MICROBIOMA MICROBIOTA
Ricerca & Clinica
n. 1/2018

Comitato Scientifico

Claudio Mencacci
Dipartimento di Neuroscienze, Salute Mentale-Dipendenze, ASST Fatebenefratelli Sacco, Milano

Alberto Pilotto
Dipartimento Cure Geriatriche, OrtoGeriatria e Riabilitazione, Area delle Fragilità, E.O. Ospedali Galliera, Genova

Andrea Poli
Nutrition Foundation of Italy, Milano

Sergio Riso
S.C. Scienza dell'Alimentazione e Dietetica, A.O.U. "Maggiore della Carità", Novara

Indice

2 **Microbiota e cancro**
S. Riso, E. Cava, D. Carrera, D. Farinelli

5 **Trapianto di microbiota**
A. Poli

7 **Il microbiota in gravidanza**
C. Mencacci, V. Salvi

9 **Microbiota e malattia renale cronica**
G. Garibotto

12 **ABC della diagnostica: la tipizzazione del microbiota per la valutazione di disbiosi**
N. Sacchi, M. Castagnetta, A. Chiesa

14 **Microbioma-microbiota: dal laboratorio alla clinica**
M. Castagnetta, A. Pilotto

16 **Dalla Letteratura**
a cura di A. Pilotto

PACINI EDITORE MEDICINA

www.pacinimedicina.it

MICROBIOTA E CANCRO

Sergio Riso, Edda Cava, Deborah Carrera, Deborah Farinelli

S.C. Scienza dell'Alimentazione e Dietetica, A.O.U. "Maggiore della Carità", Novara

Il microbiota condiziona la suscettibilità alla malattia neoplastica, attraverso effetti metabolici e di modulazione sulla risposta immunitaria. I microbi patogeni sono responsabili del processo di cancerogenesi nel 15-20% dei casi di tumore. Tuttavia, sulla base di studi di sequenziamento metagenomico, un numero ancora maggiore di neoplasie maligne risulta associato a un'alterata composizione del microbioma commensale (disbiosi). Sebbene gli studi sull'uomo non siano al momento in grado di distinguere se i cambiamenti del microbiota sono causa o effetto del tumore, un ruolo causale sembra supportato da rigorosi studi preclinici sull'animale.

Questi lavori dimostrano che il microbiota può influenzare la predisposizione e la progressione del cancro attraverso vari meccanismi, come la modulazione dell'infiammazione, l'induzione di danni al DNA e la produzione di metaboliti coinvolti nell'oncogenesi o nella soppressione tumorale.

Recenti evidenze sottolineano inoltre la possibilità di manipolazione del microbiota attraverso l'utilizzo di probiotici come adiuvanti per l'immunoterapia oltre all'impiego di molecole ad azione mirata sugli enzimi microbici, al fine di migliorare l'efficacia dei trattamenti antineoplastici.

MECCANISMI MICROBICI DI ONCOGENESI E DI SOPPRESSIONE TUMORALE

Dieta, stile di vita, fattori genetici e ambientali sono i principali responsabili della composizione microbica di un individuo, in ogni stadio della vita. Alterazioni dell'ecosistema microbico possono avere ripercussioni sull'omeostasi dell'ospite e promuovere l'insorgenza di patologie, tra cui il cancro.

I batteri intestinali possono esercitare effetti oncogenici o tumore-soppressivi sia a livello locale sia, attraverso la circolazione sanguigna, a livello distale/sistemico [1]. Alcuni degli effetti promotori il processo di oncogenesi sono rappresentati da (vedi numerazione nel riquadro di sinistra della Figura 1): 1) produzione di oncometaboliti (idrogeno solforato, nitroso-composti); 2) compromissione della funzione di barriera intestinale, con aumentata esposizione delle cellule del sistema immunitario nei confronti di endotossine batteriche (ad es. lipopolisaccaridi) e antigeni; 3) azione proinfiammatoria da parte di metaboliti e antigeni batterici, tramite alterazioni delle sottopolazioni cellulari (ad es. attivazione di linfociti T-helper 17 da parte di batteri filamentosi segmentati) e iperattivazione della risposta immunitaria mediata da citochine proinfiammatorie (ad es. interleuchina 6); 4) presenza di fattori di virulenza (ad es. isole di patogenicità cromosomica) in base ai quali è possibile distinguere i patogeni dai commensali (ad es. *Escherichia coli* polichetide sintasi, responsabile di danni al DNA e di alterazioni delle vie di segnalazione cellulare).

Il microbiota, tuttavia, è in grado di esplicare anche effetti locali/gastrointestinali benefici (vedi numerazione nel riquadro centrale della Figura 1): 5) produzione di metaboliti tumore-soppressivi, come il butirrato (ad azione immunosoppressiva e regolatrice sulla proliferazione cellulare e sull'apoptosi); 6) mantenimento della funzione epiteliale di barriera; 7) azione diretta sulle cellule del sistema immunitario finalizzata alla prevenzione dell'infiammazione (attraverso una regolazione delle sottopopolazioni cellulari) e alla riduzione della risposta cellulare (tramite la produzione di citochine immunosoppressive: ad es. IL-10); 8) azione competitiva nei confronti di batteri patogeni.

Infine, il microbiota intestinale, può esercitare effetti oncogenici o tumore-soppressivi a livello distale/sistemico attraverso la circolazione sanguigna di batteri, metaboliti microbici, cellule immunitarie attivate o soppresse e citochine (riquadro di destra della Figura 1).

L'oncogenicità di alcuni patogeni come il papillomavirus e l'*Helicobacter pylori* è ben nota, tuttavia, studi recenti suggeriscono che anche batteri commensali e patogeni opportunisti possono avere un ruolo non meno importante [2].

In individui con predisposizione genetica, la presenza di *Fusobacterium nucleatum* comporta, in risposta al consumo di carne rossa, danno al DNA, instabilità genomica, infiammazione e protezione tumorale dall'attacco del sistema immunitario. Inoltre, nella mucosa delle neoplasie del colon è particolarmente elevata la presenza di *Escherichia coli*, produttrice di una proteina genotossica (colibactina) e di *Bacteroides fragilis* produttore di enterotossine (lipopolisaccaride e flagellina) ad azione infiammatoria.

Il microbiota intestinale è anche in grado di trasformare componenti bioattivi presenti nella dieta in metaboliti ad azione preventiva. Ad esempio, il butirrato, acido grasso a catena corta derivante dalla fermentazione delle fibre solubili, presenta importanti effetti antinfiammatori e, attraverso l'inibizione dell'enzima istone deacetilasi, effetti regolatori sull'espressione dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi.

Tra i polifenoli presenti nella dieta si distingue in particolare l'acido ellagico, contenuto nei frutti di bosco e nelle noci, che svolge un'importante azione antinfiammatoria una volta metabolizzato in urolitina.

La presenza di batteri solfato-riduttori favorisce poi, a partire dalla daidzeina (isoflavone della soia), la formazione di equolo, metabolita ad azione antiossidante.

Un'azione antinfiammatoria, inibitrice dell'istone deacetilasi e anticarcinogenica è dimostrata invece per alcuni isotiocianati, provenienti dalla metabolizzazione dei glucosinolati contenuti nelle crucifere (ad es. broccoli).

Agli isomeri derivati dalla coniugazione dell'acido oleico (da parte di alcuni ceppi di lattobacilli e bifidobatteri) vengono infine riconosciuti effetti antinfiammatori e di inibizione dell'angiogenesi.

