trgu	»za uravnoteženo črevesno mikrofloro«
Izdelka še ni bilo na trgu	»tablete z mlečnokislinskimi bakterijami za odpornost«; »vsebuje sedem različnih, naravnih, človeku lastnih sevov mlečnokislinskih bakterij (Laktobacili in Bifidobakterije)«;»priporočljiv med potovanji, med zdravljenjem z antibiotiki ter ob spremenjeni prehrani.«

posredne zdravstvene trditve, pa vendarle potrošnika nagovarjajo k uporabi pri določenih bolezenskih stanjih, zato danes niso sprejemljivi. Pri večini izdelkov, s katerimi smo se srečali že v prejšnji raziskavi, na obojnini ne najdemo opisov, ki bi omenjali učinkovanje dodanih bakterij, pač pa omenjajo, da so te bakterije žive, dobro prilagojene na življenje v prebavilih in varne. Pri enem izdelku smo samo na spletni strani zasledili opis, da je dopolnilo koristno pri zdravljenju z antibiotiki, zaprtju na potovanjih, zastrupitvah in oslABLjeni imunosti (35). Pri treh izdelkih smo zabeležili opise, ki omenjajo prebavo oz. presnovo in imunsko funkcijo črevesja, kar pa je že vprašljivo glede zahteve iz Pravilnika o prehranskih dopolnilih, da pri označevanju, predstavljanju in oglaševanju prehranskim dopolnilom ne smemo pripisovati lastnosti preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh (1, 36). Trditve se sicer ne nanašajo neposredno na seve v izdelku, nakazujejo pa možne načine delovanja.

Med prehranskimi dopolnili, ki jih leta 2009 še ni bilo na slovenskem trgu, smo se pri šestih srečali z nedovoljenimi trditvami, kot so »vplivajo na prebavo«, »primerno jih je jemati ob terapijah z antibiotiki«, »probiotik za usta, grlo in ušesa«, »probiotik za zdravje črevesa in dobro prebavo«, »za uravnoteženo črevesno mikrofloro«, »mlečnokislinske bakterije za odpornost« ali »priporočljiv med potovanji, med zdravljenjem z antibiotiki ter ob spremenjeni prehrani«.

Zanimiv je primer enega od proizvajalcev, ki je določen čas tržil tri izdelke z istim sevom in različnimi formulacijami, pri čemer sta bila dva deklarirana kot prehransko dopolnilo, eden pa kot živilo za posebne zdravstvene namene. Pri tem sta bili ciljna populacija in farmacevtska oblika izdelka, ki so ga tržili kot živilo za posebne zdravstvene namene, in enega od prehranskih dopolnil identični. V tem primeru se lahko vprašamo o upravičenosti uvrščanja takih izdelkov v povsem različne kategorije. Ni presenetljivo, da so se očitno razlikovale tudi oznake na omenjenih izdelkih, saj je bilo živilo za posebne zdravstvene namene opremljeno z nekaj zdravstvenimi trditvami (»za dietetsko uravnavanje prebavnih motenj pri dojenčkih od rojstva dalje in otrocih«, »driske med zdravljenjem z antibiotiki«, »vzdrževanje uravnotežene črevesne mikrobiote«), prehransko dopolnilo pa ne. Kasneje so sicer izdelek, ki je bil v iz kategorije živil za posebne zdravstvene namene, prekvalficirali v prehransko dopolnilo, zdravstvene trditve pa strnili v »za uravnoteženo črevesno mikrofloro«, vendar pa pri opisih izdelka v nekaterih spletnih lekarnah še vedno ostajajo zapisane prvotne trditve (37, 38).

Če povzamemo rezultate prvega dela raziskave, v katerem smo pregledali oznake pri 18 prehranskih dopolnilih (ne-

