



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Direttore Prof. Mario Petri

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica
Direttore Prof. Riccardo Zucchi

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e
Chirurgia
Direttore Prof. Giulio Guido

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN
MEDICINA E CHIRURGIA

Tesi di Laurea

**EFFICACIA DI UN TRATTAMENTO CON *LACTOBACILLUS CASEI*
DG (ENTEROLACTIS PLUS®) SUL CONTROLLO DEI SINTOMI
GASTROENTEROLOGICI E PSICOLOGICI DELLA SINDROME
DELL'INTESTINO IRRITABILE. STUDIO PILOTA.**

RELATORE:

Chiar.mo Prof. Santino Marchi

Dott. Massimo Bellini

CANDIDATO:

Andrea Pancetti

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

... Al mio Babbo ...

INDICE

RIASSUNTO	Pag. 4
1. INTRODUZIONE	Pag. 7
1.1 SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE.....	Pag. 7
1.2 IL MICROBIOTA INTESTINALE.....	Pag. 25
1.3 IL BRAIN - GUT - MICROBIOTA AXIS.....	Pag. 45
1.4 IL MICROBIOTA INTESTINALE NELLE PATOLOGIE.....	Pag. 62
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO	Pag. 72
3. MATERIALI E METODI	Pag. 73
4. RISULTATI	Pag. 86
5. DISCUSSIONE	Pag. 106
6. CONCLUSIONI	Pag. 109
7. BIBLIOGRAFIA	Pag. 111
8. APPENDICE	Pag. 120
9. RINGRAZIAMENTI	Pag. 155

RIASSUNTO

La sindrome dell'intestino irritabile (IBS: irritable bowel syndrome), caratterizzata dalla presenza di dolore addominale e da alterazioni dell'alvo, rappresenta una patologia ad elevata prevalenza nella popolazione generale ed è una vera e propria "sfida terapeutica" sia per il medico di medicina generale che per il gastroenterologo.

Molte sono le ipotesi fisiopatologiche ed eziopatogenetiche formulate, ma nessuna da sola riesce a spiegare completamente la totalità delle manifestazioni cliniche; probabilmente la contemporanea, reciproca interazione di più fattori gioca un ruolo determinante. In questo ambito l'asse intestino-cervello (brain-gut axis), cioè l'interazione tra il sistema nervoso centrale e la componente viscerale, sembra essere uno dei fattori maggiormente coinvolti.

Del tutto recentemente un nuovo "attore" è comparso sulla scena: il microbiota intestinale, cioè quella enorme popolazione batterica (ma anche virale e fungina) che è ospitata nell'apparato digerente umano e che è rappresentata in proporzione almeno dieci volte superiore a quella delle cellule umane. Il microbiota intestinale, un vero e proprio reattore biologico, ha la capacità di metabolizzare moltissime sostanze e di produrne molte altre, quali enzimi, vitamine e molecole con attività neuromodulatoria.

L'IBS ha un impatto socio economico e psicologico estremamente elevato determinando un fortissimo consumo di farmaci e di risorse diagnostiche, giorni di lavoro perduti e una qualità di vita che, almeno nelle forme più gravi, risulta decisamente scadente.

Moltissime sono le terapie proposte sinora, principalmente tese a ridurre il dolore o il fastidio addominale, a regolarizzare la frequenza evacuativa e a ridurre il meteorismo intestinale con la conseguente distensione addominale. E' stato calcolato che le possibili combinazioni terapeutiche che si potrebbero ottenere utilizzando uno soltanto tra i farmaci e gli integratori di ogni classe attualmente in commercio per l'IBS, ammonta a 7.550.000. Purtroppo, a fronte di questa enorme quantità di possibili scelte terapeutiche, una risposta clinica adeguata viene raggiunta solo in un limitato numero di pazienti, probabilmente non più del 30-50%. Per tale motivo la ricerca in campo biomedico è tesa a ricercare nuovi e più efficaci presidi o ad individuare nuove possibilità per farmaci già da tempo sul mercato. Tra questi ultimi i probiotici rappresentano una classe importante di farmaci che potrebbe avere interessanti proprietà terapeutiche non solo sulla sintomatologia addominale ma, attraverso la sintesi di sostanze ad attività neuromodulatoria (serotonina, GABA, citochine, ecc.) anche su quella psicologica che si associa così frequentemente in questi pazienti.

Purtroppo la notevole abbondanza di prodotti disponibili, appartenenti a ceppi e specie tra loro molto diverse e la relativa scarsità di studi randomizzati, controllati con adeguati parametri di valutazione dell'efficacia ha generato risultati eterogenei e tra loro difficilmente confrontabili. Al momento quindi, in base ai dati disponibili in letteratura è possibile affermare che è molto probabile un effetto positivo di questi farmaci nella terapia dell'IBS ma che parimenti non è possibile formulare un giudizio definitivo.

Il presente studio è stato condotto presso la U.O. di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, in collaborazione con l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa e con il Dipartimento DeFENS dell'Università degli Studi di Milano. Tale studio, in doppio cieco, randomizzato, con cross-over ha avuto lo scopo di testare gli effetti del trattamento con *Lactobacillus casei* DG (Enterolactis plus®) in pazienti con IBS valutando se eventuali cambiamenti della composizione del microbiota intestinale, determinati dalla somministrazione del probiotico in questione, potessero correlarsi con modificazioni della sintomatologia addominale, con la qualità di vita e con il profilo psicologico dei pazienti affetti da IBS.

Nonostante il non elevatissimo numero di pazienti arruolati in questo studio è possibile affermare che il trattamento con *Lactobacillus casei* DG, alle dosi e nelle modalità descritte in questo protocollo, ha determinato un aumento della concentrazione di questa specie batterica, dimostrando di soddisfare pienamente tutti i criteri per la definizione di un "vero" probiotico forniti dalla Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e dal Ministero della Salute.

Nel presente studio il trattamento con *Lactobacillus Casei* DG ha inoltre indotto l'incremento della concentrazione di altre 6 specie batteriche (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. zeae*, *L. thailandensis*, *L. camelliae* e *Pediococcus stilesii*) appartenenti tutte alla famiglia delle Lactobacillaceae e tutte, ad eccezione di *Pediococcus stilesii*, al genere *Lactobacillus*, cioè a quella famiglia e a quel genere ritenuti particolarmente benefici per l'organismo. Probabilmente la somministrazione di *L. casei* ha determinato un ambiente intestinale più favorevole allo sviluppo degli altri batteri attraverso la produzione di metaboliti attivi e protettivi.

Tra le specie batteriche che hanno incrementato la loro concentrazione è possibile reperire *L. rhamnosus* e *L. paracasei*, due specie presenti in prodotti farmaceutici normalmente in commercio e che sono molto utilizzate nella pratica clinica perché dotate d'azione probiotica, e come tali, capaci di favorire il mantenimento dell'ecosistema intestinale.

Il trattamento con *Lactobacillus casei* DG (Enterolactis Plus®) non ha modificato significativamente le variabili cliniche considerate dell'IBS, anche se è stato evidenziato un trend, peraltro non significativo, verso il miglioramento della Symptom Relief Scale (che valuta il grado di sollievo della sintomatologia addominale dell'IBS) tra la prima e la quarta settimana a favore del trattamento con *Lactobacillus casei* DG nei confronti del placebo.

Ciò non deve meravigliare perché è verosimilmente dovuto al fatto che in questo studio, che rimane comunque uno studio pilota, sono stati arruolati soltanto 14 pazienti. Infatti il costo delle metodiche utilizzate rendeva tale studio non facilmente proponibile su numeri più ampi in un solo centro.

Dai risultati emerge inoltre che la concentrazione di due specie sembra essere predittiva rispettivamente delle caratteristiche delle feci e del dolore addominale. In particolare i soggetti con maggiori concentrazioni di *Candidatus Amoebophilus asiaticus* presentano maggiori valori della Bristol Stool Chart (cioè presenza di feci più morbide) e nel medesimo paziente variazioni di concentrazione della stessa specie, rilevate nei diversi tempi in cui sono stati eseguiti i dosaggi, si correla positivamente con le variazioni della Bristol Stool Chart.

La concentrazione di *Blautia obeum* invece correla in maniera inversa con i valori individuali della Numerical Rating Scale (NRS), cioè l'aumento della sua concentrazione appare legata ad una minor gravità del dolore addominale.

Infine è interessante che la presenza di *Bifidobacterium ruminantium* si correla in maniera positiva con il miglioramento del benessere psicologico valutato con il test psicometrico Psychological General Well Being Index (PGWI). Tale dato avvalorava senz'altro la possibilità che una modifica del microbiota intestinale possa aver effetti benefici sugli aspetti psicologici e sulla qualità di vita. E' verosimile che la produzione di sostanze come serotonina e interleuchine ad azione antinfiammatoria possa svolgere un ruolo determinante in questo senso.

1. INTRODUZIONE

1.1 SINDROME DELL'INTESTINO IRRITABILE

La sindrome dell'intestino irritabile (IBS: Irritable Bowel Syndrome) appartiene ai disordini funzionali gastrointestinali (FGID) che sono definiti, secondo i criteri di Roma III, come “una combinazione variabile di sintomi gastrointestinali cronici o ricorrenti, non spiegabili con la presenza di alterazioni strutturali o biochimiche”. In mancanza di un'identificabile marker biochimico o strumentale, la definizione e la diagnosi dell'IBS, così come per gli altri FGID, si basano esclusivamente sulla presentazione sintomatologica. L'IBS viene definita dai criteri di Roma III come “un disordine funzionale intestinale nel quale il dolore addominale è in relazione con la defecazione o con un cambiamento dell'alvo, con segni di alterata defecazione e con distensione addominale” (vedi tabella 1).¹

Attenendosi scrupolosamente a questi criteri diagnostici, l'IBS risulta ben distinta da altri disordini funzionali intestinali quali la stipsi funzionale, la diarrea cronica, il gonfiore addominale. Questi disordini, pur condividendo alcuni sintomi con l'IBS rappresentano delle condizioni autonome con un diverso approccio diagnostico-terapeutico.²

L'IBS è un'importante entità patologica data la sua alta prevalenza, la sua alta comorbidità e gli enormi costi correlati.³ Negli USA, circa il 12% dei pazienti visitati dai medici di famiglia presentano IBS, ma è probabile che questa frequenza sia sottostimata, infatti molti soggetti che presentano sintomi non hanno mai richiesto una visita medica (non pazienti) e soltanto una minoranza, stimata in circa il 20%, si rivolge al medico di famiglia e ancor meno (circa il 5%) ad uno specialista.⁴

Tuttavia rappresenta la causa più frequente di una visita gastroenterologica.

L'IBS può ridurre notevolmente la qualità della vita, per le limitazioni fisiche e sociali causate dai disturbi addominali e per la sintomatologia di tipo psicologico (ansia, depressione, disturbi ossessivi) che a questa sindrome si associano. Inoltre, data l'elevata prevalenza, l'IBS determina elevati costi socio-economici in termini di visite mediche e indagini diagnostiche non necessarie, trattamenti medici, e talora anche chirurgici, del tutto inappropriati.

Soltanto una minoranza di persone con IBS richiede l'aiuto sanitario, tuttavia l'elevata prevalenza e la natura cronica e recidivante del disturbo fanno sì che l'IBS sia e rappresenti uno dei più costosi problemi sanitari.³

Ciò nonostante, sono disponibili trattamenti sintomatici piuttosto che trattamenti disease-modifying.⁴

PRESENTAZIONE CLINICA

La sintomatologia è caratterizzata da dolore addominale che si accompagna a variazioni della frequenza dell'alvo o alla comparsa di feci di consistenza alterata.

Il dolore, che è il sintomo più frequente, a volte è piuttosto un fastidio, spesso associato a tensione addominale, localizzato diffusamente nei quadranti addominali. Altre volte si presenta con accessi intermittenti di intensità elevata. Frequentemente il pasto rappresenta l'evento scatenante del dolore, mentre l'evacuazione di feci o di gas ne alleviano l'intensità o lo fanno scomparire.

In associazione con i sintomi addominali, questi pazienti riferiscono diarrea o stitichezza, oppure un'alternanza dei due eventi, ed in base alle caratteristiche dell'alvo l'IBS viene classificata in 4 gruppi (vedi tabella 2).

La forma delle feci può essere misurata oggettivamente e graduata dal paziente o dal medico; la Bristol Stool Chart ora è routinariamente utilizzata nei trials clinici, e i cambiamenti della forma delle feci si correlano approssimativamente al tempo di transito colico.

Nei casi di IBS diarroico (IBS-D) si tratta dell'evacuazione, più di 3 volte al dì, di feci non formate, più spesso immediatamente dopo i pasti o nella prima parte della giornata, e che quasi mai interrompono il sonno. La diarrea può risultare invalidante per il paziente, soprattutto se si accompagna a urgenza defecatoria con rischio anche di incontinenza. Essa non provoca malassorbimento né squilibri elettrolitici; le feci possono contenere muco, ma in genere non sangue né pus. Altri pazienti lamentano invece una ridotta frequenza dell'alvo oppure una defecazione difficoltosa, con emissione di feci caprine e sensazione di incompleta evacuazione (IBS con costipazione: IBS-C). Sebbene i pazienti affetti da IBS si lamentino indifferentemente di distensione o di gonfiore addominale, le due manifestazioni sono differenti e hanno una diversa prevalenza nei sottogruppi di IBS. La sensazione di gonfiore senza reale aumento del volume addominale è più frequente nell'IBS-D ed è associata ad uno stato di ipersensibilità viscerale. La distensione addominale, ovvero con oggettivo aumento del volume addominale, è più frequente nell'IBS-C ed è associata ad iposensibilità.¹

Per una sicura diagnosi di IBS i sintomi dovrebbero essere presenti per almeno sei mesi.

Un numero di differenti condizioni possono causare transitori sintomi intestinali, comprese la gravidanza, dieta non adeguata, intossicazioni alimentari, diarrea del viaggiatore, assumere una posizione supina appena dopo i pasti, perdita di peso e stress acuto (diarrea nervosa); queste devono essere distinte dai sintomi cronici e ricorrenti dell'IBS.

EPIDEMIOLOGIA

L'IBS è una comune patologia in tutto il mondo. Studi epidemiologici hanno definito la prevalenza ed identificato i potenziali fattori di rischio per IBS.

La prevalenza di IBS è stimata variare dal 3% al 20% negli Stati Uniti, con risultati simili in altre nazioni.³ Le persone più giovani hanno la maggiore prevalenza all'interno del gruppo dei pazienti con IBS. Generalmente si crede che l'IBS non sia comune tra le persone anziane, ma studi epidemiologici indicano che questa sindrome aumenta con l'avanzamento dell'età.⁴

Il rapporto maschi:femmine si aggira intorno a 1:2 nella maggior parte degli studi di popolazione ed hanno tutti riportato una predominanza per le donne.^{3, 4} Le donne sane hanno una sensibilità rettale più alta, un transito colico più lento, un output fecale di minore entità rispetto agli uomini, che potrebbero spiegare il perché certi sintomi, come lo sforzo defecatorio e una consistenza maggiore delle feci, sembrano essere più comuni tra le donne.⁴

La prevalenza dell'IBS è generalmente simile tra i bianchi e i neri, sebbene alcuni dati suggeriscono che sia minore tra gli ispanici rispetto ai non ispanici bianchi negli Stati Uniti. L'IBS è comune in Cina, Giappone, Sud America, e il subcontinente indiano. Inoltre, l'IBS è comune e la sua prevalenza è comparabile in tutti i paesi dove è stata studiata.^{3, 4}

I criteri di Roma III suddividono i pazienti con IBS in sottogruppi in base alle caratteristiche delle feci (vedi tabella 2), ma pochi dati sono disponibili sulla prevalenza dell'IBS in base a tali sottogruppi. Inoltre non è chiaro se quei pazienti che presentano una sintomatologia dominata da diarrea o costipazione, e seguiti abbastanza a lungo termine, eventualmente sviluppano le altre sintomatologie contrapposte, cioè, quelli con la costipazione come sintomo dominante svilupperanno un IBS-D, o quelli che hanno invece la diarrea come sintomo predominante svilupperanno un IBS-C.