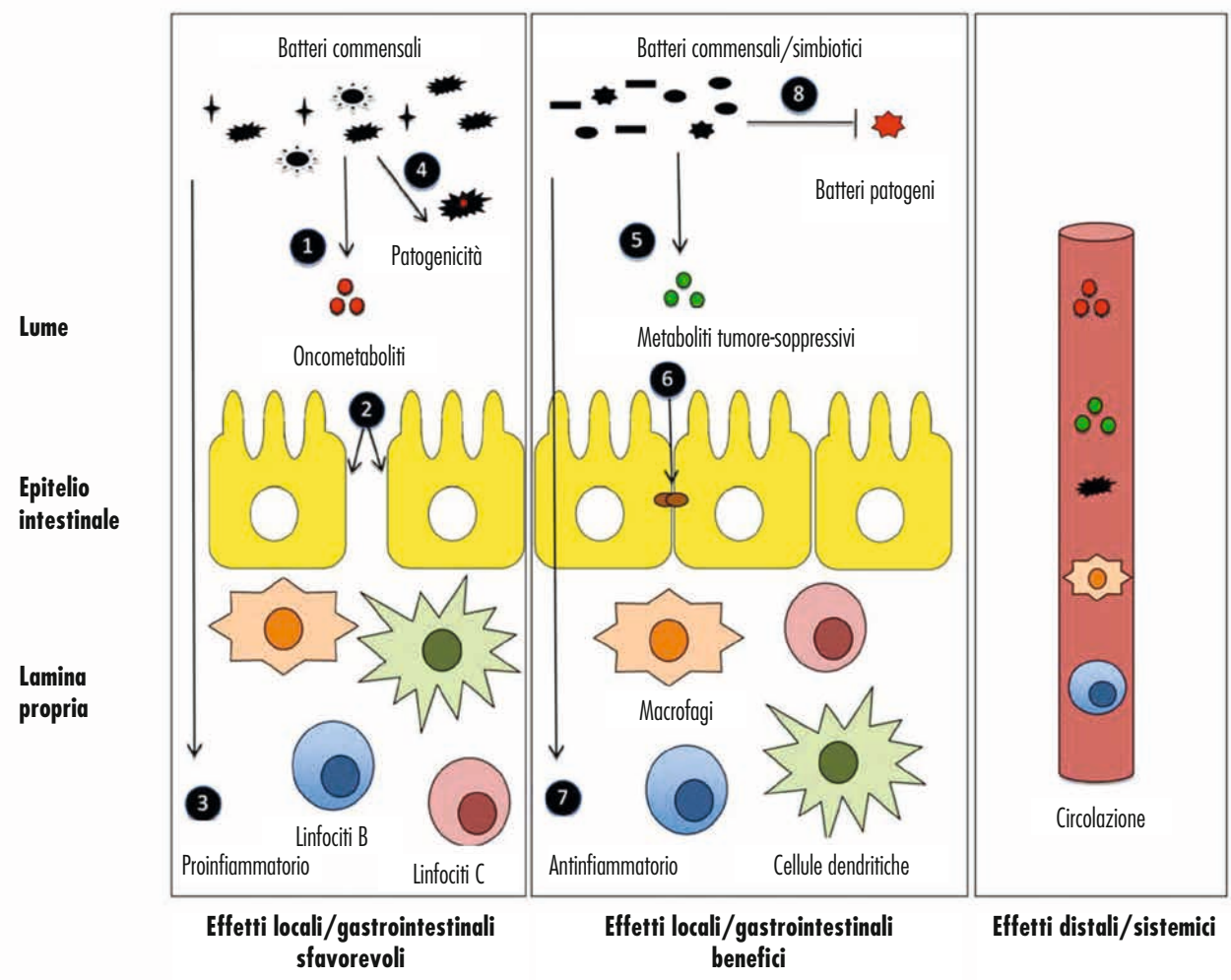

FIGURA 1.

Effetti locali/gastrointestinali e sistemici del microbiota sul processo di tumorigenesi (da Bhatt et al., 2017, mod) [1].

TRATTAMENTI ANTINEOPLASTICI

L'immunoterapia con inibitori del checkpoint immunitario si è dimostrata altamente efficace nel trattamento di diverse forme di cancro (melanoma, linfoma di Hodgkin, polmone, rene e vescica). Tuttavia, analogamente ad altre terapie antitumorali, la risposta presenta un'ampia variabilità interindividuale. Una spiegazione di ciò sembra riscontrarsi nell'interazione del microbioma intestinale con il sistema immunitario.

Secondo recenti studi, il microbioma intestinale, può influenzare la risposta ad anticorpi monoclonali anti-PD1 (nivolumab) e anti-PDL1 (pembrolizumab) in diverse forme di cancro [3 4]. In particolare, una disbiosi intestinale (dovuta a terapia antibiotica) comporta una generale riduzione nella risposta terapeutica e, di conseguenza, una minor sopravvivenza libera da progressione di malattia oltre a una minor sopravvivenza totale. Tra i soggetti "responder" si è registrata una maggior biodiversità, con marcata espressione dei generi *Akkermansia muciniphila, Clostridiales, Ruminococcaceae* e *Faecalibacterium*. L'elevata presenza di *Bacteroidales* sembra invece correlarsi a una minor sopravvivenza libera da progressione nei soggetti "non responder". Prove in vivo di trasposizione per via orale di microbiota fecale in topi germ-free (privi di un proprio microbiota intestinale) hanno poi confermato i dati clinici, con la presenza di una risposta terapeutica superiore nell'animale che aveva ricevuto microbiota fecale da soggetti rispondenti.

Questi risultati rappresentano un'affascinante ipotesi di possibilità di miglioramento delle risposte a farmaci immuno-oncologici attraverso il trapianto di microbiota intestinale in soggetti non responsivi.

Non inaspettatamente anche i trattamenti chemioterapici, benché non sia chiara la ricaduta in termini prognostici, comportano alterazioni della composizione microbica. Inoltre, studi condotti sull'animale dimostrano come la composizione specifica del microbiota possa influenzare la risposta antitumorale di una varietà di chemioterapici di comune impiego. Infatti, in topi germ-free o trattati con terapia antibiotica, gli effetti dell'oxaliplatino risultano ridotti per una minor produzione intratumorale di specie reattive dell'ossigeno e conseguente ridotto danneggiamento del DNA [5]. Anche gli effetti antitumorali della ciclofosfamide risultano mediati dal microbiota. La presenza delle due specie batteriche *Enterococcus hirae* (Gram +) e *Barnesiella intestinihominis* (Gram -), commensali rispettivamente a livello dell'intestino tenue e del colon, è predittiva di una maggior sopravvivenza libera da progressione di malattia nei pazienti con tumore ovarico e polmonare in stadio avanzato, trattati con ciclofosfamide [6]. Cocktail di alcuni di questi batteri o loro specifici metaboliti/prodotti immunomodulatori potrebbero essere utilizzati come terapia adiuvante per migliorare l'efficacia dei chemioterapici in uso.

CONCLUSIONI

Attraverso il consumo di una dieta varia, ricca di fibre e probiotici (ad es. yogurt, latte fermentato), oltre al minor consumo di carni rosse, è possibile ridurre il rischio di cancro grazie al mantenimento dell'eubiosi o quanto meno di una composizione ottimale del microbiota, considerando i dimostrati effetti metabolici e regolatori sulla funzione immunitaria.
Inoltre, in un contesto di medicina di precisione, finalizzata all'ottimizzazione dei trattamenti sulla base di variabili individuali genetiche e ambientali, appare sempre più evidente l'imprescindibilità dalla valutazione della composizione del microbiota, in un futuro che non sembra oramai così lontano.

BIBLIOGRAFIA

1. Bhatt AP, Redinbo MR, Bultman SJ. *The role of the microbiome in cancer development and therapy*. CA Cancer J Clin 2017;67:326-44.
2. Bultman SJ. *The microbiome and its potential as a cancer preventive intervention*. Semin Oncol 2016;43:97-106.
3. Routy B, Le Chatelier E, Deros L, et al. *Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors*. Science 2018;359:91-7.
4. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. *Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients*. Science 2018;359:97-103.
5. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, et al. *Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment*. Science 2013;342:967-70.
6. Daillere R, Vetizou M, Waldschmitt N, et al. *Enterococcus hirae and Barnesiella intestinihominis Facilitate Cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects*. Immunity 2016;45:931-43.

http://www.pacinimedicina.it/microbioma-microbiota/

TRAPIANTO DI MICROBIOTA

Andrea Poli
Nutrition Foundation of Italy, Milano

Nonostante il trapianto del microbiota fecale (TMF) sia praticato da oltre 50 anni, il suo studio sistematico e il suo impiego clinico sono cresciuti soprattutto negli ultimi anni, a seguito dell'aumento esponenziale dell'interesse verso il microbiota e il suo ruolo nella salute umana. Molti aspetti della metodologia del TMF sono in realtà ancora oggetto di dibattito (i criteri di scelta del donatore, l'uso di materiale fecale fresco o congelato, la via di somministrazione ottimale); il TMF può essere tuttavia già considerato un intervento di natura terapeutica in grado di controllare specifiche condizioni patologiche e le sue possibili indicazioni sono in aumento.

Il lavoro scientifico che contribuì forse a "sdoganare" la tecnica, uscito sull'autorevole *New England Journal of Medicine* [1], esaminò il ruolo del TMF in pazienti portatori di un'infezione cronica, non sensibile alla terapia antibiotica classica, da *Clostridium difficile*. Condotto secondo un rigoroso protocollo controllato, lo studio documentò un vantaggio altamente significativo del TMF rispetto al trattamento antibiotico combinato di riferimento. Questo risultato è stato successivamente replicato in molti altri studi, fino a diventare uno degli interventi di riferimento nei pazienti con questa patologia: oltre l'85% degli studi sul TMF pubblicati a oggi riguarda il controllo delle infezioni ricorrenti da *Clostridium difficile*, con una percentuale di successi, secondo un recente lavoro, compresa tra il 90 e il 98% dei pazienti trattati [2].

Un altro ambito esplorato mediante interventi di TMF sono le patologie infiammatorie intestinali. Si tratta di malattie frequenti nel mondo occidentale, che comportano una significativa riduzione della qualità della vita, caratterizzate da un'infiammazione cronica che colpisce prevalentemente il tenue (morbo di Crohn) oppure il colon-retto (colite ulcerosa).

Numerosi studi hanno documentato da un lato alterazioni caratteristiche del microbiota di questi pazienti (con riduzione sia dei *Firmicutes* e sia dei *Bacteroidetes*, e aumento invece di *Proteus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter* ecc.) [3]; in un modello sperimentale murino portatore di una variante del gene NOD2, che aumenta il rischio di incorrere in questa patologie [4], si osservano inoltre simili anomalie del microbiota: un riscontro che ne sottolinea il possibile ruolo causale o concausale. L'effetto del TMF in pazienti portatori di queste patologie è di grande interesse potenziale, ma è tuttora oggetto di dibattito e di studio. Una remissione significativa dei sintomi si osserva, nei vari studi pubblicati, tra il 25 e l'85% dei casi trattati, ma il follow-up è talora breve (anche di soli 30 gg) [5]. La risposta clinica sembra sostanzialmente analoga nei pazienti con morbo di Crohn o colite ulcerosa (anche se la CU è stata più studiata). La risposta clinica sembra migliore nei soggetti con durata relativamente breve della patologia (meno di un anno), e in coloro nei quali il microbiota, dopo il trapianto, era più simile a quello del donatore (e soprattutto caratterizzato da una maggiore ricchezza di specie differenti). Risultati preliminari positivi sono stati osservati anche nei pazienti con sindrome del colon irritabile (IBS), con controllo della sintomatologia dolorosa e una normalizzazione del numero delle evacuazioni riportati da una percentuale dei soggetti trattati comprese tra il 30 e il 70% [6].