katere so bile pri dveh izdelkih identične, zato je zapisov v preglednici 1 manj), lahko zaključimo, da je izraz probiotik zapisan pri 11 od 18 pregledanih prehranskih dopolnil (61 %), ostali proizvajalci pa namesto tega navajajo opis »mlečnokislinske bakterije« ali »koristne bakterije«. Čeprav neposrednih zdravstvenih trditev, da probiotiki zdravijo ali preprečujejo določene bolezni, nismo zasledili, pa so skoraj pri polovici pregledanih prehranskih dopolnil deklaracije vprašljive zaradi trditev, ki lahko navajajo na zdravstvene učinke. Od decembra 2012 v EU izraza »probiotik« pri živilih, vključno s prehranskimi dopolnili, ne bi smeli uporabljati, saj že sama beseda namiguje na to, da izdelek lahko vpliva na zdravje. Mnogi so mnenja, da je tako omejevanje pretirano, če je izdelek kakovosten (ustrezno število živih mikroorganizmov, natančno opredeljenih sevov). V okviru slovenskega ciljnega raziskovalnega projekta »Prehranske in zdravstvene trditve na živilih« iz let 2011–2013 so navedbe »probiotik«, »probiotične kulture« in »probiotične bakterije«, ki so jih zasledili pri 33 % pregledanih jogurtov in fermentiranih mlečnih napitkov, obravnavali kot splošne zdravstvene trditve, ki so znanstveno neutemeljene (39). Sicer pa uporabo izraza »probiotik« ali »probiotični« v Sloveniji tudi po letu 2013 na splošno toleriramo.

Zelo razumno se zdi stališče odbora uglednih znanstvenikov, delujočih v okviru Mednarodnega znanstvenega združenja za probiotike in prebiotike ISSAP (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*) (40), naj pojem »probiotični« uporabljamo samo za izdelke, ki vsebujejo ustrezno število živih, natančno opredeljenih sevov mikroorganizmov, za katere je mogoče pričakovati, da bodo delovali v korist zdravja in dobrega počutja gostitelja. Razlikujejo med tremi kategorijami izdelkov: tistimi brez zdravstvenih trditev, tistimi z zdravstvenimi trditvami in probiotičnimi zdravili. Uvrščanje v posamezno kategorijo bi bilo mogoče samo na osnovi dokazov iz kliničnih raziskav, pri čemer za prvo kategorijo ne bi bilo potrebno dokazovanje za seve v izdelku, ampak bi zadostovali podatki v literaturi za to vrsto, v drugih dveh kategorijah pa bi bilo to dokazovanje potrebno. Od probiotikov brez zdravstvenih trditev bi pričakovali splošne učinke pri ohranjanju zdravja, od tistih z zdravstvenimi trditvami učinke pri podpori zdravljenju, od probiotičnih zdravil pa neposredne učinke vplivanja na bolezen, pri čemer bi se trditve za zdravila in druge probiotike seveda razlikovale. Menijo, da bi taka ureditev prispevala k napredku in zagotovila nadaljnji interes in vlaganja s strani industrije.

Kar zadeva navajanje imen sevov, kar je za probiotike zelo pomembno in je zapisano že v smernicah FAO/WHO iz

leta 2002 (41), rezultati te raziskave kažejo, da je stanje dobro, saj le pri treh izdelkih nismo našli oznak za seve, ampak samo imena vrst (preglednica 2). Pri prejšnji raziskavi (16) pri več kot polovici izdelkov (11 od 20) oznak za seve

ni bilo. Nekateri proizvajalci so dopolnili deklaracije z imeni sevov, en proizvajalec pa je pri dveh izdelkih popravil napačno poimenovanje vrste iz *Lactobacillus sporogenes*, ki je zastarelo ime, v pravilno *Bacillus coagulans*.

Preglednica 2: Ustreznost probiotičnih prehranskih dopolnil ($n = 18$) in živil za posebne zdravstvene namene ($n = 1$) iz slovenskih lekarn glede prisotnosti deklariranih bakterijskih vrst in njihovega števila.

Table 2: Suitability of probiotic dietary supplements ($n=18$) and foods for special medical purposes ($n=1$) from Slovenian pharmacies in terms of the presence of labelled bacterial species and their number.