In uno studio con 317 pazienti reclutati per un trial clinico, all'inizio il 36% aveva IBS-D, il 34% IBS-C, il 31% IBS-M; più del 75% dei pazienti ha cambiato il sottogruppo di IBS a cui apparteneva durante un anno di follow-up. Di solito quest'ultimi pazienti facevano parte del sottogruppo IBS-M e andavano a fare parte di un altro degli altri sottogruppi, o da uno degli

altri sottogruppi passavano al sottogruppo IBS-M, ma meno di un terzo cambiava il sottogruppo di appartenenza da IBS-D a IBS-C, o viceversa.⁴

Il fattore di rischio meglio accettato per IBS è la gastroenterite batterica. Dal 7% al 30% dei pazienti che sono guariti da un episodio dimostrato di enterite batterica sviluppa IBS.⁴

Il rischio di IBS postinfettiva è stato riportato essere aumentato con la depressione, eventi avversi della vita e ipocondria, sesso femminile, giovane età, e prolungata durata della diarrea successiva all'attacco iniziale di gastroenterite. Sono importanti anche i fattori di virulenza batterici, ma IBS può seguire a enteriti non batteriche, incluse le gastroenteriti da Norovirus, o infezioni con Trichinella.⁴

Altri fattori di rischio per IBS includono un ambiente benestante durante l'infanzia, uso di estroprogestinici, uso di terapia ormonale sostitutiva in menopausa, recente uso di antibiotici, intolleranza alimentare e scarsa qualità di vita.^{3,4}

C'è evidenza che i pazienti con IBS siano a maggior rischio di essere sottoposti a un eccesso di chirurgia. In un grande studio di organizzazione sanitaria, i pazienti con IBS, comparati ai controlli, hanno riportato aver avuto un numero maggiore di colecistectomie (12% vs 4%), appendicectomie (21% vs 12%), isterectomie (33% vs 17%); l'IBS era associato indipendentemente da queste patologie. Una completa spiegazione a questi dati è incerta, ma presumibilmente, una parte di questo eccesso di chirurgia può riflettere una misdiagnosi o un intervento inappropriato. È anche possibile che l'IBS potrebbe predisporre a certe patologie che portano alla chirurgia. Per esempio, la costipazione è associata a un aumentato rischio di calcoli della cistifellea, ma se questa associazione si riferisca a IBS-C è incerto. Alternativamente, la storia di un evento biliare- calcoli della cistifellea o colecistectomia- è associata a un aumentato rischio di una nuova insorgenza di IBS.⁴

Per spiegare una possibile relazione sono state avanzate varie ipotesi.

Tuttavia il legame tra interventi chirurgici addominali e IBS rimane dubbia; mancano tutt'ora studi prospettici che dimostrino l'insorgenza dei sintomi intestinali successivamente all'intervento, e in questi soggetti è anche riportato un elevato numero di altri interventi. È quindi possibile che si tratti di soggetti nei quali l'alterato comportamento di malattia induca un ricorso eccessivo al medico e alle cure sanitarie, e gli interventi stessi siano il risultato di un'errata attribuzione dell'origine dei sintomi (il dolore in particolare) da disordini funzionali gastrointestinali ad alterazioni organiche concomitanti.⁵

C'è una buona evidenza per una diminuita qualità di vita (QdV) legata alla salute nei pazienti con IBS e che la QdV è afflitta ad un grado comparabile con quello di altri disordini cronici come depressione o GERD (malattia da reflusso gastroesofageo). Piuttosto che l'IBS come

causa di questa diminuita QdV, una spiegazione alternativa per questa associazione è che la scarsa QdV predisponga a un più alto rischio per IBS.⁴

L'IBS è associata a importanti costi a causa di giorni persi dal lavoro, eccesso di visite mediche, test diagnostici, e uso di medicinali.

Uno studio comprensivo dell'onere di malattia negli Stati Uniti, ha stimato che l'IBS è responsabile di 1,6 miliardi di dollari come costi diretti e 19,2 miliardi di dollari per i costi indiretti. Inoltre i pazienti con IBS consumano oltre il 50% in più delle risorse dell'assistenza sanitaria rispetto ai controlli combinati senza IBS.⁴

FISIOPATOLOGIA

Come tutti i disordini funzionali gastrointestinali l'eziopatogenesi dell'IBS non è nota, tuttavia si ipotizza che le sue manifestazioni sintomatologiche siano causate da più fattori concorrenti.^{3, 6, 7}

Differenti meccanismi sono stati implicati nella patogenesi di IBS, inclusi una motilità alterata, ipersensibilità viscerale, infiammazione di basso grado, e lo stress. Fattori genetici potrebbero modulare l'elaborazione centrale di segnali gastrointestinali, l'infiammazione e la risposta immune locale, possibilmente predisponendo a IBS. Sembra ragionevole postulare che affinché l'IBS si manifesti dovrebbero verificarsi diverse anomalie, "colpi multipli".

- ALTERATA MOTILITA' DEL COLON E DEL TENUE

In IBS, la diarrea può verificarsi attraverso multipli meccanismi colici, che comprendono un aumento delle high-amplitude propagated contractions (HAPCs), un'umentata risposta gastrocolica (prolungata attività motoria rettosigmoidea in risposta a un pasto), o ipersensibilità rettale. La costipazione può essere secondaria a un aumento delle contrazioni segmentali (non propulsive), HAPCs diminuite, o ridotta sensibilità rettale. Può essere documentato il transito intestinale del colon e del tenue ritardato in IBS-C e accelerato in IBS-D. Il dolore addominale in IBS può essere anche associato a HAPCs. Sono state osservate in IBS un maggiore incremento delle contrazioni fasiche dell'ileo terminale successivamente alla distensione, pasti grassi, e colecistochinina. In IBS sono stati anche notati cluster discreti di contrazioni digiunali con maggiore frequenza e durata, e sono stati associati al dolore in un limitato numero di pazienti con IBS.

La motilità colica può essere aumentata in IBS da ansia, rabbia e l'instillazione di acido deossicolico, ma questo incremento, sebbene maggiore rispetto ai controlli, non è specifico

dell'IBS³; un maggiore aumento è stato osservato dopo la somministrazione di CRH (corticotropin releasing hormon), e questo aumento è ridotto dagli antagonisti del CRH. Sono state riportate disfunzioni autonome in IBS, con disfunzioni adrenergiche del simpatico associate alla diarrea e disfunzioni vagali associate alla costipazione.

- IPERSENSIBILITA' VISCERALE

Negli anni '70, fu dimostrato che nell'IBS la distensione di un palloncino rettale provocava dolore a volumi minori rispetto ai controlli; questo è stato poi confermato da numerosi studi con l'uso dei palloni barostatici che controllano i cambiamenti della compliance, portando all'ipotesi che l'ipersensibilità colica sia un utile marker biologico di IBS. ⁴

Questa osservazione viene interpretata come evidenza di un'alterata ed esaltata percezione di normali eventi fisiologici o sensazioni dolorose che avvengono nell'intestino in risposta, per esempio, all'ingestione di cibo, alla defecazione o alla presenza di gas intestinale. ¹

L'ipersensibilità viscerale potrebbe spiegare il fatto che i pazienti con IBS sono più preoccupati, rispetto ai controlli, della presenza di gas e delle contrazioni intestinali dopo un pasto o stress. L'ipersensibilità viscerale non è un reperto universale nell'IBS e affligge circa il 60% dei pazienti.

I neurotrasmettitori putativi che sono di rilievo nell'ipersensibilità viscerale sono la serotonina, le neurochinine, e il calcitonin gene-related peptide. La capsicina (contenuta nel peperone rosso) ha il proprio recettore sulle fibre nervose, anche chiamato transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1), che appare essere aumentato nel colon rettosigmoideo nell'IBS e potrebbe mediare il dolore viscerale. Anche il recettore NMDA può essere importante dato che regola l'eccitabilità neuronale centrale (midollo spinale).

Le proteasi seriniche sono state ipotizzate agire come molecole del segnale attraverso l'attivazione dei proteinase-activated receptors (PARs). Estratti derivati dalle biopsie della mucosa colica dei pazienti con IBS (ma non dei controlli) sono stati osservati sensibilizzare i nervi murini in coltura; ciò era bloccato da un inibitore delle proteasi seriniche. Un significativo aumento di tali enzimi è stato osservato nelle feci dei pazienti con IBS-D.⁸

Le proteasi seriniche potrebbero potenzialmente danneggiare le tight-junction e aumentare la permeabilità intestinale attraverso l'attivazione dei PARs. L'origine di queste proteasi ritrovate nelle feci è incerta, ma potrebbero derivare dai mastociti o dal microbiota intestinale.⁸

È possibile che l'infiammazione sia responsabile della sensibilizzazione in un sottogruppo di pazienti con IBS; comunque, parte di questa diminuita soglia dolorifica alla distensione col

palloncino può essere attribuita all'ipervigilanza o all'eccessiva attenzione, o paura, di uno stimolo doloroso.⁴

Evidenze suggeriscono che nell'ipersensibilità viscerale presente in IBS ha un ruolo anche una disregolazione centrale. Segnali afferenti viscerali dall'intestino raggiungono il tronco encefalico e il talamo e sono percepiti consciamente solo occasionalmente, sebbene potrebbero esserci alcune registrazioni di segnali di bassa intensità.⁹

La modulazione anormale dei segnali afferenti viscerali può avvenire a vari livelli: viscerale, spinale e regioni centrali.

Studi basati sui cambiamenti del flusso sanguigno cerebrale, studi di imaging funzionale cerebrale (risonanza magnetica funzionale o positron emission tomography PET) hanno suggerito che nell'IBS ci sono alterazioni nella risposta encefalica agli stimoli viscerali. Nei pazienti con IBS, è stata riportata una maggiore attivazione della corteccia medio-cingolata, un'area che elabora i segnali viscerali, successivamente alla distensione rettale.⁴

Queste osservazioni potrebbero spiegare il perché l'ansia o lo stress possano aumentare la percezione del dolore viscerale, considerato che lo svago diminuisce il dolore nell'IBS.

- CONTROLLO NEUROIMMUNOENDOCRINO

Una serie di studi condotti sia negli animali che nell'uomo indicano nell'esaltata risposta neuroendocrina allo stress un meccanismo patogenetico rilevante in IBS. Nella mucosa colica di pazienti con IBS, è stata evidenziata un'attivazione di cellule immunocompetenti (CD3 e CD25) anche in assenza di un pregresso evento tossinfettivo acuto.⁹

Il sistema dei circuiti nervosi deputati alle emozioni (paura, rabbia, tristezza, allegria) o "sistema motorio emozionale", che include centri della corteccia prefrontale laterale e mediale, amigdala, ipotalamo, area grigia periacqueduttale, attivata dallo stress psicosociale a sua volta stimolerebbe il sistema neuroendocrino tramite l'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale (HPA), il sistema nervoso autonomo (SNA), tramite i nuclei pontini, e interagirebbe con i succitati centri nervosi deputati al controllo della sensibilità viscerale. La secrezione di CRH, cortisolo, adrenalina e noradrenalina possono concorrere nello stimolare la degranolazione dei mastociti e ad alterare la risposta immunitaria a livello della parete gastrointestinale. Inoltre lo stress può facilitare l'invasività transparietale della flora batterica tramite l'attivazione dei mastociti, sia causando deplezione mucinica delle cellule caliciformi e conseguente riduzione dello strato di muco che separa il lume intestinale dall'epitelio, sia aumentando direttamente la permeabilità di parete con ulteriore attivazione del sistema immunitario. Quest'ultimo, a sua volta può stimolare direttamente le fibre nervose intramurali e influenzare, mediante la

liberazione di citochine e chemochine, la rete del circuito del sistema motorio emozionale a livello del SNC.¹

- INFIAMMAZIONE

Il normale intestino è in uno stato di infiammazione cronica che avviene a causa di un equilibrio tra gli organismi enterici commensali e le cellule del sistema immune dell'ospite, compresi i mastociti e i linfociti T attivati, che sono aumentati al di sopra dei livelli normali nella mucosa in sottogruppo di pazienti con IBS, suggerendo che potrebbe essere presente una patologia intestinale con infiammazione di basso grado.¹⁰ Inoltre, è stata osservata nell'IBS grave un'infiltrazione linfocitaria del plesso mioenterico associata a una degenerazione neuronale, così come un aumento dei mastociti nella muscolare esterna.¹⁰

La causa di queste anomalie è sconosciuta ma infezioni, una flora batterica anormale, o antigeni alimentari potrebbero tutti contribuire.

Dal 7% al 30% dei pazienti che sono guariti da un episodio dimostrato di enterite batterica sviluppa IBS.⁴ Uno studio, comunque, ha suggerito che quei pazienti con una preesistente IBS che sviluppano una gastroenterite, potrebbero essere più propensi nel ricercare una consulenza medica, in tal modo gonfiando l'apparente rischio stimato di questo gruppo.⁴ Se la malattia dura più di 3 settimane o ci sono coinvolti organismi che sono tossicogenici allora il rischio di un'IBS postinfettiva è aumentato. Inoltre, i pazienti con un distress psicologico potrebbero quindi avere un aumentato rischio di IBS postinfettiva; in quei pazienti che la sviluppano, vi è un incremento dei linfociti T, CD3, CD4 e CD8, macrofagi e cellule enteroendocrine (enterocromaffini).⁴

I mastociti potrebbero giocare un ruolo centrale nell'IBS. I mastociti attivati rilasciano triptasi e istamina e sono stati osservati in stretta prossimità delle terminazioni nervose del colon in pazienti con IBS; questa scoperta è stata correlata con il dolore addominale. I supernatanti derivati da biopsie della mucosa colica dei pazienti con IBS si sono dimostrati in grado di eccitare i nervi sensitivi deputati alla nocicezione viscerale nel ratto, suggerendo che i mediatori dei mastociti, incluse la triptasi, l'istamina, e la prostaglandina E2, potrebbero rappresentare un altro meccanismo capace di indurre ipersensibilità viscerale nell'IBS.

L'infiammazione colica è associata alla produzione di numerosi e importanti mediatori inclusi la 5-idrossi-triptamina (5-HT) (serotonina), prostaglandine, bradichinine, adenosina, e nerve growth factor.⁶

Un anormale rilascio di 5-HT potrebbe avere un ruolo centrale nelle manifestazioni dell'IBS. Circa il 95% della 5-HT presente nel corpo è contenuta nell'intestino, in particolare nelle

cellule enterocromaffini e nelle terminazioni nervose del SNE; è rilasciata a seguito di un aumento della pressione intraluminale, come dopo un pasto. La 5-HT quindi agisce sui neuroni intrinseci primari afferenti nell'iniziare il riflesso peristaltico attraverso l'attivazione di vie eccitatorie ascendenti e vie inibitorie discendenti.⁶

La 5-HT è ricaptata da uno specifico trasportatore (SERT) espresso negli enterociti. Ci sono alcune evidenze che nell'IBS possa avvenire un esagerato rilascio di 5-HT dopo un pasto.⁴ È stato osservato nei campioni di biopsie rettali che la trasmissione molecolare della 5-HT potrebbe essere anormale in IBS. In uno studio la ricaptazione della 5-HT era diminuita nell'IBS rispetto ai controlli, sebbene la secrezione della 5-HT non era afflitta e il numero delle cellule enteroendocrine non era cambiato. Le scoperte erano simili tra i pazienti con IBS-C e IBS-D, portando all'ipotesi che nell'IBS c'è un'aumentata disponibilità di 5-HT mucosale che può indurre diarrea, ma se c'è una desensibilizzazione dei recettori della 5-HT, questo può portare alla costipazione o a un pattern con alvo alternante.⁴

- FATTORI PSICOLOGICI

Depressione, ansia e somatizzazione sono le più frequenti condizioni psichiatriche che coesistono con l'IBS; in riferimento alla pratica, dal 40% al 94% dei pazienti con IBS ne sono affetti. Alcuni hanno suggerito che il bias per la consultazione spieghi i più alti tassi di comorbidità psicologica e psichiatrica in IBS rispetto ai controlli, ma altri dati suggeriscono che l'associazione è reale.³

Nei pazienti con IBS è stata riportata più frequentemente una storia di abuso sessuale, fisico o emotivo, rispetto ai controlli.¹³ È stato dimostrato che l'abuso non altera la sensibilità rettale ma potrebbe modulare le risposte cerebrali al dolore.¹¹

I pazienti con IBS sono più frequenti nel riportare maggiori eventi stressogeni nella vita quotidiana, rispetto a quelli con malattia organica o i controlli sani, e potrebbero essere più suscettibili all'influenza dello stress sulla funzione gastrointestinale.³

Lo stress nell'infanzia può essere particolarmente importante.