Un terzo ambito potenziale di applicazione del trapianto di microbiota è rappresentato dal sovrappeso grave e dall'obesità. I dati sperimentali al proposito sono numerosi e convincenti, mentre i dati nell'uomo sono per ora solo preliminari. In un recente lavoro, campioni del microbiota fecale dei due membri di una coppia gemellare discordante per il peso (uno dei soggetti era normopeso, l'altro obeso), sono stati trasferiti sperimentalmente a topi di laboratorio; gli autori hanno osservato che i topi infusi con il microbiota del gemello obeso andavano incontro, a differenza dei topi inoculati

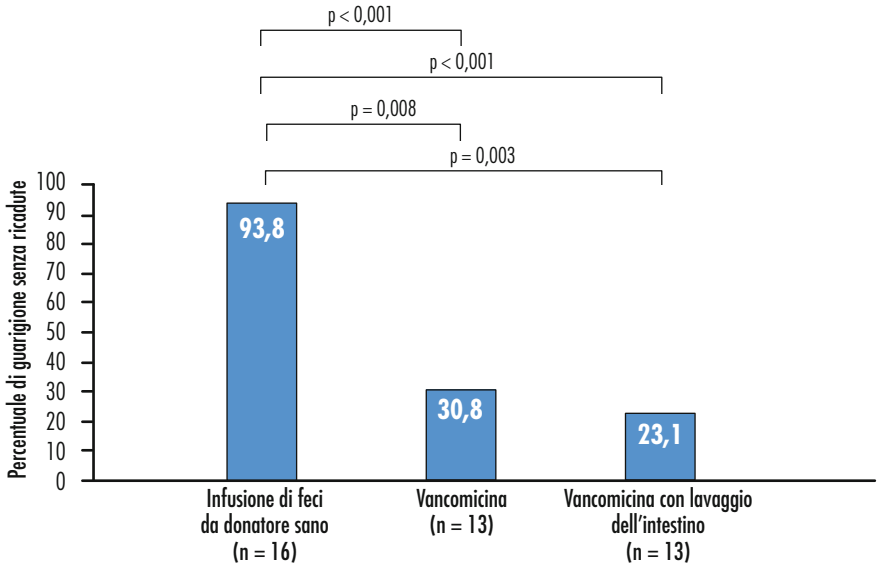

FIGURA 1.

Percentuale di guarigione senza ricadute da un'infezione recidivante da *Clostridium difficile* dopo trapianto di microbiota fecale (da van Nood et al., 2013, mod.) [1].

con il microbiota del gemello normopeso, a un rapido incremento ponderale, nonostante a tutti gli animali venisse somministrata una dieta ipocalorica e a elevato contenuto in fibra [7].

In uno studio controllato, condotto su soggetti con sovrappeso e resistenza insulinica, il trapianto di microbiota da persone normopeso (ma non l'autotrapianto fecale), ha indotto un miglioramento della resistenza insulinica, e un incremento della varietà di specie [8].

Sul piano concettuale il TMF, pur in genere ben tollerato (si osservano solamente, in alcuni pazienti, dolori addominali aspecifici e transitori) è tuttora – come si ricordava – in fase di ottimizzazione. I criteri di scelta del donatore sono ancora, per esempio, incompletamente definiti. Anche la metodica di trasferimento va valutata con attenzione; in alcuni studi il materiale fecale è stato trasferito mediante enteroclisma, riabitando di fatto soltanto il colon del ricevente, ma non i tratti a monte, per la presenza della valvola ileo-cecale in genere continente. Altri autori hanno somministrato invece il materiale per sondino naso gastrico, o per bocca, in capsule gastro resistenti, probabilmente più efficaci nel colonizzare l'intero tratto digerente. Recenti studi comparativi hanno confrontato la somministrazione per bocca e quella per enteroclisma, senza peraltro rilevare differenze significative [9].

Va comunque sottolineato che il TMF comporta il trasferimento soltanto di alcuni ceppi del microbiota del donatore al ricevente: gli anaerobi obbligati, largamente rappresentati specie nel colon, sono infatti estremamente sensibili all'ossigeno atmosferico, e la semplice estrazione o espulsione del materiale fecale dall'intestino ne comporta la rapida inattivazione. Si trasferisce inoltre, altro aspetto da non trascurare, anche la componente virale e micotica del microbiota, il cui ruolo è a tutt'oggi praticamente sconosciuto.

Il TMF, in conclusione, rappresenta la logica conseguenza dello sviluppo delle conoscenze sul ruolo del microbiota nella fisiologia dell'organismo umano. È necessario tuttavia affrontare questa tecnica – apparentemente banale – consci della sua complessità concettuale, su indicazione medica e nei soli ambiti nei quali studi di buona qualità ne abbiano confermato gli effetti favorevoli.

Bibliografia

1. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. *Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile*. N Engl J Med 2013;368:407-15.
2. Rossen NG, MacDonald JK, de Vries EM, et al. *Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review*. World J Gastroenterol 2015;21:5359-71.
3. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, et al. *Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease*. Gut 2004;53:685-93.
4. Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, et al. *NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer*. J Clin Invest 2013;123:700-11.
5. Heath RD, Cockerell C, Mankoo R, et al. *Fecal microbiota transplantation and its potential therapeutic uses in gastrointestinal disorders*. North Clin Istanb 2018;5:79-88.
6. Distrutti E, Monaldi L, Ricci P, et al. *Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: new therapeutic strategies*. World J Gastroenterol 2016;22:2219-41.
7. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science 2013;341:1241214.
8. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, et al. *Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome*. Gastroenterology 2012;143:913-6.
9. Kao D, Roach B, Silva M, et al. *Effect of oral capsule- vs colonoscopy-delivered fecal microbiota transplantation on recurrent clostridium difficile infection: a randomized clinical trial*. JAMA 2017;318:1985-93.

http://www.pacinimedicina.it/microbioma-microbiota/

IL MICROBIOTA IN GRAVIDANZA

Claudio Mencacci, Virginio Salvi

Dipartimento Salute Mentale-Dipendenze-Neuroscienze, ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano

Lo studio del microbiota in gravidanza si sta imponendo principalmente per due motivi: innanzitutto i cambiamenti a carico del sistema immunitario e del metabolismo che avvengono in gravidanza potrebbero essere mediati da alterazioni nella composizione del microbiota. In secondo luogo il microbiota materno potrebbe influenzare il sistema immune del feto prima e del nascituro poi, influenzandone la salute futura.

Nel corso di una gravidanza fisiologica il corpo della donna va incontro a modificazioni ormonali, metaboliche e immunologiche [1 2]. Nel primo periodo di gestazione aumenta il grasso corporeo mentre successivamente si riduce la sensibilità all'insulina [3]. Parallelamente nel corpo femminile si genera uno stato infiammatorio, come si evince dall'incremento dei livelli di TNF-alfa e IL-6 [4]. Questi cambiamenti, in altre condizioni potenzialmente nocivi per l'organismo, sono necessari in gravidanza per supportare adeguatamente la crescita fetale e preparare il corpo della madre alle richieste energetiche dell'allattamento [5].

Nel primo studio che esaminò la composizione del microbiota gravidico nell'uomo fu riscontrato, dal primo al terzo trimestre di gravidanza, un aumento dei batteri del *phylum Firmicutes*, caratterizzati dalla capacità di metabolizzare la mucina al fine di ricavare maggiori quote di energia [6]. L'aumento relativo di questa popolazione batterica determina un'aumentata capacità dell'intestino della donna gravida a ricavare energia indipendentemente da un apporto dietetico adeguato. Per contro, la mucina è un proteoglicano viscoso che costituisce al mantenimento della barriera mucosa del tratto gastrointestinale; una sua dissoluzione legata alla prevalenza di batteri che la degradano conduce a una maggiore permeabilità intestinale – il cosiddetto "leaky gut" – con conseguente attivazione proinfiammatoria. Uno studio successivo ha dimostrato come con la progressione della gravidanza si assista all'incremento dei batteri dei *phyla Proteobacteria* e *Actinobacteria*, più frequentemente patogeni e già associati a dismetabolismi e diabete. Parallelamente si osservava la riduzione di specie batteriche quali *Faecalibacterium* e *Roseburia*, considerati benefici perché produttori di butirrato con effetti antiinfiammatori [7]. Con il procedere della gravidanza si verifica pertanto una disbiosi, con maggiore permeabilità della parete epiteliale intestinale e diffusione di metaboliti proinfiammatori a livello sistemico. La reazione infiammatoria che ne deriva, con l'aumento di citochine quali TNF-alfa, IL-2 e IL-6 contribuirebbe a sua volta a determinare quell'insulino-resistenza e accumulo di tessuto adiposo necessari alle richieste fetali e del postpartum [8 9]. Dopo la nascita il microbiota materno rimane stabile fino al primo mese post-partum, permettendo di estrarre più energia dagli alimenti e far fronte alle esigenze energetiche della lattazione [7 10].

Il cambiamento nella composizione del microbiota in gravidanza, che favorisce l'aumento di tessuto adiposo, una ridotta sensibilità all'insulina e uno stato proinfiammatorio, spiega altresì l'aumento del rischio di diabete gestazionale, che può a sua volta determinare complicanze gravidiche quali pre-eclampsia e infezioni [11] e complicanze neonatali quali malformazioni e macrosomia [12].