Deklarirani sevi	Čas do izteka (mesece)	Deklarirano število	Ugotovljeno število	Ustreznost
Prehranska dopolnila				
<i>L. acidophilus</i> LAB ATCC7050 <i>L. acidophilus</i> LA-14 <i>L. paracasei</i> LPC-37 <i>L. plantarum</i> LP-115 <i>B. lactis</i> BL-04	18	$1,6 \times 10^{10}$ cfu /stekleničko; $1,1 \times 10^{10}$ cfu /stekleničko <i>L. acidophilus</i> LAB ATCC7050 ter $0,5 \times 10^{10}$ cfu/stekleničko mešanice ostalih štirih sevov	Bifidobakterije: $< 10^5$ cfu/stekleničko Laktobacili: $< 10^5$ cfu/stekleničko;	ne ustreza – premajhno število (podobno tudi leta 2009)
L. gasseri PA 16/8 B. bifidum MF 20/5 B. longum SP 07/3	19	10^7 cfu/tableto	$3,9 \times 10^7$ cfu/tableto	ustreza (ustrezno tudi leta 2009)
L. reuteri Protectis DSM 17938	9	10^8 cfu/tableto	$9,9 \times 10^7$ cfu/tableto	ustreza (leta 2009 je bilo število premajhno)
L. acidophilus La-14 L. bulgaricus Lb-64 B. coagulans BC599 S. thermophilus St-21 B. animalis lactis BI-04 B. breve Bb-03	16	$7,5 \times 10^8$ cfu/kapsulo	$2,5 \times 10^8$ cfu/kapsulo	delno ustreza – število je 0,48 log cfu manjše od deklariranega (leta 2009 izdelek ni bil ustrezen)
L. acidophilus La-14L. <i>bulgaricus</i> Lb-64 B. coagulans BC599 S. thermophilus St-21 B. animalis lactis BI-04 B. breve Bb-03	16	$1,5 \times 10^9$ cfu/vrečko	$1,2 \times 10^9$ cfu/vrečko	delno ustreza – število je za 0,1 log manjše od deklariranega, prisotnosti ene od deklariranih vrst nismo uspeli potrditi (leta 2009 izdelek ni bil ustrezen)
L. reuteri Protectis	14	10^8 cfu/5 kapljic	$2,1 \times 10^7$ cfu/5 kapljic	ne ustreza – premajhno število (enako leta 2009)

B. bifidum B. lactis L. acidophilus (2×) L. paracasei L. plantarum L. rhamnosus L. salivarius E. faecium	9	5 × 10 ⁹ cfu/vrečko	1,1 × 10 ¹⁰ cfu/vrečko	ustreza (ustrezen tudi leta 2009)
L. gasseri PA 16/8 B. bifidum MF 20/5 B. longum SP 07/3	25	1,0 × 10 ⁷ cfu/tableto	3,6 × 10 ⁷ cfu/tableto	ustreza (leta 2009 število ni bilo deklarirano)
L. acidophilus (La-14) L. casei (Lc-11) L. rhamnosus (Lr-32) L. salivarius (Ls-33) S. thermophilus (St-21) B. bifidum (Bb-02) B. longum (BI-05) B. lactis (BI-04)	15	Ob proizvodnji: 1,1 × 10 ¹⁰ cfu /kapsulo Konec roka uporabnosti: 4 × 10 ⁹ cfu/kapsulo; L. acidophilus (La-14): 1,2 × 10 ⁹ cfu/kapsulo L. casei (Lc-11): 6 × 10 ⁸ cfu/kapsulo L. rhamnosus (Lr-32): 6 × 10 ⁸ cfu/kapsulo L. salivarius (Ls-33): 6 × 10 ⁸ cfu/kapsulo S. thermophilus (St-21): 4 × 10 ⁸ cfu/kapsulo B. bifidum (Bb-02): 2 × 10 ⁸ cfu/kapsulo B. longum (BI-05): 2 × 10 ⁸ cfu/kapsulo B. lactis (BI-04): 2 × 10 ⁸ cfu/kapsulo Laktobacili skupaj: 3 × 10 ⁹ cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 6 × 10 ⁸ cfu/kapsulo	Laktobacili skupaj: 1,1 × 10 ⁹ cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 1,7 × 10 ⁸ cfu/kapsulo S. thermophilus : 7,1 × 10 ⁷ cfu/kapsulo Skupaj: 1,3 × 10 ⁹ cfu/kapsulo	ne ustreza – število je premajhno (laktobacili za 0,44 log cfu, bifidobakterije za 0,55 log cfu, <i>S. thermophilus</i> za 0,75 log cfu)
L. plantarum L. casei L. rhamnosus L. acidophilus B. lactis	18	L. plantarum : 1 × 10 ⁹ cfu/kapsulo L. casei : 8 × 10 ⁸ cfu/kapsulo L. rhamnosus : 7 × 10 ⁸ cfu/kapsulo L. acidophilus : 5 × 10 ⁸ cfu/kapsulo B. lactis : 5 × 10 ⁸ cfu/kapsulo Laktobacili skupaj: 3,0 × 10 ⁹ cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 5,0 × 10 ⁸ cfu/kapsulo (ob času izdelave)	Laktobacili skupaj: 5,6 × 10 ⁸ cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: 5,6 × 10 ⁸ cfu/kapsulo	Podatek o vsebnosti je podan le ob času izdelave, zato ocena ustreznosti ni mogoča. Ene od deklariranih vrst v izdelku nismo uspeli potrditi.