Nei ratti, la separazione materna nel periodo perinatale induce uno stato ansioso ed è associato con ipersensibilità viscerale. Inoltre, nei ratti, uno stress sufficientemente grave porta al rilascio di CRF e ad un aumento del transito colico. Lo stress nei volontari sani cambia le risposte relative alla secrezione e alla permeabilità intestinale. Uno stress sostenuto potrebbe, quindi, essere importante sia nell'insorgenza che nella persistenza dell'IBS.⁴

L'ansia e la depressione, piuttosto che essere un problema primario potrebbero essere secondari alla produzione di citochine proinfiammatorie. Nell'IBS, l'attivazione immune

dell'intestino è stata collegata con gli elevati livelli di TNF- α e di ansia, suggerendo che l'ansia nell'IBS potrebbe insorgere, in alcuni casi, secondariamente all'infiammazione intestinale. I mastociti comunicano con il sistema nervoso enterico e centrale; un eccesso di mastociti nel colon sembra essere associato alla depressione e alla fatica in IBS.¹⁰

Numerosi studi hanno descritto un alterato profilo psicologico dei pazienti con IBS¹², tuttavia è da notare che le alterazioni psicologiche non giustificano la presenza dei disturbi perché il profilo psicologico di soggetti con disturbi funzionali gastrointestinali, che non richiedono l'operato del medico (non-pazienti), non differisce da quello di soggetti sani di controllo. Tuttavia coloro che consultano i sanitari (pazienti), e in maggior grado quelli che richiedono l'intervento di centri specializzati, hanno un maggior numero di alterazioni psicologiche rispetto alle popolazioni di controllo. Le alterazioni psicologiche, così come alcune condizioni ambientali quali il modello di comportamento della famiglia, il livello culturale, lo stato di sicurezza sociale, traumi fisici o psichici concorrono variamente al comportamento di malattia, all'espressività dei disordini e alla risposta terapeutica. Ad esempio l'aver subito violenza fisica o sessuale, specialmente se in età infantile, si associa ad un maggior numero di disturbi gastrointestinali ed extraintestinali, ad una maggior severità dei sintomi e ad una ridotta risposta alla terapia.¹

- FATTORI GENETICI

Limitate, ma crescenti evidenze mostrano almeno una piccola componente ereditaria dell'IBS. C'è un raggruppamento di IBS nelle famiglie. Studi sui gemelli hanno dimostrato che generalmente c'è una maggiore concordanza per IBS tra i gemelli monozigoti rispetto a i gemelli dizigoti, suggerendo una modesta componente genetica, sebbene la componente ambientale è probabilmente molto più grande.¹³

Le associazioni con i polimorfismi della regione promotrice del gene del trasportatore della 5-HT (SERT) nell'IBS non sono state sufficientemente consistenti.¹⁴

Una variante funzionale nel recettore della serotonina di tipo 3 potrebbe essere associata all'IBS nelle donne.¹⁵

PROCEDIMENTO DIAGNOSTICO

Il sospetto diagnostico di IBS viene posto in presenza continua o ricorrente, da almeno tre mesi, dei sintomi riportati nella tabella 1. L'esame obiettivo del soggetto con IBS non offre reperti discriminanti. È possibile talora riscontrare meteorismo addominale oppure la

cosiddetta corda coli riferibile a un colon abnormemente contratto e dolorabile, spesso a sinistra. Questi riscontri, sebbene frequenti, sono del tutto aspecifici, ma un attento esame fisico, comprendente l'esplorazione rettale, è utile per escludere altre malattie e rassicurare il paziente.

Un procedimento diagnostico completo che prenda in considerazione con sistematicità tutte le possibili diagnosi differenziali comporterebbe un vasto impiego di esami, biochimici su sangue e feci, ecografici, radiologici ed endoscopici. Questo approccio, basato su una diagnosi di esclusione, con ricorso ad esami costosi, stressanti ed invasivi con rischio di danno iatrogeno e che tende a rafforzare l'atteggiamento da malattia, non si è rivelato utile nella maggior parte dei pazienti.

In realtà l'impiego dei criteri diagnostici di Roma III con un'attenta anamnesi, che escluda i fattori di rischio e di allarme, associata ad esami di laboratorio di routine, ha dimostrato un valore predittivo positivo del 98%.

Partendo da questo presupposto è indicato un protocollo diagnostico che preveda l'utilizzazione degli esami in modi e tempi differenti, secondo il sintomo principale e le caratteristiche anamnestiche del soggetto, evitandone l'uso acritico e indiscriminato.

Nei soggetti di età inferiore a 50 anni, con sintomi compatibili con i criteri diagnostici di Roma III per IBS ed invariati da lungo tempo, con anamnesi familiare negativa per tumori o malattie infiammatorie intestinali, in assenza di segni di allarme (vedi tabella 3)¹⁶, l'indagine diagnostica può essere limitata a esami di emocromo, sideremia, indici di flogosi, urine, feci e, per l'elevata prevalenza della malattia celiaca, alla valutazione degli anticorpi anti-transglutaminasi o degli anticorpi anti-endomisio. Se questi esami risultano normali, è consigliabile prescrivere direttamente la terapia, rassicurando il paziente sul suo stato di salute. In questo modo gli esami più invasivi vengono limitati ai pazienti che, per vari motivi, risultano a rischio motivato di malattia organica e la terapia ha un ruolo nell'iter diagnostico perché usata come verifica indiretta della diagnosi.

In soggetti nei quali, per età o dati anamnestici, la presentazione clinica è dubbia, o nei quali non si ottiene una risposta terapeutica soddisfacente è utile intraprendere un algoritmo diagnostico guidato dal sintomo predominante.

Nei pazienti con IBS-C, escluso un ostacolo meccanico (colonscopia o clisma a doppio contrasto), è necessario considerare cause metaboliche (ipercalcemia) e ormonali (ipotiroidismo, diabete mellito, iperparatiroidismo) che possono alterare l'attività motoria del colon. Nei casi con stipsi funzionale severa sono indicati studi funzionali specifici del colon-retto (tempi di transito intestinali, manometria ano-rettale, defecografia). In caso di IBS-D o

IBS-M vanno ricercate in primo luogo situazioni che possono presentarsi con sintomatologia lieve e che abbiano una prevalenza rilevante nella popolazione generale. Tra queste, come già menzionato, particolare attenzione va rivolta alla celiachia che per la sua elevata prevalenza (1:150-1:250) e la diversa espressione clinica. La presenza di rettorragia, sebbene frequentemente di natura emorroidaria, richiede comunque una colonscopia (con biopsie). La calprotectina fecale, se normale, esclude la presenza di malattie infiammatorie croniche coloretali in fase di attività. Per la diagnosi differenziale con le malattie del tenue e in primo luogo con le malattie infiammatorie croniche intestinali è utile l'ecografia, in particolare quella con contrasto, e un'ileoscopia retrograda con biopsie.

Esami ecografici e tomografici dell'addome e delle pelvi sono anche utili a valutare cause extra-intestinali del dolore. Nei casi di dolore severo e ricorrente una radiografia dell'addome durante l'episodio può essere utile per valutare la presenza di livelli idroarei sospetti per una situazione di sub-ostruzione. In questi casi vanno eseguiti esami endoscopici, radiologici ed ecografici delle anse intestinali allo scopo di identificare la sede dell'ostacolo. ¹

Tab. I. Criteri diagnostici di sindrome dell'intestino irritabile (Roma III)
Dolore o fastidio addominale ricorrente* presente per almeno 3 giorni al mese, negli ultimi 3 mesi e con almeno 2 delle seguenti caratteristiche:
<ul style="list-style-type: none"> -Regredisce o migliora con la defecazione -Insorge in associazione a una variazione della frequenza dell'alvo -Insorge in associazione a una variazione della consistenza (aspetto) delle feci
La presenza di uno o più dei seguenti sintomi rinforza la diagnosi di IBS, ma non è necessaria:
<ul style="list-style-type: none"> -Meno di 3 evacuazioni alla settimana -Più di 3 evacuazioni al giorno -Feci dure o caprine -Feci molle o liquide -Sforzo durante l'evacuazione -Sensazione postdefecatoria di incompleto svuotamento intestinale -Stimolo impellente -Presenza di muco con le feci -Tensione o distensione addominale
*i sintomi devono essere insorti almeno 6 mesi prima della diagnosi

Tab. II. Sottogruppi di IBS secondo le caratteristiche delle feci

- IBS con stipsi prevalente*: presenza di feci dure o caprine > 25% delle evacuazioni, presenza di feci non formate < 25% delle evacuazioni
- IBS con diarrea prevalente*: presenza di feci non formate > 25% delle evacuazioni, presenza di feci dure o caprine < 25% delle evacuazioni
- IBS misto*: presenza di feci non formate > 25% delle evacuazioni e presenza di feci dure o caprine > 25% delle evacuazioni
- IBS indeterminato*: criteri insufficienti per caratterizzare la IBS come stipsi prevalente, diarrea prevalente o misto

Tab. III Sintomi e segni di allarme

- Recente insorgenza o variazioni dei sintomi
- Dimagrimento
- Sangue nelle feci
- Anemia
- Febbre
- Tumefazioni addominali
- Risveglio notturno causato dai disturbi

TRATTAMENTO

Il trattamento di IBS è ancora largamente insoddisfacente e non vi è ancora oggi uno schema terapeutico ritenuto “gold standard”. Moltissime sono le terapie proposte sinora, principalmente tese a ridurre il dolore o il fastidio addominale, a regolarizzare la frequenza evacuativa e a ridurre il meteorismo intestinale con la conseguente distensione addominale. Purtroppo, a fronte di questa enorme quantità di possibili scelte terapeutiche, una risposta

clinica adeguata viene raggiunta solo in un limitato numero di pazienti, probabilmente non più del 30-50%. Cercherò, di seguito, di presentare brevemente almeno i vari cardini proposti per il trattamento di IBS.

- EDUCAZIONE E COUNSELING

L'IBS tende a essere un disordine che dura tutta una vita, e lo stabilire una solida relazione medico-paziente è la chiave per ottenere la migliore assistenza clinica.⁶

I pazienti con IBS spesso percepiscono che il loro medico abbia un parere altamente negativo a riguardo della patologia, e questa convinzione di per sé impedisce la migliore assistenza. Altre comuni percezioni dei pazienti a riguardo dell'assistenza che ricevono, includono il sentirsi erroneamente etichettati come soggetti disturbati psicologicamente e che non è stata data loro un'adeguata informazione medica o supporto. Un'adeguata relazione medico-paziente è stata associata con una riduzione dell'uso dei servizi sanitari.

È importante scoprire il perché il paziente abbia deciso di fare ricorso all'assistenza medica al momento che ne fa uso. La ragione può variare: nuovi eventi stressogeni della vita, fattori relativi alla dieta o a cambiamenti di farmaci che esacerbano la sintomatologia, aumentata paura di una malattia seria, e lo sviluppo di una comorbidità psichiatrica trattabile.

Ai fini di ottenere un'ottima rassicurazione, è importante prima educare i pazienti e poi rassicurarli attivamente. I pazienti tipicamente vogliono capire perché i sintomi si siano manifestati; vogliono anche ottenere una conferma che i loro sintomi siano reali.²

- DIETA

Una cura standard per IBS ha tipicamente una dieta ad alto contenuto di fibre. I dati provenienti da trial controllati e randomizzati a disposizione, indicano che le fibre apportano un beneficio globale, e il number needed to treat (NNT) è 11.⁴ I supplementi di fibre sono spesso meglio tollerati rispetto alle fibre introdotte con la dieta. La migliore evidenza dei benefici dei supplementi di fibre deriva da studi sull'Ispagula (mucillagine idrofilica dello psyllium; guscio dell'ispagula). La crusca di frumento non è stata migliore del placebo nell'IBS.⁴ Le fibre non sono d'aiuto per il dolore, ma possono giovare alla costipazione e a volte possono aumentare la consistenza delle feci.

Il fattore chiave nell'assunzione dei supplementi di fibre è iniziare a basse dosi e incrementare molto gradualmente. Questo riduce i problemi di un eccessivo gonfiore, gas, e dolore che sono tipicamente aggravate dall'aumentata assunzione di fibre. Molti pazienti con IBS sospettano che un'intolleranza alimentare potrebbe essere rilevante per i loro sintomi. È utile

determinare la quantità di latte o di prodotti caseari che vengano consumati per decidere se è sensato considerare i test per l'intolleranza al lattosio.

Il consumo di fruttosio è aumentato drammaticamente negli Stati Uniti e altri paesi sviluppati; l'eccesso di fruttosio potrebbe portare ad alcuni dei sintomi IBS simili, che potrebbero essere risolti dall'esclusione di questo zucchero. Anche ridurre i cibi grassi, gli alimenti che producono gas (dieta a basso contenuto di FODMAP, "Fermentabili Oligo-, Di- e Mono-saccaridi e Polioli")^{17, 18}, caffeina, o alcol potrebbe essere utile per alcuni pazienti. Le diete di esclusione possono essere utili in alcuni casi. Una review sistematica delle diete di esclusione ha suggerito che il 12-67% dei pazienti con IBS rispondono a tali provvedimenti. Il cromoglicato dimostra alcuni benefici in uno studio di pazienti con prick test cutaneo positivo ad alimenti.⁴

- FARMACI

ANTISPASMODICI E ANTICOLINERGICI

Gli anticolinergici (Diciclomina, Propantelina, Belladonna, Iosciamina) sono comunemente usati nell'IBS.¹⁹

Gli antispasmodici non anticolinergici che appaiono essere efficaci includono l'Otilonio (Cimetropio) e certi antagonisti selettivi dei canali del calcio (es. Pinaverio).¹⁹

L'olio di menta piperita appare essere efficace nell'IBS per il dolore addominale, ed è solitamente ben tollerato; il NNT è di 2,5.^{3, 19}

LASSATIVI

I lassativi osmotici spesso sono prescritti ma possono aggravare il gonfiore e il dolore. Il polietilen glicole (PEG), è molto utile nella pratica, in particolare se la costipazione rimane fastidiosa nonostante altre terapie. I lassativi stimolanti sono probabilmente più sicuri di quanto apprezzato, ma spesso inducono crampi addominali o dolore e generalmente non sembrano soddisfacenti per i pazienti con IBS.⁴

Il Lubiprostone è un attivatore di un canale del cloro che stimola la secrezione intestinale di fluidi. Nell'IBS una più bassa dose di Lubiprostone è correntemente approvata per le donne con IBS-C rispetto alla dose usata per la costipazione cronica (8µg due volte al giorno); il beneficio globale rispetto al placebo nell'IBS-C, comunque, è modesto.⁴

ANTIDIARROICI

La Loperamide si è dimostrata efficace sulla base di trial controllati randomizzati nell'IBS-D, ma non migliora il dolore addominale o il gonfiore. La Loperamide è maggiormente efficace quando assunta profilatticamente, piuttosto che quando assunta a diarrea già avvenuta; le dosi di Loperamide variano da 2 a 26 mg/die, e dosi alte sembrano sicure. Il Difenossilato non è stato testato nell'IBS, ma potrebbe essere similmente efficace. La codeina fosfato, a causa dei suoi effetti collaterali (sonnolenza, nausea, sedazione) e l'alto rischio di indurre sonnolenza, dovrebbe essere vietata nell'IBS.

Aneddoticamente, gli agenti sequestranti i sali biliari, come la Colestiramina, sembrano essere d'aiuto in alcuni casi per la diarrea nell'IBS, probabilmente a causa del sottostante malassorbimento dei sali biliari.