Nel tentativo di trattare il diabete gestazionale, alcuni ricercatori hanno provato a modificare la composizione del microbiota di madri affette attraverso l'uso di probiotici. In particolare è stata studiata la supplementazione di probiotici in grado di produrre acidi grassi a catena corta (SCFA), che agirebbero sia aumentando la sensibilità all'insulina sia migliorando la tenuta delle giunzioni strette a livello dell'epitelio intestinale, riducendone la permeabilità e conseguentemente l'infiammazione [13]. Alcuni studi controllati con placebo hanno effettivamente dimostrato gli effetti benefici di alcuni probiotici in termini di riduzione della glicemia e dell'emoglobina glicata. Tre studi condotti in Iran su un totale di 206 donne hanno dimostrato la maggiore efficacia di miscele di *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* rispetto a placebo nel ridurre i livelli di glicemia e nel migliorare la sensibilità all'insulina [14-16]. Infine, è recentemente stato pubblicato il primo studio controllato con placebo, che ha dimostrato l'efficacia di un probiotico nel prevenire l'esordio di diabete gestazionale: lo studio ha dimostrato che le donne cui veniva somministrato *Lactobacillus Rhamnosus* nella 14-16 settimana di gravidanza avevano un'incidenza di diabete gestazionale dell'8,2% rispetto al 13,8% delle donne cui era stato somministrato placebo. L'effetto appariva ancora più significativo nelle gravide con età superiore ai 35 anni [17].

Oltre a giocare un ruolo nella salute materna, le modificazioni del microbiota in gravidanza potrebbero avere un impatto anche sulla salute del bambino, che viene colonizzato dal microbiota materno sia durante la vita intrauterina sia alla nascita e attraverso l'allattamento al seno.

In particolare, l'assetto del microbiota materno nel terzo trimestre di gravidanza, associato alla descritta disbiosi, allo stato proinfiammatorio e all'aumento di peso, ha fatto ipotizzare che il metabolismo e il sistema immunitario del bambino possa essere negativamente influenzato, determinando in seguito un aumento del rischio di obesità infantile, specie nei nati da madre con diabete gestazionale o obesità. In effetti, uno studio canadese compiuto su una coorte di 926 neonati seguiti fino ai 3 anni di vita ha messo in evidenza come la relazione fra sovrappeso o obesità nella madre e nei figli a 1 e 3 anni di età fosse mediata da un'abbondanza di batteri della famiglia *Lachnospiraceae* presenti nel bambino già poco dopo la nascita [18]. Altri studi tuttavia non hanno messo in luce un'associazione fra obesità materna e variazioni del microbiota infantile: lo studio già descritto che ha messo in luce il cambiamento del microbiota dal primo al terzo trimestre di gravidanza, analizzando quello dei neonati dopo il primo mese di vita ha riscontrato una somiglianza con il microbiota materno del primo trimestre, come se il microbiota del

terzo trimestre avesse subito una selezione negativa nel neonato [7]. In un altro studio, la variazione del microbiota materno evidenziata nelle gravide obese o con eccessivo aumento di peso gestazionale non si traduceva in variazioni della composizione del microbiota del bambino nei primi due anni di vita [19]. Sono pertanto necessari ulteriori studi sull'argomento che tengano conto di altre variabili fra le quali il tipo di parto.

Infine, è plausibile che il microbiota materno possa influenzare anche il comportamento e, probabilmente, il rischio futuro di disturbi psichiatrici nel bambino. Benché al momento attuale non vi siano studi che abbiano indagato tale ipotesi nell'uomo, due studi su modelli animali forniscono spunti interessanti. In un primo studio, femmine di topo gravide venivano trattate con antibiotici non assorbibili, che portavano unicamente a deplezione del microbiota intestinale. I topi nati dalle madri trattate dalla terapia antibiotica mostravano alla nascita una riduzione della locomozione e delle attività esplorative rispetto ai nati da madri non trattate. Gli autori ipotizzavano che la terapia antibiotica, impedendo la colonizzazione intestinale da parte del microbiota materno, possa indurre alterazioni del neurosviluppo [20]. In uno studio successivo, nelle femmine di topo trattate con antibiotici per eliminare il microbiota fu trapiantato microbiota originato da dieta a basso o alto contenuto calorico. Le femmine di topo furono successivamente accoppiate e rese gravide e fu analizzato il comportamento della prole. Lo studio dimostrò la presenza di comportamenti compulsivi e di tipo ansioso nei topi nati da madri colonizzate con il microbiota da dieta ad alto contenuto calorico, determinando per la prima volta come il microbiota il gravidanza possa determinare alterazioni comportamentali assimilabili a quelle osservate nei disturbi psichiatrici [21]. Il prossimo passo sarà valutare anche nell'uomo la relazione fra microbiota materno e comportamento o psicopatologia della prole.

In conclusione il microbiota materno si modifica durante la gravidanza, con effetti diretti sull'assetto immunologico e metabolico della donna gravida e un aumento dei rischi correlati. Studi futuri dovranno verificare in quali casi e con quali modalità intervenire sul microbiota delle gravide a rischio al fine di limitare la morbidità materna e influenzare positivamente la salute del bambino, nel breve e lungo termine.

BIBLIOGRAFIA

1. Mor G, Cardenas I. *The immune system in pregnancy: a unique complexity*. Am J Reprod Immunol 2010;63:425-33.
2. Newbern D, Freemark M. *Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2011;18:409-16.
3. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, et al. *Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes*. Diabetes Care 2007;30(Suppl 2):S112-9.
4. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, et al. *TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy*. Diabetes 2002;51:2207-13.
5. Nelson SM, Matthews P, Poston L. *Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome*. Hum Reprod Update 2010;16:255-75.
6. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, et al. *Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women*. Am J Clin Nutr 2008;88:894-9.
7. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, et al. *Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy*. Cell 2012;150:470-80.
8. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, et al. *Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae*. Cell Host Microbe 2007;2:119-29.
9. Chung SY, Ravel J, Regan M. *Clinical relevance of gastrointestinal microbiota during pregnancy: a primer for nurses*. Biol Res Nurs 2018;20:84-102.
10. Jost T, Lacroix C, Braegger C, et al. *Stability of the maternal gut microbiota during late pregnancy and early lactation*. Curr Microbiol 2014;68:419-27.
11. Huynh J, Dawson D, Roberts D, et al. *A systematic review of placental pathology in maternal diabetes mellitus*. Placenta 2015;36:101-14.
12. Schneider S, Hoeft B, Freerksen N, et al. *Neonatal complications and risk factors among women with gestational diabetes mellitus*. Acta Obstet Gynecol Scand 2011;90:231-7.
13. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. *Intestinal permeability–a new target for disease prevention and therapy*. BMC Gastroenterol 2014;14:189.
14. Dolatkhah N, Hajifaraji M, Abbasalizadeh F, et al. *Is there a value for probiotic supplements in gestational diabetes mellitus? A randomized clinical trial*. J Health Popul Nutr 2015;33:25.
15. Jafarnejad S, Saremi S, Jafarnejad F, et al. *Effects of a multispecies probiotic mixture on glycemic control and inflammatory status in women with gestational diabetes: a randomized controlled clinical trial*. J Nutr Metab 2016;2016:5190846.
16. Karamali M, Dadkhah F, Sadrkhanlou M, et al. *Effects of probiotic supplementation on glycaemic control and lipid profiles in gestational diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Diabetes Metab 2016;42:234-41.
17. Wickens KL, Barthow CA, Murphy R, et al. *Early pregnancy probiotic supplementation with Lactobacillus rhamnosus HN001 may reduce the prevalence of gestational diabetes mellitus: a randomised controlled trial*. Br J Nutr 2017;117:804-13.
18. Tun HM, Bridgman SL, Chari R, et al.; Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) Study Investigators. *Roles of birth mode and infant gut microbiota in intergenerational transmission of overweight and obesity from mother to offspring*. JAMA Pediatr 2018 Feb 19. doi: 10.1001/jamapediatrics.2017.5535.
19. Stanislawski MA, Dabelea D, Wagner BD, et al. *Pre-pregnancy weight, gestational weight gain, and the gut microbiota of mothers and their infants*. Microbiome 2017;5:113.
20. Tochitani S, Ikeno T, Ito T, et al. *Administration of non-absorbable antibiotics to pregnant mice to perturb the maternal gut microbiota is associated with alterations in offspring behavior*. PLoS One 2016;11:e0138293.
21. Bruce-Keller AJ, Fernandez-Kim SO, Townsend RL, et al. *Maternal obese-type gut microbiota differentially impact cognition, anxiety and compulsive behavior in male and female offspring in mice*. PLoS One 2017;12:e0175577.

http://www.pacinimedicina.it/microbioma-microbiota/

MICROBIOTA E MALATTIA RENALE CRONICA

Giacomo Garibotto

Clinica Nefrologica, Dialisi e Trapianto, Università di Genova e Ospedale Policlinico San Martino, Genova

Nei Paesi sviluppati la malattia renale cronica (MRC) sta raggiungendo dimensioni epidemiche, con una prevalenza tra 8 e 15% della popolazione. L'invecchiamento, e i cambiamenti nella dieta e nello stile di vita accelerano la senescenza del rene. Le fibre, i vegetali e la frutta che costituivano la nostra alimentazione sono stati sostituiti progressivamente da grassi e zuccheri, mentre è aumentato l'introito di sale e fosfati nei cibi conservati e nei "fast food". Queste modifiche nutrizionali hanno portato a un aumento del nostro peso corporeo (il nostro indice di massa corporea è aumentato in media da 21,7 nel 1975 a 24,6 nel 2014) [1], e all'aumento di insulino-resistenza, diabete e ipertensione, tutti fattori che accelerano l'invecchiamento del rene e inducono MRC.