L. rhamnosus LrGG-100 B. breve BB S01 S. thermophilus ST-228 L. casei subsp. casei LC-88 L. bulgaricus LB-271 L. acidophilus LA-99 B. longum BL-11	12	$1,6 \times 10^9$ cfu/2 kapsuli	$2,6 \times 10^9$ cfu/2 kapsuli	ustreza
<i>L. acidophilus</i> <i>S. salivarius</i> K12	10 dni	$3,0 \times 10^9$ cfu/kapsulo; <i>L. acidophilus</i> : $2,0 \times 10^9$ cfu/kapsulo <i>S. salivarius</i> : $1,0 \times 10^9$ cfu/kapsulo	< 1000 cfu/kapsulo	ne ustreza – število je premajhno
L. rhamnosus LR-32 B. lactis BL-04	16	$2,0 \times 10^9$ cfu/2 vrečki	Skupaj: $6,4 \times 10^9$ cfu/2 vrečki	ustreza
B. bifidum (HA-132) B. longum (HA-135) <i>L. acidophilus</i> (HA-122) L. paracasei (HA-196) L. rhamnosus (HA-111)	16	$2,0 \times 10^9$ cfu/kapsulo Laktobacili skupaj: $1,6 \times 10^9$ cfu/kapsulo Bifidobakterije skupaj: $4,0 \times 10^8$ cfu/kapsulo <i>L. acidophilus</i> : $2,0 \times 10^8$ cfu/kapsulo	Laktobacili skupaj: $1,8 \times 10^9$ cfu/g kapsulo Bifidobakterije skupaj: $2,7 \times 10^8$ cfu/kapsulo <i>L. acidophilus</i> : $2,1 \times 10^9$ cfu/kapsulo Skupaj $4,2 \times 10^9$ cfu/kapsulo	ustreza
L. rhamnosus GG	21	$1,4 \times 10^9$ cfu/7 kapljic	$1,8 \times 10^9$ cfu/7 kapljic	ustreza
L. rhamnosus GG	10	$1,4 \times 10^9$ cfu/7 kapljic	$3,1 \times 10^8$ cfu/7 kapljic	ne ustreza – število je premajhno
L. rhamnosus GG	21	$1,0 \times 10^9$ cfu/kapsulo	$5,4 \times 10^9$ cfu/kapsulo	delno ustreza (število je za 0,27 log cfu manjše od deklariranega)
L. acidophilus L. casei L. plantarum L. reuteri L. rhamnosus B. longum S. thermophilus	10	10^9 cfu/tableto	$8,0 \times 10^8$ cfu/tableto	delno ustreza (število je za 0,10 log cfu manjše od deklariranega)

ŽIVILA ZA POSEBNE ZDRAVSTVENE NAMENE

<p>S. thermophilus DSM 24731 <i>B. breve</i> DSM 24732 B. longum DSM 24736 <i>B. infantis</i> DSM 24737 L. acidophilus DSM 24735 L. plantarum DSM 24730 L. paracasei DSM 24733 <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> DSM 24734</p>	15	4,5 × 10 ¹¹ probiotičnih bakterij/vrečko	8,0 × 10 ¹¹ cfu/vrečko	ne ustreza – število sicer ustreza deklaraciji, vendar nismo uspeli potrditi prisotnosti treh deklariranih vrst
---	----	---	-----------------------------------	--

B. rod *Bifidobacterium*

L. rod *Lactobacillus*

B. rod *Bacillus*

S. rod *Streptococcus*

E. rod *Enterococcus*

cfu število kolonijskih enot (*colony forming units*)

Imena deklariranih vrst, ki smo jih v izdelku potrdili z za vrsto specifično PCR, so odebeljena.

Kar zadeva število in prisotnost deklariranih bakterij, nismo zasledili bistvenega izboljšanja glede na predhodno raziskavo, ki je opozorila na premajhno število živih bakterij kar pri 75 % pregledanih izdelkov (16). Pri osmih izdelkih, ki so bili vključeni v obe raziskavi, smo pri polovici ugotovili število kolonijskih enot, manjše od deklariranega, v obeh raziskavah (pri dveh tokrat za manj kot 0,5 log₁₀). Dva izdelka sta se izkazala za ustrezna v obeh raziskavah, dva pa le v zadnji. Od izdelkov, s katerimi smo se prvič srečali v tej raziskavi, so bili štiri izdelki ustrezni, pet pa jih je vsebovalo manj živih bakterij od deklariranih, pri čemer jih v enem izdelku sploh nismo zasledili, pri dveh pa so bila odstopanja manjša od 0,5 log₁₀. Razlik, manjših od polovice log₁₀, navadno ne obravnavamo kot pomembno odstopanje od deklariranih vrednosti, saj moramo upoštevati tudi običajna odstopanja metode štetja na ploščah (42). Pri enem izdelku je bil deklariran podatek o številu probiotičnih bakterij ob času proizvodnje, tako da o ustreznosti ne moremo soditi. Eden izmed izdelkov, ki smo ga kupili v spletni lekarni, je imel ob dobavi do izteka roka trajanja le še 30 dni. Ker je v izdelku 90 kapsul, zaužili pa naj bi eno na dan, ni mogoče, da bi vse tablete zaužili znotraj navedenega roka trajanja. Ob naročilu izdelka nas na to niso opozorili, medtem ko smo pri drugi spletni lekarni opazili, da so probiotični izdelek, ki je bil tik pred iztekom roka uporabnosti, prodajali po 50 % nižji ceni.