Il Subsalicilato di bismuto, è anche utile per il controllo della diarrea nell'IBS ma deve essere usato in modo intermittente a causa di preoccupazioni per la tossicità del bismuto.⁴

FARMACI AGENTI SUI RECETTORI DELLA SEROTONINA

Alosetron è un antagonista di 5-TH₃ che è efficace nelle donne con IBS-D. Il NNT è 8, ed è stato dimostrato migliorare la qualità della vita. La dose di partenza è 0,5-1 mg/die. Negli Stati Uniti, è disponibile solo attraverso un rigido programma di prescrizione a causa di preoccupazioni per coliti ischemiche e costipazioni gravi. La dose può essere aumentata fino a 1 mg due volte die, dopo quattro settimane se i sintomi non sono controllati e non ci sono stati effetti collaterali. La colite ischemica avviene nel 0,1% dei pazienti trattati con Alosetron ed è correlata al farmaco ma è indipendente dalla dose; l'ischemia è di solito transitoria e senza conseguenze irreversibili, sebbene fino al 50% dei pazienti con colite ischemica correlata ad Alosetron richiede l'ospedalizzazione. La costipazione avviene in un terzo dei pazienti trattati con Alosetron. La prescrizione è assolutamente controindicata nei pazienti con IBS che abbiano qualsiasi storia di costipazione, tendenza alla trombosi, o coliti ischemiche.^{4,20}

ANTIDEPRESSIVI E ANSIOLITICI

Gli antidepressivi triciclici (TCA) appaiono essere efficaci nell'IBS, ma potrebbero migliorare il benessere generale più che i sintomi.³ Quando si usano i TCA nell'IBS, è raccomandato iniziare a basse dosi (es. da 10 a 25 mg di Desipramina o Nortriptilina) e aumentare la dose da 10 a 25 nella settimana, puntando inizialmente a una dose di 50 mg. Molti pazienti non necessitano di dosaggi pieni di antidepressivi, a meno che non ci sia la depressione come comorbidità. I TCA tendono a dare costipazione, e quindi potrebbero essere di maggiore

beneficio in IBS-D. Gli eventi avversi dei TCA sono un problema. Circa da $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{3}$ dei pazienti trattati sviluppa eventi avversi, con 1 su 22 che può avere reazioni potenzialmente serie; fino al 40% interrompe l'uso o cambia la terapia a causa d'intolleranza.²¹

Gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) causano un minor numero di effetti collaterali rispetto ai TCA, e una metanalisi di trial controllati randomizzati nell'IBS ha riportato un globale beneficio degli SSRI con un NTT di 3,5.³ La Paroxetina si è dimostrata migliorare la qualità di vita ma non il dolore addominale. È possibile che gli SSRI possano essere di maggiore beneficio nei pazienti con IBS-C perché essi accelerano il transito dell'intestino tenue.²²

Le Benzodiazepine hanno dimostrato avere un piccolo beneficio maggiore al placebo nell'IBS, ma l'evidenza di questa osservazione è molto debole. A causa dell'assuefazione, generalmente questa classe di farmaci dovrebbe essere evitata.³

ANTIBIOTICI, PROBIOTICI E PREBIOTICI

È stato suggerito che un'anormale composizione del microbiota intestinale potrebbe essere rilevante nella patogenesi dell'IBS, e ciò ha portato molto interesse nell'uso di antibiotici, prebiotici e probiotici per provare a modificare la flora.^{3,4}

Antibiotici non assorbibili, come la Rifaximina, appaiono efficaci specialmente sul gonfiore e sulla diarrea.²³

I risultati di questi trattamenti sono variabili. Questa variabilità potrebbe riflettere il ceppo e la dose usata, se erano stati dati organismi vivi o morti, e altri fattori sconosciuti.

Nei prossimi capitoli di questa tesi saranno approfondite le maggiori evidenze presenti in letteratura scientifica sui trattamenti con probiotici e prebiotici in IBS.

ANTIMETEORICI

Sono presenti sul mercato un'estesa gamma di prodotti volti ad alleviare il meteorismo. Tutti mostrano risultati variabili ed è da sottolineare un'importante variabilità interindividuale nella risposta ad ogni singolo prodotto farmaceutico. In questa classe di farmaci ricordiamo il carbone vegetale, il Simeticone e vari prodotti a base di α -galattosidasi.

- TRATTAMENTO PSICOLOGICO

La psicoterapia, l'ipnoterapia, e la terapia cognitivo comportamentale (CBT) sono stati proposti come utili trattamenti per l'IBS.²²

Per la CBT esistono dati di eccellente efficacia. Basandoci sulla letteratura disponibile, i pazienti con IBS con dolore addominale, diarrea, e distress psicologico, in particolare se i sintomi sono stati di breve durata e con esacerbazioni e diminuzioni, sembrano essere quei soggetti che con maggiore probabilità avranno una risposta con queste terapie.³

PROGNOSI

Non ci sono prove neanche per un piccolo aumento della mortalità nell'IBS, nonostante il sottoporsi a test invasivi e un eccesso di tassi di chirurgia. Nella pratica clinica, una volta che la diagnosi di IBS sia stata fatta, di solito non è richiesta nessuna revisione, nonostante un prolungato follow up.

Alcuni pazienti hanno uno spontaneo miglioramento nel tempo, ma l'IBS, di solito è un disordine recidivante. La presenza di un eccessivo distress psicologico o di ansia, così come una lunga durata dei disturbi, tende ad indicare una prognosi più scarsa.³

1.2 IL MICROBIOTA INTESTINALE

DEFINIZIONI

-Microbiota: Il microbiota è la somma di tutti i microrganismi associati a un dato individuo ospite. I microrganismi si possono trovare su tutte le superfici del corpo (tra cui il lume del tratto gastrointestinale, che in senso stretto appartiene al mondo esterno), per esempio la cute, il naso, le orecchie ed i genitali. Il microbiota non si limita ai batteri, ma include anche archeobatteri, così come eucarioti, quali protozoi e funghi. Anche se non considerati come organismi, si potrebbero anche includere i virus (sia associati all'ospite che i fagi associati ai batteri). Tuttavia, il viroma non patogeno dei mammiferi e la complessità dei fagi sono in gran parte inesplorati.

-Microbioma: Il genoma di un dato organismo è definito come la somma dei suoi geni cromosomici e comprende anche le informazioni genetiche extracromosomiche che si trovano in altri organelli o endosimbionti (es. plasmidi, cloroplasti, mitocondri). Analogamente, il microbioma è definito come l'insieme di tutti i geni presenti nei microrganismi che colonizzano un determinato ospite. Insieme, il genoma e la metagenoma associati costituiscono un organismo hologenome (Brucker e Bordenstein 2013²⁴), un termine coniato da Rosenberg et al. nel 2007 (Rosenberg et al., 2007²⁵ 2009²⁶).

-Enterotipo: Il concetto di enterotipo è stato introdotto nel 2011 per definire la variabilità interindividuale nella composizione delle specie del microbiota intestinale. Si caratterizza, non solo per l'abbondanza di alcune specie, ma anche per la quantità di geni con funzione molecolare condivisa (Arumugam et al. 2011²⁷).

-Probiotici: I probiotici sono organismi che contribuiscono a una flora microbica benefica dell'ospite. Così gli organismi probiotici possono essere visti come simbionti.

-Prebiotici: per contrastare il termine antibiotico, i prebiotici sono composti chimici che influenzano la flora microbica in un modo benefico per l'ospite.

-Psicobiota: Un concetto di recente introdotto da Dinan, Stanton e Cryan definisce gli psicobiotici - analogo ai probiotici - come organismi viventi che producono effetti positivi sulla salute mentale (Dinan et al 2013²⁸). Si può sostenere anche che lo psicobiota possa presentare vantaggi per individui sani, per esempio come esaltatori di memoria (Misra e Medhi 2013²⁹).

-Disbiosi e Eubiosi: Uno stato disbiosico è caratterizzato da alterazioni svantaggiose nella composizione microbica. L'eubiosi, dall'altro, descrive piuttosto uno status microbico benefico che supporta la funzione normale dell'ospite.³⁰

Il microbiota intestinale è recentemente emerso come una delle principali entità più affascinanti della moderna ricerca biomedica.

La maggior parte del microbiota intestinale è di origine batterica e varia in diversità e numero durante la vita, dalla nascita alla vecchiaia.

Lo sviluppo nelle tecniche usate nell'identificare e quantificare il microbiota intestinale ha permesso meglio di comprendere la sua complessità, non solo la complessità di popolazione, ma anche la complessità funzionale.³¹

Fin dalla loro nascita, l'evoluzione degli organismi eucarioti pluricellulari ha avuto luogo in presenza di procarioti e una pletora di diversi microrganismi che ora colonizzano quasi tutte le superfici del corpo dell'ospite animale, residenti come simbionti benefici, commensali innocui o parassiti patogeni (Dave et al 2012³²; Schloissnig et al 2013³³; Turnbaugh et al. 2007³⁴). Una comprensione dell'importanza di queste interazioni sta subendo una rinascita con un grande progetto scientifico statunitense come il Human Microbiome Project (HMP; Microbioma Umano Progetto Consorzio 2012; Turnbaugh et al. 2007³⁴), progettato per campionare, determinare e quantificare tutti i microbi associati alla vita umana. Parallelamente il progetto europeo MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) si concentra sul microbiota del tratto intestinale in generale (Qin et al. 2010³⁵) con il progetto Eldermet incentrato sugli anziani (Claesson et al. 2012³⁶).³⁰

Il tratto gastrointestinale umano ospita un microbiota costituito da oltre 10¹⁴ batteri (anaerobici per lo più), il che significa che nell'organismo umano ci sono 10 volte più cellule procariote di cellule eucariote. Le cifre sono ancora più impressionanti dal punto di vista dei geni; si stima che il "microbioma" intestinale, cioè il repertorio dei geni collettivi degli

organismi che compongono la flora intestinale, contenga un numero di geni ben oltre 150 volte maggiore di quelli del genoma umano.³⁷

Si stima che circa il 90% delle cellule presenti nel corpo umano siano non umane, ma di origine per lo più procariote, derivate da almeno 40.000 ceppi batterici in 1.800 generi (Forsythe e Kunze 2013³⁸; Frank e Pace 2008³⁹; Luckey 1972⁴⁰). Anche se notevolmente più piccole in termini di dimensioni, questi circa 100.000 miliardi di cellule raggiungono fino a una massa di circa 1-2 kg in un individuo adulto (Forsythe e Kunze 2013³⁸) - circa il peso di un cervello umano completamente cresciuto (ca. 1,5 kg, Parent e Carpenter 1996⁴¹)³⁰. Considerato da alcuni come un organo trascurato, il microbiota GI comprende circa 400 specie e supera il numero delle cellule di tutti gli altri organi messi insieme.⁴²

C'è una quantità sempre crescente di prove sulle interazioni ospite-microbo a quasi tutti i livelli di complessità, che vanno dalla comunicazione diretta cellula-cellula ad una più ampia a livello sistemico, e che coinvolge vari organi, compreso il sistema nervoso centrale (SNC).³⁰

I batteri commensali si rivelano necessari per una digestione sana, con ruoli come la produzione di enzimi e metaboliti che aiutano l'ospite a assorbire i nutrienti essenziali e le vitamine, altrimenti non disponibili. La presenza di batteri è anche importante per il normale sviluppo e la funzione del sistema immunitario (SI) (mucosale e sistemico). Il SI intestinale deve essere sia tollerante agli antigeni alimentari e ai batteri commensali, ma anche in grado di montare una risposta contro i patogeni. I batteri commensali contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi intestinale con la secrezione di batteriocine, proteine che sono in grado di inibire le tossine batteriche, e l'abbassamento del pH con gli acidi grassi a catena corta (SCFA) che esercitano un'importante difesa contro la colonizzazione da parte di microrganismi non commensali.⁴³ Gli ospiti beneficiano anche di diverse altre proprietà del microbiota intestinale: la sintesi della vitamina K, effetti trofici sulle cellule epiteliali intestinali, recupero di energia dal cibo non assorbito attraverso la produzione di SCFA, inibizione della crescita di patogeni, mantenimento dell'integrità della barriera intestinale mucosale, omeostasi immunitaria e la partecipazione al metabolismo xenobiotico.³⁷

Infine, attraverso la competizione per le risorse e l'occupazione delle nicchie di colonizzazione, il microbiota commensale è in grado di impedire che gli organismi patogeni guadagnino appigli importanti nell'ecosistema del microbiota intestinale⁴². Ciò si ottiene con l'enorme varietà di materiale genetico che costituisce il microbioma. Si stima che l'intestino umano ospiti più di 3,3 milioni di geni non-umani (Zhu et al. 2010⁴³), rendendo i 23.285 geni umani codificanti proteine, annotati attualmente nel database del ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>), quasi trascurabili. Così, la sola presenza dei microrganismi nonché

la specifica composizione di questo microbiota, ha multiple critiche conseguenze per la fisiologia dell'ospite e i processi metabolici che vanno dallo sviluppo postnatale e l'immunomodulazione a, forse più sorprendentemente, il comportamento e la sfera cognitiva (Sommer e Bäckhed 2013⁴⁴).³⁰

Il materiale più facilmente ottenibile per il campionamento del microbiota intestinale è il materiale fecale. Per questo motivo, il materiale fecale è stato prevalentemente usato nella ricerca sulla flora intestinale, dato che le biopsie mucose sono meno facilmente ottenibili. Tratte da varie aree del piccolo e del grande intestino, le biopsie sono in grado di fornire visione dettagliata dei microbi aderenti alla mucosa che abitano le varie aree specifiche dell'intestino.

Oggi, oltre 50 phyla di batteri sono stati identificati, ma solo 29 di questi sono coltivabili. In particolare, dopo l'avvento e l'utilizzo negli ultimi dieci anni di metodi coltura-indipendenti, come il sequenziamento dell'RNA ribosomiale 16S batterico, molti studi si sono concentrati sulla determinazione della flora intestinale nei pazienti con IBS.⁴³

Il microbioma si compone principalmente di due phyla batterici, Bacteroidetes e Firmicutes, e altri phyla come Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobatteri, Archaea e Verrucomicrobia, sono presenti, ma in quantità relativamente piccole.³⁷

- *Firmicutes*

È il phylum predominante trovato nella flora intestinale di individui sani. I Firmicutes Gram positivi, sono costituiti da numerosi generi che comprendono i probiotici comunemente conosciuti, *Lactobacillus* spp. Già dal 1982 gli studi hanno rilevato i livelli bassi di *Lactobacillus* spp. nei pazienti con IBS rispetto ai controlli sani. Tuttavia, gli studi non sono coerenti nei loro risultati, presentando un aumento, diminuzione, o nessun cambiamento nella prevalenza dei lattobacilli spp. tra i pazienti con IBS. Inoltre, il confronto tra i sottogruppi di IBS e controlli sani, mostrano una diminuita o normale prevalenza dei *Lactobacillus* nei pazienti, quindi non è ancora chiaro se ci sono degli effetti dei *Lactobacillus* su uno specifico sottogruppo di IBS. A prescindere che la presenza di *Lactobacillus* si verifichi naturalmente o con la somministrazione di probiotici, la sua capacità di alleviare i sintomi di IBS, come il dolore viscerale, ne fa probiotici. Al contrario, ci potrebbe essere una correlazione positiva tra alcune specie potenzialmente patogene all'interno del phylum di Firmicutes, come *Streptococcus* spp. , e l'aumento di IL-6 nei pazienti con IBS. Questa scoperta rende particolarmente interessanti i livelli significativamente elevati di *Streptococcus* spp. osservati nei pazienti con IBS, e potrebbero potenzialmente servire da prova del legame tra la disbiosi,

che si verifica soprattutto a seguito della colonizzazione di specifici generi batterici, e una attività immunitaria alterata in alcuni pazienti con IBS.

All'interno della classe dei clostridi, sono stati riportati risultati contrastanti. È stato osservato sia un aumento che una diminuzione dei clostridi nei pazienti con IBS. Specificamente, *Ruminococcus* spp. , così come *Dorea* spp. , sono entrambi aumentati nei pazienti con IBS. È interessante notare che Rajilić-Stojanović et al.⁴⁵ suggeriscono che i clostridi non produttori di butirrato Gruppo XIVa, in relazione a *R. gnavus* e *R. torques*, noti degradatori di mucina, sono indicatori di IBS. Quest'ultimi sono costantemente presenti a livelli elevati nei campioni di feci di pazienti con IBS, e anche presenti in maggiore abbondanza nell'IBS-D e IBS postinfettiva, al contrario, però, a bassa abbondanza nell'IBS-M.

A differenza di *R. gnavus* e *R. torques*, altri membri del Gruppo XIVa, ad esempio, *Roseburia* spp. , producono SCFA benefici, come butirrato. Il butirrato è una fonte di energia preferenziale per le cellule epiteliali del colon ed è stato ipotizzato ridurre l'infiammazione. Inoltre, il butirrato aiuta a mantenere la normale funzione della barriera intestinale, attraverso la regolazione del gene MUC2170 per la mucina epiteliale del colon e le proteine delle tight-junction, e potrebbe quindi avere effetti terapeutici nei pazienti con IBS. Sebbene incoerenti, i ridotti livelli presenti nei pazienti con IBS di *Eubacterium*, *Faecalibacterium* e *Roseburia* spp. produttori di butirrato, noti per inibire la crescita di specie potenzialmente patogene tra cui i *Campylobacter* spp. , *Salmonella* spp. , *Shigella* spp. e *E. coli*, potrebbero potenzialmente essere una causa accessoria per la generazione dei sintomi dell'IBS in alcuni pazienti.

In questo momento, non c'è un chiaro consenso sul significato delle alterazioni dei Firmicutes in tutti i pazienti con IBS, anche se esistono prove che i Firmicutes, in particolare la famiglia *Lachnospiraceae*, sono aumentati abbastanza significativamente in IBS-D, da renderlo distinguibile da altri sottogruppi di IBS. Tuttavia, è stata osservata nei pazienti con IBS una tendenza debole per una riduzione dei batteri benefici dell'intestino, controbilanciata con un aumento di specie patogene. Questa disbiosi può potenzialmente avere un'influenza sulla funzione intestinale per mezzo del degrado dello strato di muco, da parte di *Ruminococcus* spp. , che può permettere l'infiltrazione di *Streptococcus* spp. o *Staphylococcus aureus*, così provocando una risposta immunitaria di basso grado in un sottogruppo di pazienti con IBS.