Le persone affette da MRC vanno incontro progressivamente a complicanze come anemia, alterazioni endocrine, calcificazioni vascolari, acidosi, infiammazione, malnutrizione e cachessia che diminuiscono la qualità e l'aspettativa di vita. La progressiva riduzione dell'eliminazione renale di sodio e fosfati e l'accumulo progressivo di acidi e di tossine uremiche è in parte responsabile delle complicanze della MRC. La recente scoperta del ruolo del microbiota intestinale ha aperto nuovi orizzonti clinici e di ricerca sulla progressione di malattia renale e sulle sue complicanze. Da un lato, la MRC è di per sé causa di disbiosi intestinale, d'altro lato, le restrizioni dietetiche a cui sottoponiamo i nostri pazienti a loro volta possono alterare il microbiota. Vi è inoltre evidenza che alcune terapie che prevedono l'uso di probiotici, prebiotici e sinbiotici possano avere un ruolo nella cura della disbiosi associata a MRC e possono essere efficaci nella sua prevenzione e trattamento.

LA MALATTIA RENALE CRONICA CAUSA DISBIOSI INTESTINALE

Per mantenere l'omeostasi corporea il rene rimuove sostanze e composti tossici che provengono dal metabolismo cellulare o dalla dieta. In corso di MRC, prodotti finali del metabolismo come urea, acido urico e ossalati aumentano in circolo, ma sono in parte eliminati dal colon.

Questa risposta compensatoria porta a gravi conseguenze per l'ambiente intestinale: ad esempio aumenta l'afflusso di urea nel lume intestinale, dove i batteri che producono ureasi la idrolizzano in ammoniaca e idrossido di ammonio, aumentando di conseguenza il pH intestinale e promuovendo l'irritazione delle mucose e alterazioni strutturali della barriera intestinale. Tali alterazioni fisiologiche sono associate alla disbiosi, alla traslocazione batterica e all'endotossemia, inducendo infiammazione [2].

A questo dato fa anche riscontro che il numero dei batteri che convertono le fibre in acidi grassi a catena corta (SCFA), composti con effetti favorevoli sulla parete intestinale, è ridotto [3].

A contribuire alla disbiosi nella MRC giocano anche un ruolo le restrizioni dietetiche. Spesso riduciamo nella dieta frutta e vegetali per evitare l'iperpotassiemia e somministriamo resine con effetto chelante del fosforo per prevenire l'iperfosforemia.

Dati recenti suggeriscono che nella MRC vi sia un rapporto tra dieta povera di fibre e rapida progressione dell'insufficienza renale e che un alto consumo di fibre sia invece associato a un minor stato infiammatorio e minore mortalità [4]. È anche importante il riconoscimento che un elevato consumo di fibre è associato a un rischio significativamente più basso di carcinoma renale [5].

MICROBIOTA NELLA MALATTIA RENALE CRONICA: IL RISCHIO CHE ALCUNI NUTRIENTI POSSANO TRASFORMARSI IN TOSSINE

Nella MRC, l'accumulo di tossine è associato a un aumentato rischio di morte. Alcune tossine uremiche vengono ingerite con la dieta, come il fosfato. Altre derivano dall'elaborazione dei nutrienti da parte del microbiota intestinale, che può produrre tossine o loro precursori. Questi nutrienti includono l-carnitina, colina/fosfatidilcolina, triptofano e tirosina, che normalmente sono utilizzati tra gli integratori alimentari [6]. Quindi, è importante ricordare che l'apporto eccessivo di queste sostanze potrebbe portare a effetti tossici nella malattia renale cronica. Inoltre, alcuni dei componenti alimentari possono modificare il microbiota intestinale, aumentando la popolazione di batteri che li processano, producendo a loro volta tossine uremiche, quali trimetilammina N-ossido (TMAO), p-cresil solfato, indossil solfato e indolo-3 acido acetico [6].

UN ALTERATO MICROBIOTA PUÒ CONTRIBUIRE A INFIAMMAZIONE E CACHESSIA NELLA MALATTIA RENALE CRONICA

Malnutrizione e cachessia sono complicanze frequenti della MRC, specie se in stadio avanzato. Mentre la malnutrizione è considerata una conseguenza reversibile di un ridotto apporto di nutrienti, la cachessia è considerata un processo di attivazione dei meccanismi di proteolisi su cui è difficile intervenire. L'ipotesi emergente è che l'immunità innata svolga un ruolo primario nello sviluppo e progressione della cachessia uremica [7], in analogia con la cachessia neoplastica e la cachessia cardiaca. È noto da tempo che livelli di citochine proinfiammatorie (IL-6 e TNF-α) circolanti sono aumentati nel sangue di pazienti con MRC e che si associano con la perdita di massa magra [8]. Più recentemente, è stata osservata un'alterata regolazione di diversi geni associati con l'infiammazione nel muscolo di pazienti con CKD [9]. Citochine proinfiammatorie, come TNF-α e IL-6, possono avere di per sé effetti catabolici sulle proteine dei muscoli scheletrici. È stato ipotizzato che l'uremia alteri la crescita della flora

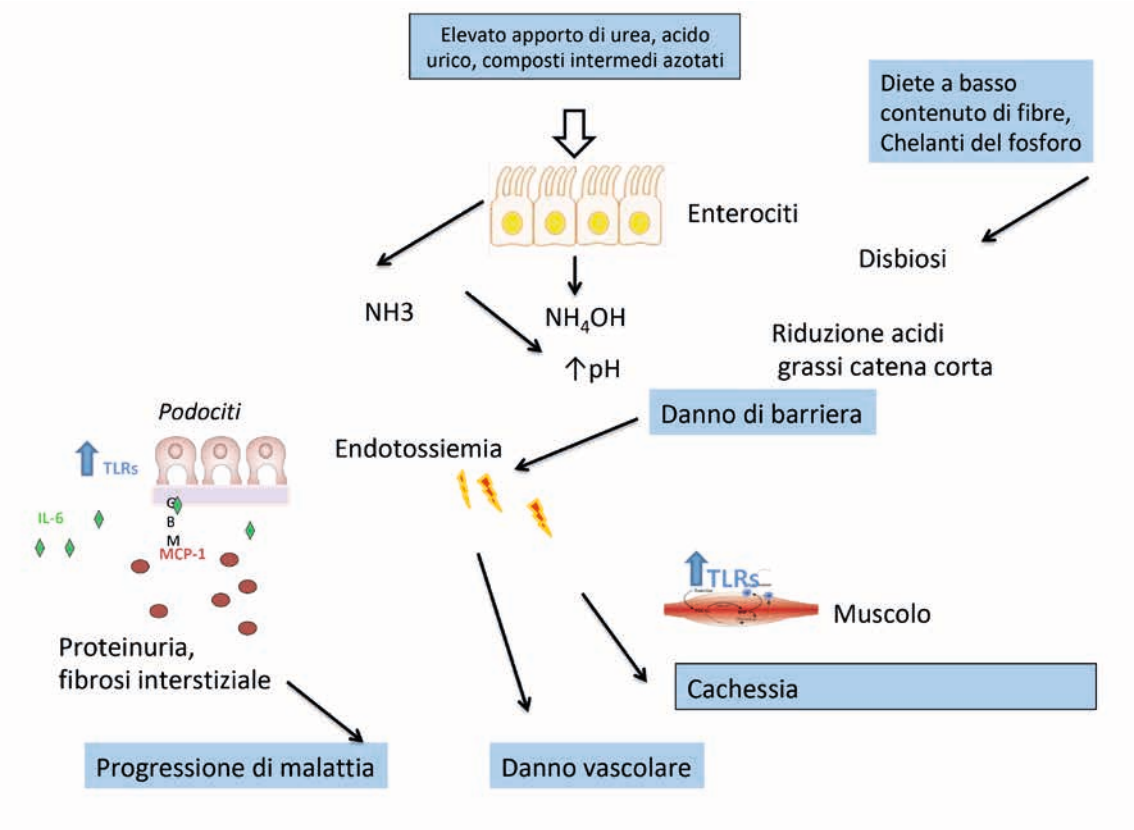

FIGURA 1.

Nella MRC aumenta l'afflusso di urea nel lume intestinale, dove i batteri che producono ureasi la idrolizzano in ammoniaca e idrossido di ammonio, aumentando di conseguenza il pH intestinale e promuovendo l'irritazione delle mucose e alterazioni strutturali di barriera. Insieme alle restrizioni dietetiche, lo scarso apporto di fibre, le resine con effetto chelante del fosforo, queste alterazioni sono associate alla disbiosi, alla traslocazione batterica e all'endotossemia, inducendo infiammazione a livello del podocita, dell'interstizio del rene e del muscolo scheletrico. Ne consegue progressione di malattia renale e cachessia.

e la permeabilità intestinale, aumentando la produzione enterobatterica e la traslocazione di endotossine nella circolazione sistemica (Fig. 1). Una volta che le endotossine hanno attraversato la barriera intestinale, possono raggiungere il muscolo per essere riconosciuti dai recettori di riconoscimento, come i recettori toll-like (TLR) che attivano le risposte locali immunitarie [9]. Con lo stesso meccanismo, la comparsa di endotossine in circolo potrebbe prevenire la progressione di MRC. In uno studio pilota, l'assunzione giornaliera di una formulazione probiotica contenente un mix di *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium longum* e i termofili dello streptococco hanno mostrato una significativa riduzione dei livelli di azoto ureico nel sangue senza effetti avversi nei pazienti con MRC [10]. Avere come obiettivo la disbiosi intestinale potrebbe rivelarsi una nuova modalità terapeutica per prevenire/correggere l'infiammazione, la progressione di malattia e le profonde conseguenze cataboliche della MRC.