Izdelek iz skupine živil za posebne zdravstvene namene je glede števila živih bakterij v izdelku ustrezal navedbam na deklaraciji, vendar pa nismo uspeli potrditi prisotnosti kar

treh od osmih deklariranih bakterijskih vrst. Pri prehranskih izdelkih je večina izdelkov (13 od 16) vsebovala vse deklarirane vrste, pri treh izdelkih pa prisotnosti ene od petih oz. šestih deklariranih vrst nismo potrdili.

Skladnost vsebnosti probiotičnih bakterij z deklariranimi števili kolonijskih enot (cfu/g ali cfu/enoto izdelka) ter pravilnost pri navajanju drugih podatkov (pravilna imena sevov, priporočeni odmerki izdelka, podatki o drugih sestavinah) mora biti zagotovljena že zaradi upoštevanja krovne živilske zakonodaje (Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom), v kateri je zapisano, da morajo biti vsa prehranska dopolnila varna za uživanje in primerno označena (36).

Na pomanjkljivosti probiotičnih izdelkov, predvsem prehranskih dopolnil s probiotiki, raziskovalci opozarjajo že vrsto let (16-22). Tudi nedavne raziskave kažejo, da kakovost še vedno ni zadovoljiva. Od 52 probiotičnih prehranskih dopolnil z ameriškega tržišča jih 33 % ni zadostilo deklariranim številom kolonijskih enot, še več (42 %) pa je bilo takih s pomanjkljivimi taksonomskimi podatki, manjkajočimi vrstami ali prisotnostjo nedeklariranih vrst (43). Samo en izdelek od 16, prav tako z ameriškega tržišča, je vseboval prav vse deklarirane vrste oz. podvrste bifidobakterij (44). Prehranska dopolnila z italijanskega tržišča (14) so se nekoliko bolje odrezala glede števila kolonijskih enot, saj na polovici roka uporabnosti le pri treh izdelkih število ni dosegalo deklariranega, tri mesece pred iztekom pa pri petih. Poleg tega je bil en sev napačno poimenovan (*L. casei* namesto *L. paracasei*) (45). V pet let starejši raziskavi (2011), v kateri so zajeli 24 prehranskih dopolnil s



probiotiki z italijanskega tržišča, so našli več neustreznih (42 %), kar zadeva število kolonijskih enot. Poleg tega pri štirih izdelkih niso izsledili živih predstavnikov katere od deklariranih vrst, pri dveh od teh pa so posamezne vrste izostale tudi pri molekularnih analizah, kjer zajamemo tudi nežive bakterije (42). Pregled 25 izdelkov s poljskega tržišča, med katerimi je bilo največ prehranskih dopolnil (16), nekaj živil za posebne zdravstvene namene (7) in dva medicinska izdelka, je prav tako pokazal nekaj pomanjkljivosti (46). Pri treh izdelkih so odkrili neujemanje deklariranih vrst z najdenimi, pri treh pa živih bakterij niso detektirali. Veliko izdelkov je vsebovalo premalo živih bakterij, pri čemer so bile opazne velike razlike med serijami in glede na čas, ki je minil od proizvodnje. V predhodni slovenski raziskavi smo s preiskovanjem bakterijskih kolonij z za vrsto specifično PCR večinoma (pri 14 izdelkih od 20) potrdili prisotnost navedenih vrst, z izjemo izdelkov z velikim številom različnih bakterijskih sevov (6-8 sevov), pri katerih v nobenem primeru med živimi bakterijami nismo našli vseh navedenih vrst (16).