- *Bacteroidetes*

Gli appartenenti al secondo phylum più abbondante nell'intestino umano, sono i Gram negativi *Bacteroidetes*, che hanno una prevalenza e una diversità variabile, alta o bassa, nella flora intestinale di pazienti con IBS. Inoltre, è stato riportato nell'IBS l'aumento di

Bacteroides spp. , nonostante sia stato osservato anche un decremento netto nel phylum Bacteroidetes. Tale phylum comprende specie sia con caratteristiche benefiche che non benefiche, come mostrato nella review globale di Wexler⁴⁶. L'abbondanza delle specie dei Bacteroidetes benefici o non benefici può quindi essere importante per l'IBS, in base al presupposto che più specie non benefiche potrebbero correlare con un aumento dei sintomi o della gravità, come il dolore viscerale.

- *Actinobacteria*

Un altro dei principali phyla del microbiota intestinale umano, è il Gram positivo Actinobacteria, che include generi che contengono probiotici come Bifidobacterium e Collinsella. È interessante notare che una diminuzione degli Actinobacteria è stata dimostrata nell'intestino di pazienti con IBS, con uno studio che ha evidenziato una diminuzione specifica tra i pazienti con IBS-D. In particolare, le informazioni sul livello del riconosciuto probiotico Bifidobacterium spp. sono confuse. Alcuni studi propongono un aumento dei Bifidobatteri nell'IBS; tuttavia, l'incoerenza complessiva suggerisce che ci può potenzialmente essere un sottogruppo di pazienti con IBS, dove i tratti positivi di queste specie probiotiche potrebbero essere diminuiti in modo da spiegare la generazione del sintomo, ma questo richiede ulteriori ricerche.

- *Proteobacteria*

Un aumento di Proteobacteria, della famiglia specifica delle Enterobacteriaceae che comprende molte specie patogene Gram negative, compresi altri batteri coliformi come E. coli, è stato associato con IBS, in particolare IBS-D. Tuttavia, Malinen et al.⁴⁷ hanno registrato minori quantità di batteri solfato-riduttori, Desulfovibrio spp. in pazienti IBS-D. Quando si considera che specie di questo genere producono solforato tossico, ci si aspetta una maggiore abbondanza di Desulfovibrio spp. , piuttosto che livelli ridotti, per dare una spiegazione plausibile alla generazione dei sintomi in alcuni pazienti con IBS.

Pertanto, l'aumento di specie patogene insieme alla riduzione delle già citate specie probiotiche dei generi come Bifidobacterium e Lactobacillus, e i loro metaboliti, noti per tenere sotto controllo i patogeni, è un'ulteriore prova a sostegno che la disbiosi avviene in un numero di pazienti con IBS.

- *Verrucomicrobia*

Aumentati livelli del non così ben documentato *Akkermansia* spp. , possono coincidere con IBS. Data la specifica nota attività nella degradazione del muco, *Akkermansia* spp. può compromettere l'integrità dello strato di muco, e pertanto danneggiare la barriera intestinale. Da questo presupposto, *Akkermansia* spp. può avviare un'inflammazione di basso grado in alcuni pazienti IBS attraverso il degrado dello strato di muco, in modo simile a *R. gnavus* e *R. torques*, consentendo l'accesso di specie patogene alla mucosa epiteliale.

- *Euryarchaeota*

Gli archaea Methanogens convertono l'idrogeno prodotto nell'intestino in metano. Precedentemente si credeva che questo gas fosse inerte, ma ora si è dimostrato che è in grado di ridurre il transito intestinale. Un aumento dei Methanogens nell'IBS, soprattutto in coloro che soffrono di IBS-C, potrebbe spiegare il transito intestinale rallentato di questi pazienti e perché il metano viene trovato di volumi aumentati nei pazienti con IBS-C. Inoltre, *Methanobrevibacter smithii* è stato suggerito come il Methanogen predominante in IBS-C. Questi risultati supportano la tesi che, almeno in alcuni pazienti IBS-C si può verificare una disbiosi a favore dei Methanogens, che possono causare la stipsi. Tuttavia, si potrebbe anche ipotizzare che una riduzione dei Methanogens potrebbe potenzialmente spiegare i sintomi quale il gonfiore in IBS, dato che i livelli di idrogeno non verrebbero ridotti nel modo più efficiente. Gli studi che comprendono i Methanogens nella loro ricerca, rilevano abbondanti livelli di Methanogens sia nei controlli sani che nei pazienti IBS. Poiché l'abbondanza dei Methanogens si trova anche nei controlli sani, sono necessarie ulteriori ricerche per esplorare la loro importanza nella genesi dei sintomi dell'IBS.⁴²

Bennet et al.⁴² hanno dimostrato che la maggioranza dei pazienti con IBS ha una composizione del microbiota alterata con un'aumentata abbondanza dei Firmicutes e la conseguente diminuzione dei Bacteroidetes, mentre i restanti pazienti hanno avuto una normale composizione della flora intestinale.⁴⁴ I soggetti con IBS-D sembrano presentare meno specie del genere *Lactobacillus* e quelli affetti da IBS-C più specie del genere *Veillonella*.³⁷

Diversi studi hanno dimostrato che i pazienti con IBS possono avere una ridotta diversità nella composizione del microbiota intestinale. Nell'ecosistema del microbiota intestinale, proprio come in qualsiasi altro ecosistema, la diversità e la ricchezza delle specie è richiesta per permettere al sistema di prosperare, dove tutte le nicchie sono occupate e tenute sotto

controllo dalle vicine specie benefiche o concorrenti. Tuttavia, ulteriori studi con coorti più grandi e potenzialmente per più lunghi periodi di tempo sono necessari per indagare ulteriormente la composizione del microbiota intestinale, l'instabilità e la diversità dell'IBS.⁴²

La composizione del microbioma intestinale durante tutta la durata della vita di un ospite non è statica, ma la quantificazione di questi cambiamenti si rivela difficile, a causa di variabili confondenti quali la genetica, l'età, il sesso, la dieta, lo stile di vita e eventuali stati di malattia. Anche se il profilo microbico di ogni persona è diverso, la relativa abbondanza e la distribuzione delle specie batteriche è simile tra gli individui sani, favorendo il mantenimento di uno di salute generale.⁴⁸

Un passaggio da Bifidobacterium ai Clostridi e Bacteroidetes si verifica quando l'ospite sviluppa dall'età neonatale a quella adulta (Yatsunenکو, et al., 2012⁴⁹).

Tuttavia, determinare in quale misura questi cambiamenti riflettono il normale sviluppo e maturazione, rispetto ai cambiamenti nella dieta / ambiente o carenze patologiche, richiedono ulteriori studi.⁵⁰ Il tratto gastrointestinale fetale (GIT) è sterile prima della nascita e la colonizzazione microbica si verifica al momento del parto (Morelli, 2008⁵¹). Nei neonati con parto vaginale, il GIT è in primo luogo colonizzato da Bifidobatteri e Lattobacilli, Bacteroides, Proteobacteria e Actinobacteria. Al contrario, i neonati partoriti mediante taglio cesareo hanno più E. coli, nonché Clostridi, soprattutto C. difficile, e meno Bacteroides e Bifidobatteri (Penders, et al., 2006⁵²). Allo stesso modo, i neonati allattati al seno hanno mostrato una maggiore abbondanza di Bifidobatteri, mentre nei neonati alimentati con latte artificiale, Bifidobatteri, Bacteroides, Clostridi e gli Stafilococchi sono stati trovati in numero uguale (Harmsen, et al., 2000⁵³). Al contrario, altri gruppi hanno dimostrato una grande varietà di Bifidobacterium, Actinomyces, e Haemophilus nei bambini allattati al seno, mentre i bambini alimentati con latte artificiale hanno avuto una grande varietà di Firmicutes e Bacteroidetes nel loro intestino (Yatsunenکو, et al., 2012⁴⁹).

Però, nonostante queste discrepanze, la maggior parte degli studi sottolineano che sia il tipo di dieta che la modalità del parto può preferenzialmente promuovere alcune comunità batteriche rispetto ad altre. Mentre il meccanismo ancora non è chiaro, è noto che la prima flora intestinale è costituita principalmente da batteri che possono metabolizzare il lattosio assorbito dal latte materno o alimenti per lattanti a base di latte vaccino. Tuttavia, con l'introduzione di cibi solidi, l'intestino diventa prevalente in specie batteriche associate all'utilizzo di carboidrati, proteine e di grassi, così come alla sintesi di vitamine (Koenig, et al., 2011⁵⁴).⁵⁰ I numeri e la diversità degli anaerobi obbligati aumenta come risultato della

dieta e dell'ambiente, e dopo 1 anno di età, è evidente un complesso microbioma simile a quello dell'adulto.²⁸

L'ospite favorisce anche selettivamente particolari specie batteriche in diverse regioni dell'intestino. Per esempio, batteri che sintetizzano butirrato, come i Firmicutes, sono presenti in proporzioni maggiori nel colon e sono meno rappresentate nell'intestino tenue superiore. Questo è vantaggioso, in quanto gli SCFA, come butirrato, sono la principale fonte di energia per le cellule epiteliali del colon (Hooper, Midtvedt, e Gordon, 2002⁵⁵; Roediger, 1980⁵⁶; Wong, de Souza, Kendall, Emam, e Jenkins, 2006⁵⁷).⁵⁰

Secondo Cryan et al.⁵⁸, la dieta è uno dei fattori chiave che influenzano sostanzialmente la composizione del microbiota. Wu et al.⁵⁹ hanno recentemente dimostrato in 98 individui che alcuni enterotipi sono fortemente associati con le diete a lungo termine, particolarmente con un elevato consumo di proteine animali e il consumo di grassi (Bacteroides) o carboidrati (Prevotella). Nello stesso studio, che valutava le variazioni del microbiota di 10 soggetti in base all'alimentazione (che poteva essere alternativamente una dieta ad alto contenuto di grassi / basso contenuto di fibre o una dieta a basso contenuto di grassi / ricca di fibre) ha mostrato che già entro 24 ore si osserva un cambiamento nella composizione del microbiota e che tali cambiamenti rimanevano stabili durante lo studio di 10 giorni.³⁷

Il rispetto di una tipica dieta occidentale (alto contenuto di grassi e carboidrati a basso contenuto di fibre) per un mese può elevare l'attività endotossinica plasmatica del 71%. Al contrario, il passaggio a una dieta a basso contenuto di grassi saturi, ricca di fibre (la dieta cosiddetta "oculata" o più tradizionale) per un mese può diminuire l'attività endotossinica sanguigna basale del 38% negli adulti sani. La dieta a base animale aumenta l'abbondanza dei microrganismi bile-tolleranti (Alistipes, Bilophila e Bacteroides) e diminuisce i livelli di Firmicutes che metabolizzano polisaccaridi vegetali alimentari (Roseburia, Eubacterium rectale e Ruminococcus bromii).

Le principali fonti di antiossidanti alimentari come cacao, caffè, tè verde, mirtilli, e la curcumina sono stati collegati in studi epidemiologici con un aumento della crescita di Lattobacilli e Bifidobatteri.³⁷

Le specie batteriche "buone", Lattobacilli e Bifidobatteri, mancano delle catene esterne proinfiammatorie del lipopolisaccaride (LPS), che sono ancorate alle pareti cellulari dei batteri patogeni come E. coli e Salmonella. L'intestino dell'ospite, quindi, è tollerante a una vasta colonizzazione da parte di batteri benefici, che competono con l'insediamento di microbi dannosi e riducono il rischio dell'infezione. È importante sottolineare che, Bifidobatteri, Lattobacilli, e altre specie innocue vengono rilevate e monitorate dal SI

intestinale fin dalle prime fasi di vita, ma dato che non portano gli elementi infiammatori necessari non viene iniziata una risposta immunogenica completa. Piuttosto, l'immunità dell'ospite sviluppa un robusto repertorio antinfiammatorio che riduce al minimo i danni per l'intestino, mentre qualsiasi batterio invasivo nocivo viene fagocitato dalle cellule immunitarie.

Quindi, gli individui promuovono i "buoni" batteri che mantengono un sano equilibrio tra le risposte anti- e pro-infiammatorie che, attraverso la circolazione, li conferiscono vantaggi fisiologici a tutti gli organi, compreso il cervello.

I batteri intestinali prontamente metabolizzano le fibre indigeribili, come ad esempio gli oligosaccaridi, e produrranno SCFA, compresi acetato, butirrato, lattato, propionato e che poi entreranno in circolazione dal crasso. La relativa percentuale di SCFA prodotti può variare in base alla dieta e a batteri specifici. Per esempio, l'assunzione di prodotti del malto da parte dei roditori determina un significativo aumento nel siero di butirrato, ma solo in presenza di *Lactobacillus rhamnosus*.

Sebbene la maggior parte di questi metaboliti di fermentazione entrano nel fegato e nel muscolo, una piccola percentuale permea nel cervello, dove sono state documentate le loro azioni di psicotropi.

Pertanto, un'ulteriore considerazione del signaling da parte degli SCFA all'interno del brain-gut-microbiota axis (*vedi avanti capitolo relativo*) potrebbe portare allo sviluppo di formule dietetiche e batteriche ottimali per contribuire al mantenimento della salute mentale. Una strategia potrebbe essere quella di utilizzare prebiotici (miscele purificate di oligosaccaridi), da soli o con probiotici, perché questi composti mediano sia la formazione di SCFA che la proliferazione di altri batteri commensali, potenzialmente psicotropi.⁶⁰

Il prodotto derivato dalla combinazione di probiotici e prebiotici viene comunemente denominato "simbiotico".

Come ho esposto sopra, diversi studi hanno dimostrato che il microbiota del colon può esibire importanti differenze tra i pazienti con IBS e controlli sani, ma meno si sa circa il microbiota dell'intestino tenue. Dlugosz et al.⁶³ hanno usato il sequenziamento massivo parallelo per esplorare la composizione del microbiota associato alla mucosa del piccolo intestino in pazienti con IBS e controlli sani.

L'intestino dell'adulto ospita più di 1000 specie di microbi, che normalmente rimane confinata nell'intestino distale (colon), dove la concentrazione è di circa 10^{11} di organismi per grammo di contenuto. Per colpa della peristalsi e gli effetti antimicrobici dell'acidità gastrica,

lo stomaco e l'intestino prossimale contengono un piccolo numero di batteri negli individui sani. La conta batterica dei coliformi superano raramente 10^3 cfu/ml nel succo digiunale.

Il microbiota del piccolo intestino non era finora stato descritto, in parte perché i campioni dal piccolo intestino sono relativamente difficili da ottenere.

Il medesimo gruppo di ricerca non ha trovato alcuna differenza significativa nel microbiota del piccolo intestino tra i pazienti con IBS e controlli sani.

Non è chiaro se l'IBS è un disturbo del piccolo intestino o del grande intestino, o di entrambi. Tali risultati non supportano un ruolo per il microbiota del piccolo intestino superiore nella patogenesi di IBS. Tuttavia, non si può escludere che i cambiamenti nel microbiota dell'intestino tenue distale potrebbero influenzare lo sviluppo dei sintomi di IBS. ⁶¹

Probiotici

La definizione FAO / OMS di un probiotico: "microrganismi vivi che, quando somministrati in quantità adeguate conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite". ⁶²

Il termine probiotico deriva dal greco e significa "per la vita" e la prima descrizione formale di un probiotico è stata fornita da Metchnikoff nel 1908, basata sulla sua osservazione che individui che vivevano in una certa regione della Bulgaria avevano una durata più lunga della vita rispetto a quelli di altre parti del paese, un fatto che era collegato con il consumo regolare di un prodotto con latte fermentato. Lilly e Stillwell⁶³, per primi, hanno introdotto il termine "probiotici" nel 1965. ²⁸

L'atto di modificare direttamente la composizione della flora intestinale attraverso l'uso di probiotici, quali *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., ha dimostrato avere un effetto positivo sui sintomi di IBS, anche se questo non sempre avviene. La maggior parte degli studi non riporta alcun evento avverso con l'uso di probiotici; tuttavia, queste affermazioni spesso sono incoerenti e non ben documentate, con alcuni studi che addirittura registrano un peggioramento del discomfort del paziente. Anche se i probiotici possono essere utili in un sottogruppo di pazienti con IBS.⁴² Una prova attuale dell'efficacia dei probiotici nelle varie malattie (principalmente disturbi intestinali) è infatti incoerente, ed è resa più complessa dal fatto che i regimi di trattamento nei diversi studi sono estremamente eterogenei, con diverse specie/ceppi, dosaggi, durate di trattamento e metodi impiegati di somministrazione.