PROSPETTIVE

La comprensione delle funzioni fisiologiche del microbioma intestinale e le conseguenze della sua disbiosi hanno spinto a ricercare vari modi per ristabilire la simbiosi. Il potenziale effetto benefico di probiotici, prebiotici e simbiotici (co-somministrazione di pro- e prebiotici) sembra essere un'alternativa promettente per controllare la progressione della MRC e per trattare alcune delle sue complicanze. L'idea che la terapia nutrizionale della MRC debba essere ridisegnata e includere come obiettivo la plasticità del microbiota in risposta alla dieta è nuova e promettente.

Bibliografia

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). *Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants*. Lancet 2016;387:1377-96.
2. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, et al. *Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora*. Kidney Int 2013;83:308-15.
3. Wong J, Piceno YM, Desantis TZ, et al. *Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contrac-*

tion of short- chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. Am J Nephrol 2014;39:230-7.

4 Krishnamurthy VM, Wei G, Baird BC, et al. *High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease*. Kidney Int 2012;81:300-6.

5 Daniel CR, Park Y, Chow WH, et al. *Intake of fiber and fiber-rich plant foods is associated with a lower risk of renal cell carcinoma in a large US cohort*. Am J Clin Nutr 2013;97:1036-43.

6 Fernandez-Prado R, Esteras R, Perez-Gomez MV, et al. *Nutrients turned into toxins: microbiota modulation of nutrient properties in chronic kidney disease*. Nutrients 2017;12:9-15.

7 Stenvinkel P. *Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated?* Nephrol Dial Transplant 2002;17(Suppl 8):33-8.

8 Garibotto G, Sofia A, Procopio V, et al. *Peripheral tissue release of interleukin-6 in patients with chronic kidney diseases: effects of end-stage renal disease and microinflammatory state*. Kidney Int 2006;70:384-90.

9 Verzola D, Bonanni A, Sofia A, et al. *Toll-like receptor 4 signalling mediates inflammation in skeletal muscle of patients with chronic kidney disease*. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2017;8:131-44.

10 Ranganathan N, Ranganathan P, Friedman EA, et al. *Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease*. Adv Ther 2010;27:634–47.

http://www.pacinimedicina.it/microbioma-microbiota/

ABC DELLA DIAGNOSTICA: LA TIPIZZAZIONE DEL MICROBIOTA PER LA VALUTAZIONE DI DISBIOSI

Nicoletta Sacchi, Mauro Castagnetta, Aldo Chiesa

S.C. Laboratorio di istocompatibilità e IBMDR – E.O. Ospedali Galliera Genova

INTRODUZIONE

Gli esseri umani non sono entità autonome. Viviamo in un ambiente complesso, interagendo non solo con i nostri pari ma anche con gli ecosistemi microbici che vivono su e soprattutto dentro di noi, in particolar modo nell'intestino. Questa collettività di microrganismi, il microbiota intestinale, contribuisce in modo significativo al nostro metabolismo e al mantenimento dell'omeostasi trasformando carboidrati complessi in zuccheri semplici e in acidi grassi a catena corta, influenza il nostro sistema immunitario limitando o favorendo la crescita di determinati microrganismi e modula la permeabilità intestinale, permettendo o meno il passaggio nel sangue di fattori, come le citochine, predisponenti lo stato infiammatorio.

Il crescente interesse della comunità scientifica nello studio del microbiota è pertanto dovuto non solo alla sua correlazione con la patogenesi di alcune malattie autoimmuni, allergiche, metaboliche, oncologiche e infettive, ma anche alla sua associazione con l'insorgenza dello stato infiammatorio sistemico cronico, *inflammageing* che, attraverso una maggiore concentrazione nel sangue di alcuni mediatori pro infiammatori, si ritiene possa favorire lo sviluppo di patologie tipiche dell'invecchiamento.

Per tali ragioni negli ultimi anni sono state sviluppate diverse metodiche per caratterizzare e monitorare la composizione del microbiota intestinale, al fine di evidenziare un eventuale stato di squilibrio dello stesso, definito come "disbiosi", e poter riconoscere le connessioni esistenti fra la composizione della flora intestinale e la patogenesi di alcune malattie [1].

IL MICROBIOTA E LA DISBIOSI

Per definire uno stato di disbiosi è necessario, attraverso l'analisi di un campione fecale, definire la composizione del microbiota, sia classificando i batteri presenti, sia stimandone la concentrazione.

Si parla di disbiosi quando il microbiota presenta:

- significativa riduzione di batteri simbiotici;
- significativo aumento di batteri patobionti;
- scarsa eterogeneità e polimorfismo [2].

Poiché però, come è ovvio, la composizione del microbiota è influenzata da molti fattori interni ed esterni (genetica, ambiente, stile di vita, alimentazione, assunzione di farmaci, stato di salute, ecc.) la sua analisi in laboratorio non può prescindere da una attenta raccolta e valutazione dei dati anamnestici e clinici dei soggetti indagati (Fig 1).

Inoltre, per definire uno stato di disbiosi (cioè di "anormalità") è necessario avere un dato di confronto che rappresenti la composizione "normale" del microbiota nella popolazione sana di riferimento, cioè avvezza ad abitudini, in particolare alimentari, quantomeno simili al campione di pazienti in esame.

Sino a poco tempo fa i test di laboratorio utilizzati per indagare la disbiosi erano in grado di evidenziare uno stato di squilibrio senza però poter classificare il microbiota oppure potevano solo isolare alcuni microrganismi ritenuti patobionti. Le metodiche di indagine attualmente disponibili, basate sulla biologia molecolare, consentono una rilevazione molto più precisa delle comunità microbiche componenti la flora intestinale e quindi permettono di tipizzare e quindi profilare il microbiota [3 4].

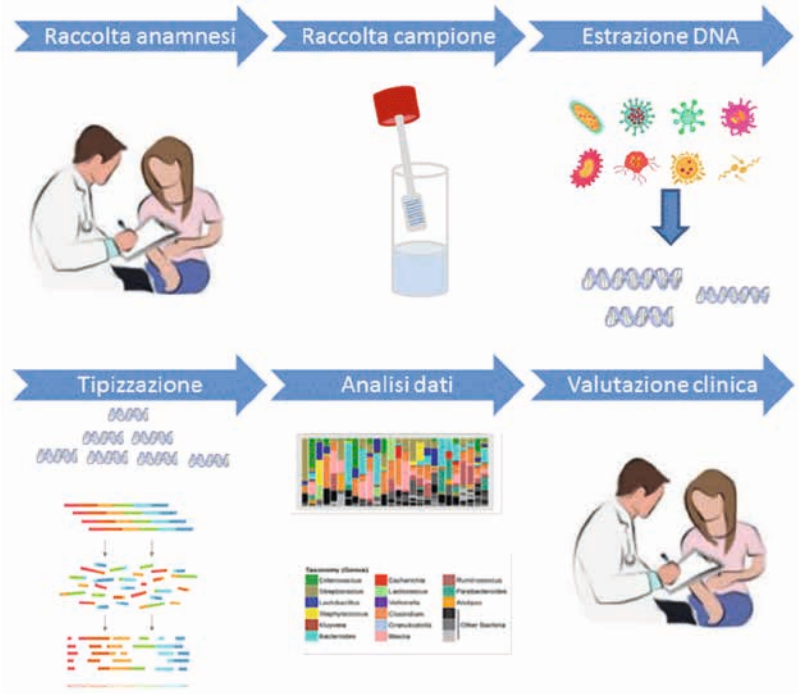

FIGURA 1.

L'analisi del microbiota tra clinica e diagnostica.

LA TIPIZZAZIONE DEL MICROBIOTA

Attualmente la tecnica di tipizzazione del microbiota maggiormente impiegata si basa sul sequenziamento, dopo amplificazione in PCR, di geni che siano marcatori filogenetici: in particolare viene tipizzato il gene rRNA 16S, che codifica la subunità minore del ribosoma batterico, evolutivamente ben conservato e che quindi rappresenta un ottimo marcatore. Questo approccio è detto metagenomica e permette di determinare in dettaglio le specie presenti nel microbiota in esame e la loro concentrazione [3 5].

LE TECNICHE DI TIPIZZAZIONE

La tecnica di elezione per analisi di metagenomica è il *Next Generation Sequencing* (NGS) che, attraverso l'arricchimento clonale, offre un elevatissimo *throughput* (cioè quantità di dati trasmessi per unità di tempo) processando contemporaneamente anche campioni di soggetti diversi. La quasi totalità dei kit NGS per la tipizzazione del microbiota utilizza *primers* specifici che riconoscono la sequenza di alcune delle 9 regioni variabili del gene rRNA 16S, lungo circa 1500 paia di basi (Fig. 2). Queste sequenze vengono poi analizzate dallo strumento di NGS attraverso circa 20 milioni di *reads* (letture di sequenze). A differenza dell'analisi di grandi genomi a sequenza nota come quello umano, nell'analisi metagenomica del microbiota, le *reads* rappresentano un pool derivante da un insieme eterogeneo di ceppi batterici con una grande quantità di diversi genomi mescolati insieme [5-7]. Pertanto l'analisi dei risultati va eseguita attraverso software e algoritmi bioinformatici specifici in grado di garantire l'attribuzione corretta della sequenza e ricreare così un albero tassonomico, che riporti la specie e la sua concentrazione (Fig. 3).