Medtem ko za ugotavljanje števila živih probiotikov v izdelkih ne moremo brez klasičnega štetja na ploščah, vsaj dokler bodo proizvajalci navajali število probiotikov v teh enotah, pa so za potrjevanje deklariranih vrst ali podvrst nujne molekularne metode. Kot kažejo zgoraj omenjene raziskave, je najbolj razširjena za te namene metoda verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR). Moramo pa upoštevati, da skupno bakterijsko DNA lahko pridobimo neposredno iz izdelka ali pa iz izraslih kolonij. V prvem primeru nam rezultati analiz ne povedo ničesar o živosti predstavnikov najdene vrste, v drugem primeru pa ciljamo le na žive bakterije v izdelku oz. natančneje na kultivabilne bakterije. Danes so na voljo tudi izboljšane metode, kot je metoda PCR v realnem času, ki v kombinaciji s tretiranjem vzorcev s propidijevim monoazidom (PMA-PCR) omogoča razlikovanje nepoškodovanih bakterij od mrtvih (47). Tudi tekočinska citometrija se uveljavlja kot standardna metoda za preiskovanje živosti probiotičnih bakterij v izdelkih, vendar za razliko od PMA-PCR ne omogoča razlikovanja med vrstami (48).

Kar zadeva kontaminante, jih najlaže izsledimo z zmogljivimi molekularnimi metodami, kot so sekvenciranje nove generacije (NGS, *next generation sequencing*) ali hibridizacija na mikromrežah DNA. S temi analizami morebitne kontaminante sicer odkrijemo, ne vemo pa, ali so dejansko živi, neživi ali pa smo zasledili le DNA, ki pripada nedeklariranim vrstam, zato v teh primerih proizvajalcem težko očitamo odstopanje od kakovosti. Toda tudi taki pristopi si utirajo pot v kontrolo kakovosti probiotičnih izdelkov.

Tako imenovana »*FDA GutProbe*«, na primer, je uporabna za identifikacijo deklariranih bakterij v izdelkih z zmesjo probiotičnih sevov, do ravni vrste in seva, ter za ugotavljanje razlike v sestavi med serijami, kar je uporabno predvsem za zagotavljanje dobre proizvodne prakse (49). Uporabno in vse dostopnejše je tudi masovno globinsko sekvenciranje pomnožkov za 16S rDNA, ki je najbolj razširjen filogenetski označevalec, pri čemer uporabimo celotno bakterijsko DNA iz vzorcev in lahko za veliko vzorcev naenkrat dobimo vrstno sestavo in kvantitativno relativno zastopanost posameznih vrst (43). Tak pristop je možen šele danes, ko so na voljo celi genomi za številne bakterijske vrste in ko je ugotavljanje celih genomov pri industrijskih sevih postalo dosegljivo. Dokler genomi posameznih industrijskih sevov niso javno dostopni, pa prednosti lahko izkoristijo le proizvajalci sami. Morovic in sod. (43), na primer, so izkoristili tako javno dostopne genome kot tiste iz lastne podatkovne zbirke (*Du Pont Nutrition and Health*), da so skonstruirali začetne oligonukleotide za multiplex PCR, ki so jo uspešno uporabili za potrjevanje deklariranih in detekcijo nedeklariranih vrst ali podvrst v komercialnih probiotičnih izdelkih na ameriškem trgu.

Dejstvo, da metoda štetja na ploščah, ki jo tradicionalno uporabljamo za ugotavljanje kakovosti probiotičnih izdelkov, ni najprimernejša, je splošno sprejeto. Med glavnimi pomanjkljivostmi te metode je nezadostna selektivnost razpoložljivih gojišč, kar lahko vodi v precenjeno število posameznih probiotičnih bakterij. Upoštevati moramo tudi, da sposobnosti razmnoževanja oz. kultivabilnosti probiotičnih bakterij v laboratorijskih razmerah ne moremo enačiti z živostjo in aktivnostjo. A dokler proizvajalci deklarirajo probiotične bakterije na izdelkih v enotah cfu/g ali cfu/enoto izdelka, štetje na ploščah (50) ostaja nepogrešljiva metoda za ugotavljanje kakovosti, vsaj kar zadeva deklarirano število probiotičnih sevov v izdelku. Hitrejše in velikokrat tudi cenejše naprednejše metode pa so le dobrodošla alternativa, uporabna v rutinski kontroli med proizvodnjo. Za potrjevanje identitete sevov ali vrst pa so omenjene alternativne metode povsem primerne. Metodi PCR ali multiplex PCR ostaja še vedno najuporabnejša za potrjevanje vrste ali podvrste, pri čemer najbolj razširjen filogenetski označevalec 16S rDNA v zadnjem času nadomeščajo z drugimi, kot je npr. gen za glukoza-6-fosfat izomerazo (*pgi*) (43).