I probiotici sono in grado di stabilizzare la barriera mucosa aumentando l'espressione di mucina, riducono la sovracrescita batterica stimolando immunità mucosale (IgA secretorie), e sintetizzano sostanze antiossidanti. I principali probiotici utilizzati nelle attuali preparazioni commerciali sono batteri lattici, compresi i Lattobacilli (casei, reuteri, fermentum, plantarum, paracasei, salivarius, rhamnosus) e i Bifidobatteri (bifidum, infantis, longum).

La somministrazione orale di probiotici si è anche dimostrata utile nella riduzione della small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) associata ai disturbi ansioso-depressivi. La somministrazione giornaliera per due settimane di *L. helveticus* e *B. longum* è stata riconosciuta alleviare sintomi d'ansia e depressione in volontari sani. I probiotici possono quindi essere un trattamento di interesse in tutti i disturbi psichiatrici in cui è stato riportato un aumento della permeabilità intestinale, vale a dire depressione, ansia, autismo, schizofrenia, disturbo bipolare e dipendenza da alcol.

Oggi il mercato ha molti prodotti che portano il marchio 'probiotici', ma solo una parte di essi è stata sottoposta ad indagine rigorosa e troppo spesso non soddisfano i criteri minimi, ad esempio contenuti definiti, adeguato conteggio di batteri vitali al termine della durata di conservazione e la prova adatta a beneficio per la salute. Sottoprodotti metabolici, microrganismi morti, o altri prodotti non vitali a base microbica, hanno un potenziale; tuttavia, questi non rientrano nella definizione di "probiotico".⁶²

Prebiotici

I prebiotici sono sostanze alimentari non digeribili da parte dell'ospite che apportano effetti benefici all'ospite attraverso una selettiva stimolazione della crescita e/o attività di una o un limitato numero di specie batteriche già presenti nel colon.

In altre parole i prebiotici sono principalmente carboidrati indigeribili che promuovono la crescita e l'attività di batteri benefici. I prebiotici comunemente utilizzati sono l'inulina così come fructo-, galatto- e xylo- oligosaccaridi. Essi sono fermentati nel colon dal microbiota residente in SCFA, che hanno dimostrato avere proprietà antinfiammatorie nell'IBS.³⁷ Studi sull'uso dei prebiotici e la conseguente mitigazione dei sintomi dell'IBS tendono a mostrare un effetto benefico simile a quello dell'uso di ceppi probiotici come il *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. . È stato dimostrato che il beneficio di tale trattamento è fortemente dipendente dalla dose. Infatti, alti livelli di prebiotici possono spesso intensificare problemi come gonfiore e flatulenza. Questi risultati confermano la raccomandazione di una ridotta

assunzione dei FODMAPs in persone che soffrono di IBS.⁴² La combinazione simbiotica di una specifica inulina arricchita di oligofruttosio e *L. rhamnosus* GG e *B. lactis* per 12 settimane ha prodotto un aumento del 16% nel numero dei Lactobacilli e del 18% dei Bifidobatteri, e una diminuzione del 31% nel numero di *Clostridium perfringens*. I prebiotici, ad oggi, non sono stati studiati come una potenziale terapia aggiuntiva nei maggiori disturbi psichiatrici, ma potrebbero essere utili in combinazione ai probiotici.³⁷

Postbiotici

I postbiotici sono i prodotti metabolicamente attivi dei probiotici.

Un emergente approccio nel potenziamento del microbiota è di identificare primariamente le molecole che sono mancanti in una particolare malattia, e poi supplementare la dieta con le molecole mancanti o i precursori che possono essere convertiti in molecole bioattive dalla popolazione microbica. Questo approccio è particolarmente interessante visto che questi postbiotici sono un'importante classe di molecole funzionali usate dal microbiota per modulare la salute umana. Derivati amminoacidici trasformati dal microbiota intestinale fanno parte di una classe di composti che sono potenzialmente postbiotici. Per esempio, l'indolo, che può essere derivato dal triptofano, diminuisce i marker dell'infiammazione, la trascrizione di fattori proinfiammatori, e la colonizzazione delle cellule epiteliali intestinali da parte di patogeni, mentre aumenta la resistenza delle tight-junction e la produzione di mucina. I cambiamenti nella quantità di butirato, acetato e propionato sono stati correlati anche con il deterioramento della salute nelle persone più anziane, un'ulteriore riprova dell'importanza della produzione batterica degli SCFA nella fisiologia del tratto gastrointestinale.³⁷

Antibiotici

Molti antibiotici possono avere profondi, e non voluti, effetti sul microbiota indigeno. Gli antibiotici, soprattutto quelli a largo spettro e nelle terapie prolungate apportano notevoli cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale, portando in ultima analisi ad uno stato disbiosico che permette l'insediamento di batteri "cattivi" patogeni al posto dei batteri "buoni" commensali residenti. Nella pratica clinica ritroviamo esaustive prove a quanto detto,

per esempio la diarrea post-antibiotica e la colite da *Clostridium difficile* dopo trattamento antibiotico a largo spettro.

Gli antibiotici sono parimenti armi utili per ristabilire una normobiosi. Infatti l'utilizzo di una terapia sequenziale, prima con antibiotici orali non assorbibili, come la rifamixina, e poi con probiotici, è utile nell'intento di sostituire nel lume intestinale i batteri patogeni con altri che possono apportare benefici all'ospite. Tale approccio terapeutico oggi è utilizzato spesso in patologie gastrointestinali in cui il ruolo della disbiosi è rilevante, per esempio nelle riacutizzazioni di diverticolite e nella stessa IBS.

La rifamixina ha ricevuto l'approvazione da parte della FDA nel Giugno 2015 per il trattamento dell'IBS-D.³¹

I risultati mostrano che la riduzione dei sintomi di IBS attraverso l'uso di antibiotici può ulteriormente sostenere l'influenza del microbiota intestinale sul benessere e su come il ripristino della normobiosi microbica intestinale può aiutare alcuni pazienti con IBS.

Trapianto Fecale

Il trapianto fecale può essere visto come l'intervento più estremo sulla flora intestinale. Lo scopo del trapianto fecale è quello di sostituire o reintegrare il microbiota intestinale di un individuo malato con il microbiota di un donatore sano.

Recenti meta-analisi hanno riportato un tasso di successo di circa il 90% quando il trapianto fecale è utilizzato per trattare un'infezione refrattaria di *Clostridium difficile*.⁶⁴

Tuttavia, il trapianto fecale non è ampiamente praticato attualmente a causa del rischio intrinseco di introdurre nuovi microbi patogeni al destinatario. Sono in corso sforzi per chiarire i meccanismi d'azione, gli effetti sulla risposta immunitaria dell'ospite e per perfezionare l'inoculo microbico. Questi sforzi, in futuro, potrebbero portare a una più ampia adozione della procedura.³⁷

Psicobiotici

Nel 2012, Thomas Insel⁶⁵, ha concluso che *"i nostri corpi sono un ecosistema complesso in cui le cellule umane rappresentano un misero 10% della popolazione. Ma al di là dei semplici numeri, ora sappiamo circa la profonda diversità di questo ecosistema e le*

*sorprendenti differenze individuali. Comprendere come queste differenze nel mondo dei nostri microbi influenzano lo sviluppo del cervello e il nostro comportamento sarà una delle più grandi sfide delle neuroscienze cliniche nel prossimo decennio". C'è certamente un volume crescente di prove a sostegno della tesi che i processi cognitivi ed emotivi possono essere modificati dal microbiota agendo attraverso il brain-gut axis (vedi capitolo "Brain-gut-microbiota axis"). Che i patogeni intestinali possano influenzare il nostro processo mentale è riconosciuto da tutti, ma solo ora sta emergendo il fatto che alcuni batteri possano avere sulla salute mentale benefici positivi.*²⁸

Le alterazioni nell'espressione centrale del GABA (acido gamma-aminobutirrico) è implicata nella patogenesi dell'ansia e della depressione (Bravo et al., 2011⁶⁶). Questi ricercatori riportano che la somministrazione di *Lactobacillus rhamnosus* induce cambiamenti regione specifici nell'espressione del GABA (B1b) mRNA nel cervello, con incrementi nella corteccia cingolata e prelimbica, e riduzioni nell'ippocampo, amigdala e locus coeruleus. È anche ridotta l'espressione del GABA (Aa2) mRNA nella corteccia prefrontale e nell'amigdala, ma questa misura è incrementata nell'ippocampo. L'assunzione di *Lactobacillus rhamnosus* riduce anche i livelli di corticosterone indotti dallo stress e i comportamenti correlati all'ansia e alla depressione. Questi risultati vengono aboliti successivamente alla vagotomia. Quindi, il vago deve trasportare il segnale dall'intestino al cervello. L'uso degli psicobiotici (come *Bifidobacterium infantis*) nell'alleviare la depressione e l'ansia associati a IBS è stato revisionato da Dinan and Cryan (2013⁶⁷).⁶⁸

Dinan et al. hanno proposto il termine "psychobiotic" per quelle singole specie batteriche con proprietà psicotrope.⁶⁰

Il dott. Dinan notò che ci sono approssimativamente da 1 a 2 kg di batteri in un intestino adulto e che sono capaci di produrre centinaia di sostanze chimiche. E sebbene l'invecchiamento in buona salute è associato con una diversa gamma di questi organismi, individui che invecchiano in cattiva salute hanno una minor diversità di batteri.

“I nostri studi preclinici suggeriscono che la depressione è anche associata con le alterazioni del microbiota. Gli psicobiotici sono batteri buoni che hanno il potere di aumentare la diversità microbiologica e curano i sintomi della depressione”, spiega il dott. Dinan.⁶⁹

“Molte delle numerose ipotesi di miglioramento della salute devono ancora essere supportate scientificamente, ma questi microrganismi esercitano effetti positivi nel tratto intestinale, soprattutto quando vengono usati per contrastare gli effetti degli antibiotici, i quali uccidono sia i batteri ‘cattivi’ che quelli ‘buoni’ ”.

“Come una classe di probiotici, questi batteri sono capaci di produrre e rilasciare sostanze così come GABA e la serotonina, che è attiva sul brain-gut axis”.

“Quello che è chiaro a questo punto è che, su un grande numero di probiotici putativi, solo una piccola percentuale ha avuto un impatto sul comportamento e può qualificarsi come uno psicobiota”, continua il dott. Dinan.⁶⁹

Definiamo lo psicobiota come un organismo vivo che, quando ingerito in quantità adeguate, produce effetti benefici sulla salute dei pazienti affetti da malattie psichiatriche. Logan e Katzman⁷⁰ hanno proposto per primi l'uso di probiotici come terapia aggiuntiva nel trattamento della depressione.²⁸

Recentemente, Lyte⁷¹ ha affermato che i probiotici funzionano meccanicamente come veicoli per composti neuroattivi e hanno così il potenziale di agire come agenti psicotropi. È chiaro che una vasta gamma di batteri producono e secernono sostanze coinvolte nella neurotrasmissione. Alcuni ceppi di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* secernono GABA. Questo è il principale neurotrasmettitore inibitorio nell'encefalo che regola molti processi fisiologici e psicologici, e le disfunzioni di questa neurotrasmissione sono implicate nell'ansia e depressione. È stato suggerito che il GABA microbiologicamente prodotto nell'intestino può avere un effetto sul brain-gut axis e Roshchina⁷² indica che una sottospecie di *Lactobacillus* è in grado di produrre acetilcolina, un altro neurotrasmettitore essenziale nel cervello umano. La serotonina (5-HT) svolge un ruolo importante nella regolazione di numerose funzioni corporee, tra cui l'umore. È stato dimostrato che i livelli di 5-HT nel plasma di topi convenzionali sono significativamente superiori rispetto a quelli dei topi germ-free (GF), che non hanno il microbiota intestinale, a dimostrazione della capacità del microbiota nell'influenzare i livelli di 5-HT. Inoltre, l'ingestione orale di *Bifidobacterium infantis* porta a un aumento dei livelli del precursore della 5-HT, il triptofano, nel plasma di ratti, suggerendo che il ceppo può avere un potenziale come antidepressivo. *Escherichia*, *Bacillus*, e *Saccharomyces* producono noradrenalina (NA). *Candida*, *Streptococcus*, *Escherichia*, ed *Enterococcus* producono 5-HT, mentre *Bacillus* e *Serratia* hanno il potenziale per produrre dopamina. Gli endocannabinoidi sono molecole lipidiche che agiscono come neurotrasmettitori/neuromodulatori nel cervello, che contiene specifici recettori. Questi siti recettoriali delle cellule si combinano anche con il Δ^9 -tetraidrocannabinolo, il principio attivo della *Cannabis sativa*, più comunemente conosciuto come la cannabis, una pianta molto conosciuta per le sue proprietà psicotrope. Inoltre, un ceppo *Lactobacillus acidophilus* modula l'espressione dei recettori cannabinoidi nel midollo spinale.

Così, una vasta gamma di neurotrasmettitori essenziali sono prodotti da microbi, molti dei quali hanno ruoli chiave all'interno del microbiota intestinale umano. Quei probiotici che hanno dimostrato di produrre composti neuroattivi in vitro e in studi su animali, dimostrano effetti comportamentali e sono degni di essere testati come potenziali psicobiotici, soprattutto nei disturbi legati allo stress, come la depressione e l'ansia.

Negli ultimi 25 anni sono emersi antidepressivi ben tollerati, che hanno in gran parte come bersaglio 5-HT e/o NA. Tuttavia, non tutti i pazienti rispondono agli antidepressivi e alcuni dei pazienti sono contrari a interventi farmacologici. Da una prospettiva biologica, è noto che i pazienti depressi frequentemente hanno alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), come ad esempio i livelli di cortisolo elevati nel plasma, elevati livelli di CRH nel fluido cerebrospinale, e un fallimento nel test di soppressione del cortisolo col desametasone. Il trattamento antidepressivo è accompagnato da un ripristino di queste anomalie. L'iper-risposta dell'HPA nei topi GF è ripristinata con la somministrazione di *B. infantis*, un probiotico comunemente usato. Inoltre, negli animali GF, i livelli di NA e 5-HT nella corteccia e nell'ippocampo sono significativamente ridotti. Così, dati preclinici mostrano chiaramente che batteri commensali hanno la capacità di alterare non solo l'asse HPA, ma anche neurotrasmettitori chiave pensati essere rilevanti nell'eziologia della depressione. Desbonnet et al.⁷³ hanno valutato i potenziali benefici del probiotico *B. infantis* nel modello di depressione con separazione materna nel topo, un modello che si è dimostrato essere di valore nello studio degli effetti antidepressivi, riportando risultati positivi.²⁸

È importante sottolineare che la piena attivazione dell'immunità potrebbe non essere richiesta per la disfunzione dell'umore, e la somministrazione di singole citochine pro-infiammatorie, come l'interferone- α (INF- α), porta anche a sintomi depressivi.

Le citochine pro-infiammatorie possono accedere al cervello attraverso diversi mezzi, tra cui l'assorbimento attivo, e in ultima analisi, aumentare la produzione locale di mediatori infiammatori quali prostaglandine e ossido nitrico, che amplificano la produzione locale di citochine e mediatori dell'infiammazione.

Queste molecole proinfiammatorie sono in grado di ridurre il metabolismo delle monoamine centrali e il signaling del brain derived neurotrophic factor (BDNF) e, quindi, incidere direttamente sui percorsi chiave fondamentali sia nella capacità di recupero alla depressione che nell'azione antidepressiva.

Infatti, Dinan et al.²⁸ suggeriscono che gli antidepressivi possono, in parte, spiegare i loro effetti terapeutici attraverso un meccanismo anti-infiammatorio, come la produzione di IL-10, che è facilitata anche dalla somministrazione di probiotici.

Cambiamenti clinici positivi e affidabili dell'umore e sui sintomi d'ansia dopo la manipolazione della flora intestinale possono essere il modo più pragmatico per coinvolgere il microbioma nella fisiopatologia dei disturbi dell'umore.