Oltre all'NGS è di recente applicazione un nuovo test basato sull'utilizzo di oligonucleotidi fluorescenti specificatamente complementari alle zone variabili del gene rRNA16S; le sonde che si legano alla sequenza in esame emettono un segnale luminoso rilevabile da citofluorimetri, permettendo il riconoscimento sia qualitativo che quantitativo delle specie batteriche presenti.

Comunque si esegua l'analisi, al fine di fornire una corretta valutazione di disbiosi, è però indispensabile confrontare il risultato ottenuto con un valore standard rilevato in una popolazione sana, campionata e possibilmente rappresentativa dei soggetti in esame.

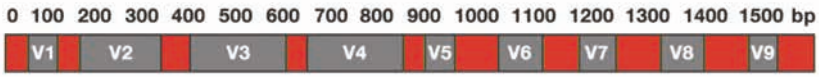

FIGURA 2.

Regioni ipervariabili del gene rRNA 16S.

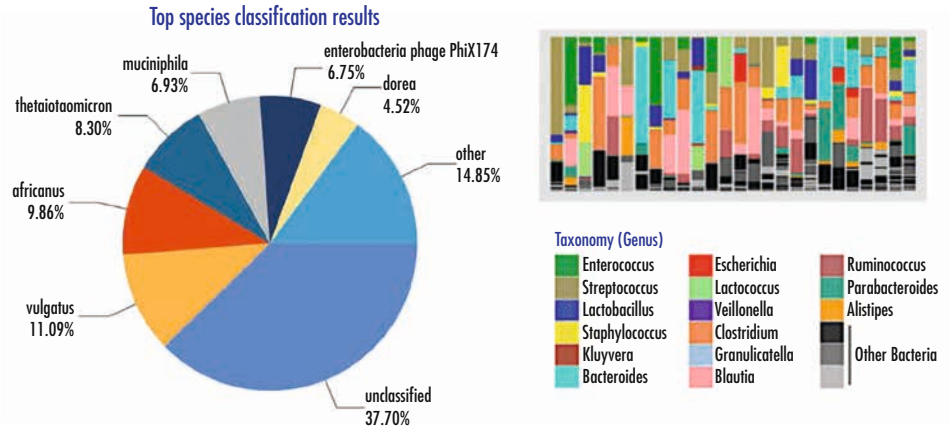

FIGURA 3.

Risultato di sequenziamento in NGS del microbiota.

CONCLUSIONI

È di grande attualità lo studio del microbiota finalizzato alla valutazione di disbiosi, ma le conoscenze necessarie per applicare in maniera corretta le tecniche e l'analisi bioinformatica disponibili per la sua tipizzazione non solo richiedono un continuo aggiornamento poiché in rapida, costante evoluzione, ma necessitano di uno stretto collegamento fra laboratorio di diagnostica e clinico. È pertanto molto importante sia affidarsi a centri altamente specializzati in analisi e interpretazione di profili metagenomici, sia ricordare che i dati ottenuti dalla tipizzazione del microbiota non possono mai essere valutati indipendentemente dai dati clinici e nutrizionali dei soggetti in esame.

Bibliografia

1. Petersen C, Round JL. *Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease*. Cell Microbiol 2014;16:1024-33.
2. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, et al. *The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Blood 2014;124:1174-82.
3. Hornung B, Martins Dos Santos VAP, Smidt H, et al. *Studying microbial functionality within the gut ecosystem by systems biology*. Genes Nutr 2018;13:5.
4. Casén C, Vebø HC, Sekelja M, et al. *Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD*. Aliment Pharmacol Ther 2015;42:71-83.
5. Panek M, Čipčić Paljetak H, Barešić A, et al. *Methodology challenges in studying human gut microbiota - effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies*. Sci Rep 2018;8:5143.
6. Raju SC, Lagström S, Ellonen P, et al. *Reproducibility and repeatability of six high-throughput 16S rDNA sequencing protocols for microbiota profiling*. J Microbiol Methods 2018;147:76-86.
7. Boers SA, Hiltemann SD2, Stubbs AP, et al. *Development and evaluation of a culture-free microbiota profiling platform (MYcrobiota) for clinical diagnostics*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2018 Mar 16. doi: 10.1007/s10096-018-3220-z [Epub ahead of print].

MICROBIOMA-MICROBIOTA: DAL LABORATORIO ALLA CLINICA

Mauro Castagnetta[1], Alberto Pilotto[2]

[1] Dipartimento di Scienze Genetiche e IBMDR, S.C. Laboratorio di istocompatibilità, [2] Dipartimento Cure Geriatriche, Ortogeriatria e Riabilitazione, E.O. Ospedali Galliera, Genova

… IL LABORATORIO

L'analisi del microbiota intestinale avviene partendo dal prelievo di un ***campione fecale***. La raccolta può avvenire secondo varie modalità, in ogni caso deve essere evitato il contatto con altre fonti di contaminazione batterica e con altri liquidi come le urine. Tre sono i principi da seguire nella gestione del campione fecale:

1) evitare di congelare/scongelare ripetutamente il campione in quanto può provocare la degradazione degli acidi nucleici;
2) evitare le fluttuazioni di temperatura che possono essere fonte di stress per le popolazioni batteriche e quindi impoverire il risultato dell'analisi finale;
3) accorciare il più possibile il periodo di tempo che intercorre tra la raccolta del campione e la sua analisi, per garantire che il risultato rappresenti al massimo la composizione del campione originale evitando eventuali crescite di un ceppo batterico rispetto all'altro.

Altra fase cruciale della preparazione del campione è l'***estrazione degli acidi nucleici***, che deve avvenire mediante tecniche che assicurino:

a) ricchezza e abbondanza del DNA estratto;
b) ottima qualità;
c) riproducibilità del risultato;
d) stabilità nel tempo.

Data la natura batterica del campione da cui vengono estratti gli acidi nucleici, è sostanziale che il kit usato preveda una fase di rottura delle membrane batteriche mediante lisi meccanica.

Il primo metodo di ***sequenziamento del genoma batterico*** è stato definito oltre vent'anni fa [1] come sequenziamento Shotgun, in cui il DNA batterico, dopo essere stato sottoposto a frammentazione casuale mediante enzimi di restrizione, viene clonato all'interno di plasmidi e questi ultimi inseriti all'interno del genoma di *E. coli*. La regione clonata è amplificata impiegando *primers* di *PCR (Polymerase Chain Reaction)* che includono un di-deossiribonucleotide fluorescente. Mediante rilevatori a laser è possibile rilevare la presenza dei fluorocromi e ricostruire la sequenza di basi del DNA.

Attualmente la tecnica di elezione per le analisi del DNA batterico è il *Next Generation Sequencing* (NGS) che rispetto alla tecnica precedente permette l'arricchimento clonale e la preparazione della "libreria genomica"; grazie all'uso dei cosiddetti "indici", brevi sequenze oligonucleotidiche dei campioni stessi, è possibile amplificare e processare più campioni contemporaneamente. La quasi totalità dei kit di analisi mediante NGS per l'analisi della composizione del microbiota è basata sul riconoscimento mediante *primers* di zone specifiche del gene responsabile della subunità 16S ribosomale, che è lungo approssimativamente 1500 bp e che contiene nove regioni variabili (V1-V9) inframmezzata da 10 regione fisse.

Le regioni variabili della subunità 16S ribosomale sono spesso impiegate nella ***classificazione filogenetica di genere e specie*** di molte popolazioni microbiche. A seguito del legame dei *primers* con le regioni variabili viene effettuato il cosiddetto "arricchimento" del campione, cioè vengono amplificate le sequenze che verranno poi usate dai software bioinformatici per definire "genere" e "specie" batteriche. A ciascun campione processato vengono aggiunte delle brevi sequenze nucleotidiche uniche definite come *barcode*, che essendo poi sequenziate insieme al campione stesso permettono la cosiddetta fase di *de-multiplexing*, effettuata dal software, garantendo che ciascuna sequenza o "*read*" rappresenti correttamente il genoma di partenza. Un tipico output di ***analisi metagenomica*** mostra approssimativamente 20 milioni di *reads*, di dimensioni medie pari a circa 300 bp, con un numero di *reads* per campione minimo (supponendo un'analisi di 96 campioni contemporaneamente) pari a circa 100.000, numero più che sufficiente per la successiva analisi bioinformatica.

… L'ANALISI BIOINFORMATICA

A differenza del processo di analisi di grandi genomi noti come quello umano, nell'analisi metagenomica del microbiota intestinale le *reads* rappresentano necessariamente un pool derivante da un insieme eterogeneo di diversi ceppi batterici che compongono il campione di origine.

Nell'analisi del microbiota, infatti, le *reads* non sono confrontate con un grande genoma noto "di riferimento" ma, dopo una selezione di tutte le sequenze con valori qualitativi superiori a una data soglia, le *reads* vengono categorizzate facendo uso di ***software specifici*** come Kraken [2] o Clark [3] che grazie al confronto di ciascun frammento di DNA con un database preesistente, forniscono un "punteggio di somiglianza" con la sequenza originale: il risultato viene espresso come la specie batterica associata al maggiore punteggio di somiglianza.

Nonostante l'impiego del NGS sia ampiamente accettato come metodo di elezione per l'analisi del microbiota, si segnala anche l'approccio di studio delle specie batteriche mediante sonde fluorescenti specifiche per le zone variabili del 16S rDNA batterico.