V času, ko smo soočeni s spreminjanjem urejanja področja probiotikov, ne samo v Evropi, ampak tudi v drugih delih sveta, je pomembno slediti spremembam in razvoju metod, ki so uporabne tudi za kontrolo kakovosti probiotičnih izdelkov.

4 SKLEP

Proizvajalci so se do neke mere odzvali na nova pravila EU o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih, ki veljajo tudi za prehranska dopolnila. To je opazno v označevanju izdelkov na deklaracijah (ovojnina oziroma priloženi lističi z informacijami) in njihovem oglaševanju ter trženju, kjer so proizvajalci, razen redkih izjem, opustili navajanje pričakovanih učinkov na zdravje ljudi. Podobno kot smo ugotovili že v raziskavi kakovosti probiotičnih izdelkov iz slovenskih lekarn pred sedmimi leti, tudi izsledki te raziskave kažejo na nezadostno kakovost probiotičnih prehranskih dopolnil, ki se kaže v odstopanju pri številu živih probiotičnih bakterij oz. v odsotnosti deklariranih vrst, ter na potrebo po redni kontroli kakovosti tovrstnih izdelkov.

5 LITERATURA

1. *Pravilnik o prehranskih dopolnilih (Uradni list RS, št. 82/03, 44/04, 72/05, 22/07, 104/10 in 66/13).*
2. *Uredba o izvajanju uredbe (ES) Evropskega Parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (Uradni list RS, št. 80/07).*
3. *Uredba o izvajanju uredbe (ES) Evropskega Parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (Uradni list RS, št. 38/07).*
4. *European Commission. EU register on nutrition and health claims. http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=register.home. Dostop: 27-9-2017.*
5. *Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih.*
6. *Starling S: Yakult wins Swiss probiotic health claim. <http://www.Nutraingredients.Com/regulation-policy/yakult-wins-swiss-probiotic-health-claim>. Dostop: 27-9-2017.*
7. *Reid G. Probiotics: Definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Cl Ga* 2016; 30: 17-25.*
8. *Health Canada. Guidance document for the use of probiotic microorganisms in food.*
9. *Sanders ME, Levy DD. The science and regulations of probiotic food and supplement product labeling. *Ann Ny Acad Sci* 2011; 1219: E1-E23.*
10. *FDA. Label claims for conventional foods and dietary supplements. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/Labeling/Nutrition/ucm111447.htm>. Dostop: 27-9-2017.*
11. *Arora M, Sharma S, Baldi A. Comparative Insight of Regulatory Guidelines for Probiotics in USA, India and Malaysia: A Critical Review. *Int J Biotechnol Wellness Ind* 2013; 2: 51-64.*
12. *Food Safety and Standards Authority of India. Direction under section 16(5) of Food Safety and Standards Act, 2006 regarding operationalisation of standards of Health Supplements, Nutraceuticals, Food for Special Dietary Use, Food for Special medicinal Purpose, Functional Food and Novel Food. http://old.fssai.gov.in/Portals/0/pdf/Direction_Operationalisation_HS_SMP_NF_Nutra_24_11_2016.pdf. Dostop: 27-9-2017.*
13. *Consumer Affairs Agency, Government of Japan. What are foods with function claims. http://www.caa.go.jp/foods/pdf/151224_1.pdf. Dostop: 27-9-2017.*
14. *Zakon. o zdravilih (Uradni list RS, št. 9/96, 19/96 – popr., 101/99 – ZZMP, 52/00 – ZZUZIS in 17/14 – ZZdr-2).*
15. *Pravilnik o živilih za posebne zdravstvene namene (Uradni list RS, št. 54/07, 2/09 in 38/14).*
16. *Bogovič Matjašič B, Zorič Peternel M, Rogelj I. Ugotavljanje deklariranih bakterij v probiotičnih prehranskih dopolnilih in zdravilih na slovenskem trgu. *Farm Vest* 2010; 61: 263-269.*
17. *Hamilton-Miller JM, Shah TS, Winkler JT. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Pub Health Nutr* 1999; 2: 223-229.*
18. *Temmerman R, Pot B, Huys G et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol* 2003; 81(1): 1-10.*
19. *Elliot E, Teversham K. An evaluation of nine probiotics available in South Africa, August 2003. *S Afr Med J* 2004; 94(2): 121-4.*
20. *Aureli P, Fiore A, Scalfaro C et al. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *Int J Food Microbiol* 2010; 137(2-3): 265-273.*
21. *Huff BA. Caveat emptor. "Probiotics" might not be what they seem. *Can Fam Physician* 2004; 50: 583-7.*
22. *Bogovič Matjašič B, Rogelj I. Demonstration of suitability of probiotic products. An emphasis on survey of commercial products obtained on Slovenian market. *Agro Food Ind Hi Tech* 2006; 17(3): 38-40.*
23. *ISO 29981: Milk products – enumeration of presumptive bifidobacteria – colony count technique at 37 °C, 2010.*
24. *ISO 20128: Milk products – enumeration of presumptive Lactobacillus acidophilus on a selective medium - colony-count technique at 37 °C, 2006.*
25. *Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T et al. Comparison of real-time PCR with SYBR green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 2003; 149: 269-277.*
26. *Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R et al. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Env Microbio*, 1999; 65: 4506-4512.*
27. *Song Y-L, Kato N, Liu C-X et al. Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex pcr assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 187: 167-173.*
28. *Ward LJH, Timmins MJ. Differentiation of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 90-92.*
29. *Chagnaud P, Machinis K, Coutte LcA et al. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: Application to six common Lactobacillus species. *J Microbiol Meth* 2001; 44: 139-148.*



30. Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A et al. Detection and identification of gastrointestinal lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Env Microbiol* 2000; 66: 297-303.
31. Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl Env Microbiol* 1999; 65: 4351-4356.
32. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 24-27.
33. Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int J Food Microbiol* 1997; 35: 49-56.
34. Liu Y, Liu S, Zhou F et al. Study on rapid detection of *Bacillus coagulans* by PCR. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* 2010; 4: 712-713.
35. Lekarnar.com, spletna poslovalnica Lekarne Nove Poljane. <http://www.lekarnar.com/izdelki/yogermi-100-kapsule>. Dostop: 09-06-2017.
36. Zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (Uradni list RS, št. 42/02 in 47/04).
37. Moja lekarna, spletna poslovalnica Lekarne Žužemberk. <https://www.moja-lekarna.com/waya-lgg-probiotice-kapljice-za-dojencke-in-otroke-10-ml>. Dostop: 26-04-2017.
38. Lekarnar.com, spletna poslovalnica Lekarne Nove Poljane. <http://www.lekarnar.com/izdelki/waya-lgg-probiotice-kapljice-za-dojencke-in-otroke>. Dostop: 26-04-2017.
39. Pravst I, Kušar A, Pohar J et al. Prehranske in zdravstvene trditve na živilih v Sloveniji. Zaključno poročilo CRP projekta V7-110, 2011; http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/D ELOVNA_PODROCJA/Zivila/trditve/CRP-Zagotovimo_si_hrano-Zakljucno_porocilo.pdf. Dostop: 27-9-2017
40. Hill C, Guarner F, Reid G et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastro Hepa*, 2014; 11:506-514.
41. FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, April 30 – May 1, 2002. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf?ua=1. Dostop: 27-9-2017.
42. Toscano M, de Vecchi E, Rodighiero V et al. Microbiological and genetic identification of some probiotics proposed for medical use in 2011. *J Chemotherap*, 2013; 25:156-161.
43. Morovic W, Hibberd AA, Zabel B et al. Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of commercial probiotic products reveals composition biases. *Front Microbiol* 2016; 7.
44. Lewis ZT, Shani G, Masarweh CF et al. Validating bifidobacterial species and subspecies identity in commercial probiotic products. *Pediatr Res* 2016; 79:445-452.
45. Blandino G, Fazio D, Petronio GP et al. Labeling quality and molecular characterization studies of products containing *Lactobacillus* spp. strains. *Int J Immunopath Ph* 2016; 29:121-128.
46. Zawistowska-Rojek A, Zareba T, Mrówka A et al. Assessment of the Microbiological Status of Probiotic Products. *Pol J Microbiol* 2016; 65:97-104.
47. Kramer M, Obermajer N, Bogovič Matijašič B et al. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 84(6): 1137-1147.
48. ISO 19344 (IDF 232): Milk and milk products – starter cultures, probiotics and fermented products – quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry, 2015.
49. Patro JN, Ramachandran P, Lewis JL et al. Development and utility of the FDA 'GutProbe' DNA microarray for identification, genotyping and metagenomic analysis of commercially available probiotics. *J Appl Microbiol* 2015; 118:1478-1488.
50. ISO 7889 (IDF 117): Yogurt — enumeration of characteristic microorganisms — colony-count technique at 37 °C, 2003.