Infatti, la stratificazione dei gruppi di pazienti per specifici fenotipi biologici potrebbe aiutare a identificare quali individui trarrebbero vantaggio soprattutto dagli psicobiotici. Per esempio, i pazienti depressi con un aumento dei livelli dei markers proinfiammatori potrebbero essere quelli che più probabilmente risponderebbero a questi supplementi; tra parentesi, alcuni pazienti depressi resistenti ai trattamenti antidepressivi convenzionali hanno elevate concentrazioni circolanti di TNF α e IL-6. Gli psicobiotici potrebbero anche rivolgersi ai pazienti depressi guariti che hanno sintomi residui "subclinici", ma sono riluttanti a prendere farmaci convenzionali. Nel complesso, il rationale per l'utilizzo degli psicobiotici nel trattamento dei disturbi dell'umore è solido, e il loro sviluppo e l'applicazione potrebbe anche essere più facile dei trattamenti farmacologici, dato che è improbabile che richiedano le stesse procedure normative, come quelle utilizzate per i farmaci psicotropi.⁶⁰

È altrettanto evidente che non tutti i probiotici sono gli stessi e la maggior parte non hanno un potenziale psicobiotico.

Per rilevare gli psicobiotici, dovremmo preferire i ceppi probiotici che hanno dimostrato effetti comportamentali preclinici, veicolano composti neuroattivi, hanno una capacità di diminuire le citochine proinfiammatorie e riducono l'attività di HPA. Non c'è dubbio che molti pazienti valuterebbero l'emergenza di antidepressivi non convenzionali in forma di psicobiotici.

Deve essere intrapresa un'analisi approfondita del microbiota nella depressione e altri disturbi legati allo stress.²⁸

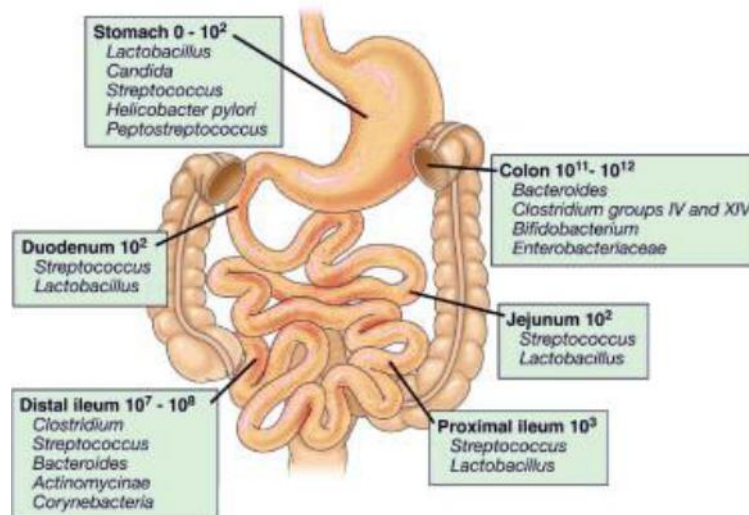


Figura 1. *Il Microbiota Intestinale: La Concentrazione Batterica.* Le porzioni prossimali del tubo digerente presentano livelli relativamente bassi di colonizzazione. La quantità e la complessità del microbiota aumentano progressivamente nella parte distale del piccolo intestino e nel colon (stomaco: $\sim 10^2$ cfu/g; piccolo intestino 10^4 – 10^8 cfu/g; colon: 10^{11} - 10^{12} cfu/g). Nel tenue la colonizzazione batterica è soppressa da: la velocità del transito intestinale, la produzione e secrezione di peptidi antimicrobici, enzimi, HCl e sali biliari. Il colon, dove si contano fino a 10^{12} cellule per grammo di contenuto intestinale, è invece sede della maggiore concentrazione microbica.

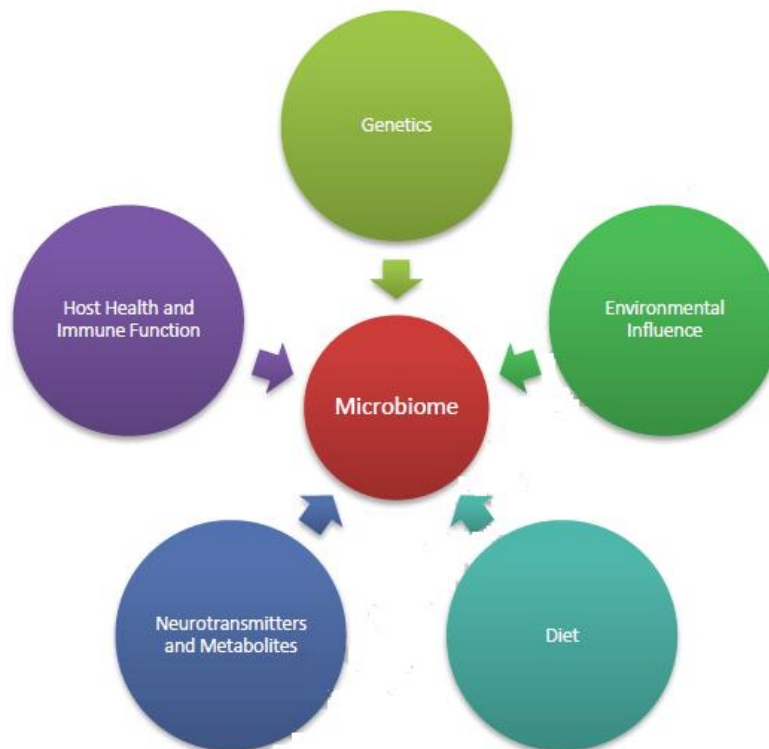


Figura 2. *Fattori che influenzano la composizione del microbiota intestinale:* L'interazione ospite-microbiota è una complessa e dinamica simbiosi. Mentre la dieta e l'ambiente sono fattori ben noti che colpiscono le popolazioni di diversi phyla nell'intestino, alcuni rapporti suggeriscono che la composizione genetica dell'ospite potrebbe predisporre la continua crescita di alcuni microrganismi. La popolazione del microbioma può anche essere modulata dalla presenza di neurotrasmettitori e metaboliti secreti dall'ospite.

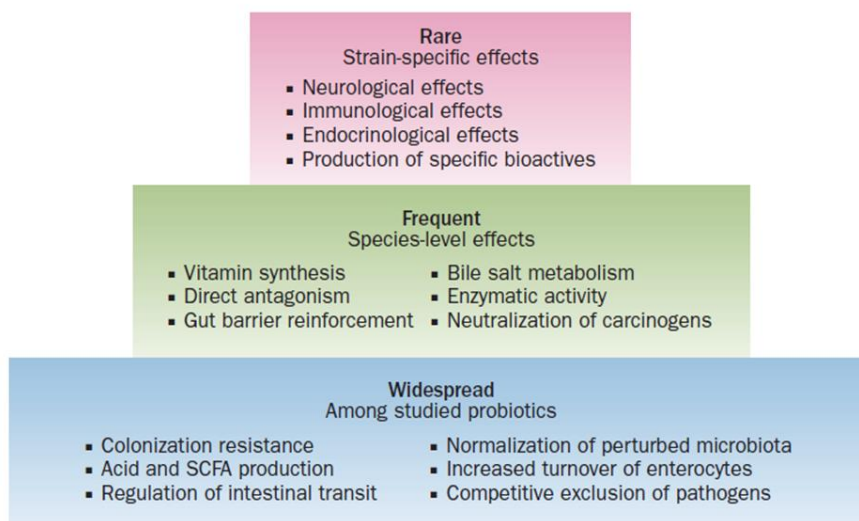


Figura 3. *Possibili meccanismi d'azione dei probiotici.* Alcuni meccanismi potrebbero essere condivisi dai generi probiotici comunemente studiati; altri potrebbero essere frequentemente osservati nella maggior parte dei ceppi di una specie di probiotici; altri possono essere rari e presenti in pochi ceppi di una data specie. Le emergenti evidenze sui ceppi probiotici suggeriscono che possono essere effettuate alcune generalizzazioni, al di là degli effetti specifici del ceppo.

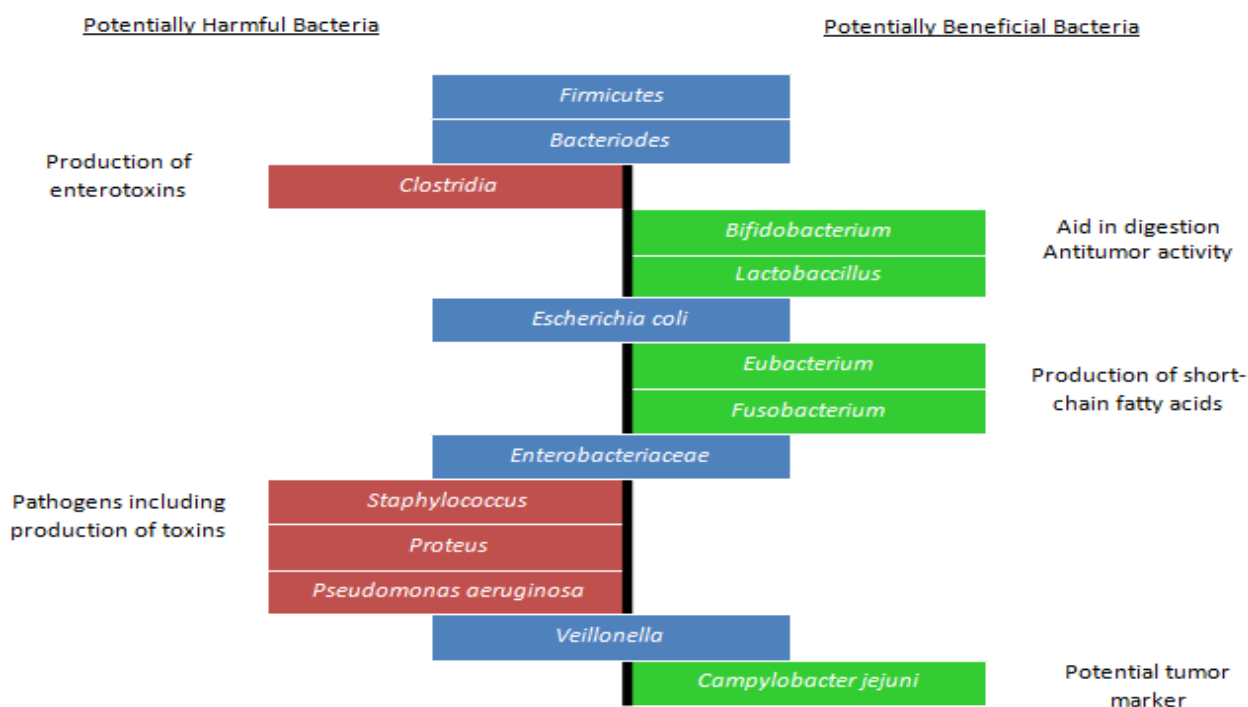


Figura 4. *Rappresentazione schematica di batteri potenzialmente nocivi e potenzialmente benefici presenti nel microbioma intestinale.* Batteri probiotici come lattobacilli e bifidobatteri modulano l'ambiente intestinale rilasciando composti bioattivi che migliorano la funzione della barriera epiteliale enterica, nonché competendo per il legame all'epitelio con i batteri patogeni. Eubacterium rectale e Fusobacterium producono acidi grassi come l'acido acetico, propionato e butirato che sono importanti come fonte di energia per cellule epiteliali intestinali e modulano anche le risposte immunitarie della mucosa. Al contrario, più alti numeri di batteri come Staphylococcus e Pseudomonas sono osservati in vari disturbi metabolici come il diabete e l'obesità. E.coli è un commensale comune del microbioma intestinale. Però, alcuni sierotipi sono patogeni e sono noti per causare gastroenteriti e infezioni del tratto urinario.

1.3 IL BRAIN-GUT-MICROBIOTA AXIS

L'asse intestino-cervello (*"brain gut axis"*; BGA), consiste in una comunicazione bidirezionale tra il SNC e il SNE (sistema nervoso enterico), che collega i centri emozionali e cognitivi del cervello con le funzioni intestinali. I recenti progressi nella ricerca hanno descritto l'importanza del microbiota intestinale nell'influenzare queste interazioni, cioè attraverso la trasmissione di segnali dal microbiota intestinale all'encefalo e dall'encefalo al microbiota intestinale attraverso collegamenti neurali, endocrini, immunitari e umorali.⁷⁴

Scoperte sullo stretto dialogo tra intestino e encefalo hanno rivelato un complesso sistema di comunicazione che non solo garantisce il corretto mantenimento dell'omeostasi gastrointestinale, ma è probabile che abbia molteplici effetti sull'affettività, motivazione, e sulle più alte funzioni cognitive. La complessità di queste interazioni è racchiusa nella denominazione di BGA. Il suo ruolo è quello di monitorare e integrare funzioni intestinali, nonché collegare centri cognitivi ed emotivi del cervello con le funzioni intestinali periferiche e meccanismi come l'attivazione immunitaria, la permeabilità intestinale, i riflessi enterici e i segnali entero-endocrini. I meccanismi alla base delle comunicazioni all'interno del BGA coinvolgono mediatori neuro-immuno-endocrini. Questa rete di comunicazione bidirezionale comprende il SNC, sia l'encefalo che il midollo spinale, il SNA, SNE e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA).

L'asse HPA è considerato l'asse efferente fondamentale dello stress, che coordina le risposte di adattamento dell'organismo a fattori di stress di qualsiasi tipo. Si tratta di una parte del sistema limbico, una zona cruciale dell'encefalo prevalentemente coinvolta nella memoria e nelle risposte emotive. Lo stress ambientale, così come eleva i livelli sistemici delle citochine pro-infiammatorie, attiva questo sistema che, attraverso la secrezione di CRH dall'ipotalamo, stimola la secrezione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) dalla ghiandola pituitaria che, a sua volta, porta al rilascio di cortisolo da parte delle ghiandole surrenali. Il cortisolo è un importante ormone dello stress che colpisce più organi umani, tra cui il cervello. Così, entrambe le vie di comunicazione, ormonale e neurale, dialogano per permettere all'encefalo di influenzare le attività delle cellule effettrici intestinali, come le cellule immunitarie, cellule epiteliali, neuroni enterici, cellule muscolari lisce, cellule interstiziali di Cajal e cellule enterocromaffini.⁷⁵

Sia evidenze cliniche che sperimentali suggeriscono che il microbiota intestinale ha un impatto importante sul BGA, non interagendo solo a livello locale con le cellule intestinali e il SNE, ma anche direttamente con il SNC, attraverso vie neuroendocrine e metaboliche. Negli esseri umani, la prova più convincente di un'interazione microbiota-intestino-encefalo è sorta più di 20 anni fa, dall'osservazione del miglioramento, spesso drammatico, nei pazienti con encefalopatia epatica, dopo la somministrazione di antibiotici per via orale.

L'alterazione che si verifica nel BGA determina cambiamenti nella motilità, nella secrezione intestinale, provoca ipersensibilità viscerale, porta ad alterazioni cellulari del sistema entero-endocrino e del SI.

Inoltre, il fenotipo dell'ipersensibilità viscerale, tipico dell'IBS, può essere trasferito attraverso il trapianto del microbiota di pazienti con IBS a ratti precedentemente GF. La disregolazione concomitante sia del BGA che della flora intestinale nella patogenesi dell'IBS ha portato alla proposta di considerare questo FGID come un disturbo del brain-gut-microbiota axis.⁷⁵

Studi su animali hanno dimostrato che la colonizzazione batterica dell'intestino degli animali GF è centrale per lo sviluppo e la maturazione sia del SNE che del SNC. L'assenza di colonizzazione microbica è associata ad un'alterata espressione e turnover dei neurotrasmettitori in entrambi i due sistemi nervosi, e anche ad alterazioni delle funzioni sensitivo-motorie dell'intestino, consistenti nel ritardato svuotamento gastrico e transito intestinale, ridotta ricorrenza e propagazione distale dei complessi motori ciclici, e le dimensioni del cieco allargate. Anormalità neuromuscolari sono risultate associate ad una riduzione dell'espressione genica di enzimi coinvolti nella sintesi e trasporto di neurotrasmettitori, così come quella delle proteine muscolari contrattili. Tutte queste anomalie vengono ripristinate, dopo la colonizzazione batterica dell'animale in modo specie specifico.