Il metodo, impiegato nel ***GA-map Dysbiosis Test*** (GA-test) [4] prevede l'utilizzo di 54 sonde oligonucleotidiche specifiche per le regioni variabili (V3-V9) del 16rDNA batterico associate a fluorocromi che permettono un riconoscimento sia qualitativo che quantitativo delle specie batteriche. Questo metodo di studio risulta capace di fornire informazioni sia sulla tipologia del ceppo batterico che sulla quantità relativa di esso rispetto alla totalità del campione di partenza. Il limite principale del test è il

pool di sonde impiegate che, a differenza del NGS, garantisce la rilevazione solo dei ceppi batterici previsti nelle sonde stesse.

… LA CLINICA

L'analisi di laboratorio fornisce quindi un doppio risultato: la qualità cioè le diverse specie batteriche, e la quantità cioè la percentuale maggiore o minore di popolazione batterica rispetto al totale del campione. Al fine di poter dare un significato clinico a queste informazioni è necessario sottolineare come questo tipo di ***analisi del microbiota***, definita come metagenomica, sia caratterizzata dall'***assenza di un controllo "negativo"*** per il singolo individuo e la specifica popolazione in esame, essendo la popolazione batterica del microbiota in continua mutazione durante la vita del soggetto e all'interno della stessa popolazione. Diventa quindi fondamentale analizzare una sufficiente quantità campionaria che permetta di definire per una data popolazione quali sono i *genera* batterici che possono essere considerati come "normali" [5]. È possibile definire come "normale" un microbiota facendo riferimento al concetto di ***"comunità stabile" di microrganismi***. Una comunità stabile è in grado di resistere al cambiamento causato da uno stress (resistenza) oppure di giungere a un nuovo stato di equilibrio dopo il superamento dell'evento stressante (resilienza); i due concetti di resistenza e resilienza sono le caratteristiche fondamentali associabili a un ***microbiota normale***. L'abbassamento della biodiversità della popolazione batterica, che normalmente è rappresentata da 5 diversi *Phyla* e circa 160 *specie* diverse [6], è associata a comportamenti scorretti dal punto di vista dello stile di vita (fumo di sigaretta, assunzione di alcool, scarsa attività fisica), della dieta (elevate quantità di grassi, scarsa introduzione di fibre) e dell'assunzione di farmaci (in particolare la politerapia).

Per questo, contestualmente alla raccolta del campione fecale per l'analisi del microbiota è importante raccogliere informazioni cliniche tra cui l'età, il sesso, il gruppo etnico di appartenenza, le abitudini alimentari, l'uso di antibiotici e/o probiotici, ma anche di altre terapie in atto. Da notare infine che alterazioni del microbiota intestinale sono state messe in relazione alla presenza di animali domestici [7].

La letteratura scientifica oggi suggerisce che l'alterato equilibrio quali e/o quantitativo del microbiota intestinale, caratteristico della condizione di disbiosi, è associato all'insorgenza di alcune patologie (o al peggioramento del relativo quadro clinico), come malattie autoimmuni, allergiche, metaboliche, infezioni batteriche e anche malattie neurodegenerative e alcune neoplasie [8]. Tuttavia non è ancora stata definita alcuna correlazione di tipo causa-effetto tra una definita condizione di disbiosi e una specifica condizione patologica. Per questo lo studio del microbiota intestinale e della disbiosi è oggi da considerare come un completamento importante della valutazione clinica che include i dati clinici e prognostici del soggetto con la finalità di perfezionarne la diagnosi per eventualmente prospettare un approccio terapeutico.

Bibliografia

1. Loman NJ, Pallen MJ. *Twenty years of bacterial genome sequencing*. Nat Rev Microbiol 2015;13:787-94.
2. Wood DE, Salzberg SL. *Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments*. Genome Biol 2014;15:R46.
3. Ounit R, Wanamaker S, Close TJ, et al. *CLARK: fast and accurate classification of metagenomic and genomic sequences using discriminative k-mers*. BMC Genomics 2015;16:236.
4. Casen C, Vebø HC, Sekelja M, et al. *Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD*. Aliment Pharmacol Ther 2015;42:71-83.
5. Attri S, Sharma K, Raigond P, et al. *Colonic fermentation of polyphenolics from Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) berries: assessment of effects on microbial diversity by principal component analysis*. Food Res Int 2018;105:324-32.
6. Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. *The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota*. FEMS Microbiol Rev 2014;38:996-1047.
7. Tun HM, Konya T, Takaro TK, et al. *Exposure to household furry pets influences the gut microbiota of infant at 3-4 months following various birth scenarios*. Microbiome 2017;5:40.
8. Petersen C, Round JL. *Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease*. Cell Microbiol 2014;16:1024-33.

http://www.pacinimedicina.it/microbioma-microbiota/

DALLA LETTERATURA
a cura di Alberto Pilotto

Gold Miles

Pamer EG. *Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic resistant pathogens*. Science 2016;352:535-8.

Il microbiota intestinale, che è composto da diverse popolazioni di specie batteriche commensali, fornisce resistenza contro la colonizzazione e l'invasione di patogeni. Il trattamento antibiotico può distruggere il microbiota intestinale e, paradossalmente, aumentare la suscettibilità alle infezioni. Ristabilire la resistenza alla colonizzazione mediata dal microbiota dopo una terapia antibiotica può ridurre significativamente le infezioni, soprattutto quelle indotte da batteri antibiotico-resistenti. La ricerca più avanzata sta identificando specie batteriche commensali che possono essere sviluppate all'interno di probiotici di futura generazione per ristabilire o incrementare la resistenza alla colonizzazione. In questo illuminante articolo, Eric Pamer descrive questi farmaci "viventi" che attualmente si trovano in vari stadi di sviluppo e produzione e che sono già al vaglio delle autorità regolatorie per la loro introduzione nella pratica clinica. Lo sviluppo di probiotici "next-generation" utili a ristabilire la resistenza alla colonizzazione ed eliminare i potenziali patogeni dall'intestino sembra essere un passaggio obbligato per poter ridurre le infezioni da batteri resistenti associate all'impiego di terapie antibiotiche.

Last minute

Manderino L, Carroll I, Azcarate-Peril A, et al. *Preliminary evidence for an association between the composition of the gut microbiome and cognitive function in neurologically healthy older adults*. J Intern Neuropsychol Soc 2017;23:1-6.

La nozione che una condizione di disbiosi del microbioma intestinale sia implicata in alterazioni delle funzioni cognitive deriva principalmente da studi condotti sull'animale. In questo studio collaborativo svolto presso le Università americane di Kent in Ohio, Chapel Hill in North Carolina e del North Dakota, 43 soggetti di età compresa tra i 50 e gli 85 anni sono stati sottoposti ad analisi del microbiota e costestualmente a un test cognitivo breve. I risultati hanno dimostrato, per la prima volta nell'uomo, una significativa differente distribuzione di *Bacteroides, Firmicutes, Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* tra soggetti con compromissione cognitiva rispetto ai soggetti non compromessi cognitivamente. Inoltre questi *phyla batterici* sono risultati significativamente associati alle performances dei testi cognitivi, in particolare i *Verrucomicrobia* e le misure delle funzioni attentive ed esecutive. Gli Autori concludono che la composizione del microbioma intestinale è associato alle performances ai test cognitivi in questi soggetti di età adulta e anziana. Naturalmente studi più ampi sono necessari sia per confermare queste preliminari osservazioni sia per esplorare i possibili meccanismi fisiopatologici che sottendono a tali risultati.

Last minute

Le Bastard Q, Al-Ghalith GA, Gregoire M, et al. *Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications*. Alim Pharmacol Ther 2018;47:332-45.

È ben noto che il microbioma intestinale può essere alterato dalla somministrazione di antibiotici. Meno noti sono gli effetti di farmaci non-antibiotici sul microbioma intestinale. In questa review sistematica condotta sui databases presenti online secondo le linee guida PRISMA, sono stati valutati sistematicamente gli studi riguardanti le alterazioni del microbioma intestinale associate alla terapia con inibitori di pompa protonica (PPI), metformina, farmaci antinfiammatori-non-steroidei (FANS), oppioidi, statine e antipsicotici. I PPI e gli antipsicotici sono risultati associati a riduzione della bio-diversità del microbioma intestinale, mentre gli oppioidi sono associati a un aumento della biodiversità. I PPI, inoltre, sono associati a riduzione dei *Clotridiales* e a un aumento degli *Actinomycetales, Micrococcaceae* e *Streptococcaceae*, modificazioni già descritte come associate a disbiosi e ad aumentata suscettibilità all'infezione da *Clostridium difficile*. Infine, i farmaci PPI, metformina, FANS, oppioidi e antipsicotici sono risultati significativamente associati a un aumento dei membri della classe *Gamma-proteobacteria* (*Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, e Citrobacter*) batteri spesso isolati dal sangue di pazienti critici. Gli Autori concludono che la prescrizione dei farmaci ha un notevole impatto sulla composizione generale del microbioma intestinale. Ulteriori studi sono necessari per esplorare l'effetto di altri farmaci comunemente prescritti sul microbioma intestinale e sullo stato di salute del soggetto.

Direttore Responsabile
Patrizia Alma Pacini

Edizione
Pacini Editore S.r.l.
Via Gherardesca 1 • 56121 Pisa
Info@pacinieditore.it • www.pacinimedicina.it
050 313011 • 050 3130300

Redazione
Lucia Castelli • lcastelli@pacinieditore.it

Grafica e impaginazione
Massimo Arcidiacono • marcidiacono@pacinieditore.it

Stampa
Industrie Grafiche Pacini • Pisa

© Copyright by Pacini Editore Srl

Finito di stampare presso le IgP, Pisa, Giugno 2018

Registrazione al tribunale n. 6/2017 del 30-5-2017 nel Registro della Stampa presso il Tribunale di Pisa

Cod. 3915153