Ancora studi condotti su animali GF hanno anche dimostrato che il microbiota influenza la risposta allo stress e i comportamenti ansiosi, e regola il set point per l'attività dell'HPA. Questi animali mostrano generalmente una diminuita ansia basale e un aumento della risposta allo stress con livelli aumentati di ACTH e cortisolo. La colonizzazione microbica intestinale porta a una normalizzazione dell'asse in modo età-dipendente, con risoluzione dell'esagerata risposta allo stress solo nei topi molto giovani, sostenendo l'esistenza di un periodo critico durante il quale la regolazione della plasticità neurale è sensibile all'input fornito dal microbiota. Parallelamente, negli animali GF, è stata riportata anche una disfunzione della memoria probabilmente da attribuire ad un'alterata espressione del brain derived neurotrophic factor (BDNF), uno dei fattori più importanti coinvolti nella plasticità neurale e nella

memoria. Questa molecola è un fattore neurotrofico, situato principalmente nell'ippocampo e la corteccia cerebrale, che regola diversi aspetti delle attività cerebrali e delle funzioni cognitive, nonché la riparazione, la rigenerazione e la differenziazione del muscolo. Infine, la presenza del microbiota risulta anche modulare il sistema serotonergico, poiché sono stati riportati un aumentato turnover della 5-HT e livelli alterati di metaboliti nel sistema limbico di animali GF. L'impatto del microbiota sul BGA è stato ulteriormente supportato da studi finalizzati alla manipolazione del microbiota intestinale attraverso l'uso di probiotici e/o antibiotici. Questi studi confermano anche che il microbiota colpisce l'ansia e il sistema HPA influenzando la neurochimica dell'encefalo. Il trattamento cronico con *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 induce modifiche regione-dipendenti nell'espressione del mRNA del GABA nell'encefalo. Rispetto ai topi con dieta controllata, GABAB1b è aumentato nella corteccia cingolata e nelle regioni pre-limbiche, mentre contemporaneamente è diminuito nell'ippocampo, amigdala, e locus coeruleus. A sua volta l'espressione del mRNA del GABAA α 2 era ridotto nella corteccia prefrontale e nell'amigdala, ma è aumentato nell'ippocampo. I probiotici, in parallelo, riducono il rilascio stress indotto del cortisolo, e i comportamenti ansioso depressivi.

In un modello di colite cronica associata a comportamenti ansiosi, l'effetto ansiolitico ottenuto con un trattamento con *Bifidobacterium longum*, era assente nei topi che erano stati vagotomizzati prima dell'induzione della colite, sottolineando l'importanza del nervo vago come via di comunicazione bidirezionale all'interno del brain-gut-microbiota axis. Il microbiota può interagire con il BGA attraverso diversi meccanismi, il principale dei quali sembra essere la modulazione della barriera intestinale, la cui perturbazione può influenzare tutti i compartimenti sottostanti. Altri prodotti dei mastociti, come anche il CRH, a sua volta, possono aumentare la permeabilità epiteliale ai batteri, che ne facilita l'accesso alle cellule immunitarie nella lamina propria.⁷⁵

È stato ipotizzato che lo stress possa apportare alterazioni nell'integrità della barriera epiteliale, che divenuta compromessa, aumenterebbe la permeabilità intestinale e di conseguenza si avrebbe la traslocazione di batteri Gram negativi attraverso lo strato mucoso. Questo permette ai mediatori umorali e cellulari di interagire direttamente con le cellule immuni e il SNE, portando all'attivazione di una risposta infiammatoria.³¹

Effetti centrali specie specifici dei probiotici sono infatti associati al ripristino dell'integrità delle tight-junctions e la protezione della barriera intestinale, come recentemente riportato in un modello animale di stress con la tecnica di deprivazione dell'acqua. Il pretrattamento degli animali con una formulazione combinata di probiotici con *Lactobacillus helveticus* R0052 e

Bifidobacterium longum R0175 ripristinava l'integrità della barriera delle tight-junctions e attenuava le attività dell'asse HPA e del SNA, valutato attraverso i livelli di cortisolo e delle catecolamine plasmatiche.

L'encefalo potrebbe anche influenzare la composizione e le funzioni del microbiota attraverso l'alterazione della permeabilità intestinale, permettendo ad antigeni batterici di penetrare l'epitelio e stimolare una risposta immunitaria mucosale. Lo stress acuto aumenta la permeabilità paracellulare del colon, coinvolgendo una sovrapproduzione di interferone- γ e diminuzione dell'espressione di mRNA di ZO-2 e occludina.⁷⁵

Il microbiota può interagire con il BGA anche attraverso la modulazione di nervi sensoriali afferenti come riportato per *Lactobacillus reuteri* che, aumentando la loro eccitabilità attraverso l'inibizione dell'apertura dei canali del potassio calcio-dipendenti, modula la motilità intestinale e la percezione del dolore. Inoltre, il microbiota può influenzare l'attività del SNE con la produzione di molecole che possono agire come neurotrasmettitori locali, come GABA, 5-HT, melatonina, istamina e acetilcolina e generando una forma biologicamente attiva di catecolamine nel lume intestinale. I Lattobacilli utilizzano anche nitrati e nitriti per generare ossido nitrico e per produrre idrogeno solforato che modula la motilità intestinale, interagendo con il recettore vanilloide sulle fibre nervose capsaicina sensibili.

Il SNE rappresenta anche il target di metaboliti batterici. Uno dei prodotti principali del metabolismo batterico sono gli SCFA, come l'acido butirrico, l'acido propionico e l'acido acetico, che sono in grado di stimolare il sistema nervoso simpatico, il rilascio di 5-HT dalla mucosa e di influenzare la memoria e il processo di apprendimento. In questo contesto, è interessante segnalare che la manipolazione del microbiota con la dieta, può influenzare il comportamento. Infatti, i topi alimentati con una dieta contenente il 50% di carne bovina macinata magra, hanno una maggiore varietà di batteri intestinali rispetto a quelli che ricevevano il mangime standard per roditori, e presentavano un aumento dell'attività fisica, della memoria di riferimento e meno comportamenti ansiosi.⁷⁵

Data la capacità del microbiota intestinale di alterare la disponibilità dei nutrienti e la stretta relazione tra il rilevamento di sostanze nutritive e la secrezione di peptidi dalle cellule enteroendocrine, l'interazione tra microbiota e BGA potrebbe anche avvenire attraverso il rilascio di peptidi biologicamente attivi da parte delle cellule enteroendocrine che possono influenzare il BGA.

Il microbiota influisce sull'attivazione immunitaria mucosale. L'aumentata infiammazione della mucosa indotta nei topi da un trattamento con antimicrobici orali, aumenta l'espressione

della sostanza P nel SNE, un effetto normalizzato dalla somministrazione di *Lactobacillus paracasei* che attenua anche l'ipersensibilità viscerale indotta dagli antibiotici. Gli effetti del microbiota sull'attivazione immunitaria potrebbero essere in parte mediati dalle proteasi. Questi enzimi sono sovraregolati nei disturbi intestinali immunomediati e diventano gli effettori finali del danno alla mucosa e al SNE. L'aumento della concentrazione delle proteasi è stato rilevato in campioni di feci di pazienti con IBS associate a specifiche specie batteriche intestinali.⁷⁵

Diversi tipi di stress psicologico modulano la composizione e la biomassa totale del microbiota intestinale, indipendentemente dalla durata. Infatti, anche l'uso breve di fattori di stress influiscono sul microbiota, essendo l'esposizione per sole 2 ore a un fattore di stress sociale in grado di cambiare in modo significativo il profilo della comunità e di ridurre le proporzioni relative dei phyla principali del microbiota. Questi effetti possono essere mediati, attraverso sistemi di output efferenti neuroendocrini paralleli (es. SNA e HPA), sia direttamente attraverso il signaling del microbiota intestinale, che indirettamente tramite i cambiamenti all'ambiente intestinale.

L'influenza diretta è mediata dalla secrezione, sotto la regolazione dell'encefalo, di molecole del segnale da parte dei neuroni, cellule immunitarie e cellule enterocromaffini, che potrebbero influenzare il microbiota. La comunicazione tra effettori del SNC e batteri si basa sulla presenza di recettori dei neurotrasmettitori sui batteri. Diversi studi hanno segnalato che i siti di legame per i neurotrasmettitori enterici prodotti dall'ospite sono presenti anche sui batteri e ciò può influenzare la funzione dei componenti del microbiota, contribuendo ad aumentare la predisposizione a stimoli infiammatori e d'infezione. È stata segnalata in *Pseudomonas Fluorescens* un'alta affinità per il sistema GABA con proprietà simili a quelle di un recettore cerebrale. *Escherichia coli* O157: H7 possiede un recettore per l'adrenalina/noradrenalina che può essere bloccato in modo specifico dagli antagonisti adrenergici.⁷⁵

Inoltre, il cervello ha un ruolo di primo piano nella modulazione delle funzioni intestinali, come la motilità, la secrezione acida, di bicarbonati e muco, la gestione dei fluidi intestinali e la risposta immunitaria della mucosa, tutti meccanismi importanti per il mantenimento dello strato di muco e biofilm dove i singoli gruppi di batteri crescono nella molteplicità di differenti microhabitat e nicchie metaboliche, associate alla mucosa. Una disregolazione di BGA può allora influire sulla flora intestinale attraverso la perturbazione del normale habitat della mucosa. Lo stress induce variazioni nella quantità e qualità della secrezione di muco.⁷⁵

Quindi, riassumendo, il brain-gut-microbiota axis è un'espansione del concetto fino a qui espresso del brain-gut axis (BGA), a cui si fa riferimento per indicare i vari e complessi meccanismi con i quali il microbiota intestinale interviene nella modulazione della comunicazione bidirezionale intestino-encefalo.

Da quanto detto sopra, l'IBS appare una patologia multiforme, con in gioco fattori sia periferici che centrali. Quindi è più comunemente descritta come un disordine biopsicosociale del BGA.

Questo asse è centrale nel mantenimento dell'omeostasi ed è coinvolto in una pletera di funzioni fisiologiche che includono funzioni motorie, sensitive, autonome e secretorie del tratto gastrointestinale che regolano una moltitudine di funzioni dal metabolismo energetico alla regolazione dell'umore.

La 5-HT è principalmente conosciuta per il suo ruolo a livello cerebrale, funzionando da neurotrasmettitore, ma circa il 95% della 5-HT presente nel corpo è contenuta nell'intestino, in particolare nelle cellule enterocromaffini e le terminazioni nervose del SNE. Le funzioni della 5-HT a livello del tratto gastrointestinale comprendono la regolazione della motilità, della secrezione e della percezione sensoriale. Le sue funzioni nel SNC comprendono la regolazione del tono dell'umore, processi cognitivi, e l'elaborazione centrale dei segnali sensoriali coinvolti nell'elaborazione del dolore.

Quindi, è evidente che il segnale legato alla 5-HT è una chiave d'unione in questo asse, le quali disfunzioni possono sottostare ai sintomi patologici presenti sia nei disordini gastrointestinali che nei disordini dell'umore, e potrebbero anche spiegare gli alti livelli di comorbidità che hanno questi disturbi.

Inoltre i composti terapeutici che modulano la trasmissione serotoninergica, come i TCA e gli SSRI, si sono dimostrati efficaci non solo nei disordini affettivi, ma anche nei disturbi gastrointestinali come l'IBS.³¹

PERCORSI BIDIREZIONALI CONSOLIDATI NEL BRAIN-GUT-MICROBIOTA AXIS

- SISTEMA NERVOSO AUTONOMO E ENTERICO

Percorsi di comunicazione neurali del BGA includono sia i nervi simpatici e parasimpatici, del SNA, che il SNE. Il sistema nervoso simpatico innerva principalmente i letti vascolari del tratto gastrointestinale e il SNE, e innerva secondariamente la lamina propria e le placche del

Peyer, soprattutto nelle regioni dei linfociti T. Il ruolo del sistema nervoso simpatico nel BGA comprende la regolazione della motilità, il flusso di sangue, la funzione di barriera, e l'attivazione del SI. La comunicazione bidirezionale attraverso il nervo vago, un componente del sistema nervoso parasimpatico, è un percorso ben consolidato per la comunicazione gut-brain. Il SNE, è a volte indicato come "il secondo cervello", e comprende neuroni primari afferenti intrinseci, motoneuroni e cellule gliali contenute nel plesso mioenterico e il plesso sottomucoso che si estendono lungo l'intera lunghezza dell'intestino. È curioso notare che il SNE possiede molti più neuroni dello stesso SNC. Il SNE gioca un ruolo essenziale nella normale funzione intestinale compresa la motilità e la secrezione.

Le interazioni microbiota-SNE sono un fattore fondamentale che influenza la funzione del BGA. Prove che collegano la flora intestinale e il SNE sono fornite da un recente lavoro condotto in topi GF. Quest'ultimi non hanno il microbiota intestinale e come tale mostrano un SI non sviluppato. Il plesso mioenterico del digiuno e dell'ileo dei topi GF ha un aspetto reticolare disorganizzato, con meno gangli, e fibre nervose più sottili. La motilità intestinale, misurata come frequenza delle contrazioni muscolari spontanee, è diminuita nei topi GF.

Diversi report hanno esaminato l'attività intestinale mioelettrica e la funzione neuromuscolare enterica nei ratti adulti GF. Questi studi hanno osservato che tali attività sono alterate nei ratti GF, e vengono normalizzate dalla colonizzazione con il microbiota normale.

Mentre il SNE può operare in modo indipendente dal SNC, la comunicazione microbiota-SNE influenza anche i sistemi di neurotrasmissione del SNC. Gli assoni dei neuroni del SNE terminano nel rivestimento epiteliale intestinale e sono in grado di rispondere direttamente al contenuto luminale o indirettamente a sostanze neurochimiche prodotte dai batteri luminali o dalle cellule enteroendocrine. Un percorso implicato nella comunicazione microbiota-SNE-SNC è attraverso il nervo vago. È stato recentemente suggerito che i neuroni del SNE possono attivare afferenze vagali e quindi influenzare le funzioni del SNC. Parallelamente, afferenze vagali primarie comunicano anche con il SNC in risposta a ormoni intestinali e a peptidi regolatori. L'importanza del nervo vago nel brain-gut-microbiota axis è fornita da studi su animali che impiegano la vagotomia sottodiaframmatica. La somministrazione di probiotici (*Lactobacillus rhamnosus*) ai topi Balb/C sani ha determinato sia una riduzione dei comportamenti ansigeni e depressivo simili, sia cambiamenti a lungo termine dell'espressione del recettore del GABA nel SNC. Questi effetti non sono stati osservati in topi Balb/C vagotomizzati.²⁸

- **LO STRESS E IL BRAIN-GUT- MICROBIOTA AXIS**

L'origine e lo sviluppo di un "sano" microbiota intestinale inizia nelle fasi precoci della vita, dove si delinea anche un'importante finestra temporale per lo sviluppo neurologico. Questo fornisce un'importante opportunità al microbiota, che sta colonizzando il tratto gastrointestinale, di avere un'influenza sui sistemi immaturi come i pathway del dolore nel SNC, e avere un impatto permanente. Questo è supportato dalla comunicazione bidirezionale fornita dal brain-gut-microbiota axis. Durante le fasi precoci della vita l'asse si sta sviluppando ed è aperto alle modifiche apportate dal microbiota intestinale, cosa che è stata dimostrata in molti studi.

Più di 40 anni fa Tannock e Savage⁷⁶ dimostrarono che lo stress ambientale e lo stress legato alla dieta era capace di alterare in modo importante il microbiota intestinale nei topi, affliggendo fattori che influenzano e regolano i livelli e la localizzazione lungo il tratto gastrointestinale delle popolazioni di microrganismi, permettendo probabilmente lo stabilimento di specie batteriche patogene.

Studi hanno dimostrato che sia gli stress prenatali che postnatali dopo la nascita possono avere un impatto sulla colonizzazione microbica. Inoltre, l'appropriata colonizzazione batterica postnatale ha un impatto sui pathway del dolore, come osservato nei topi GF che hanno una ridotta capacità di rispondere al dolore infiammatorio, ed è stato dimostrato che il trattamento con antibiotici nelle prime fasi della vita è associato a ipersensibilità viscerale. Anche nei topi adulti è stato dimostrato che lo stress sociale di separazione porta ad alterazioni nel microbiota intestinale e ad aumentati livelli di citochine proinfiammatorie circolanti. In particolare questo stress porta a una diminuzione di *L.reuteri*, una specie batterica immunomodulatrice.

Gli stress sociali aumentano il rischio di patologie infiammatorie, promuovendo l'espressione di geni proinfiammatori e la differenziazione dei monociti. Dunque, le alterazioni infiammatorie che portano a una flora intestinale alterata possono intensificare la capacità dei patogeni enterici di colonizzare l'intestino.

È stato anche dimostrato che lo stress acuto e lo stress ripetuto affliggono i livelli di IgA secretorie, impattando sull'omeostasi intestinale, la risposta infiammatoria, e la possibile disbiosi.

Lo stress può influenzare il microbiota intestinale non solo attraverso il SI, ma anche portando cambiamenti nei livelli circolanti delle catecolammine, le quali hanno anche un importante impatto sul microbiota intestinale. Inoltre, lo stress influisce sul recupero dalle infezioni

batteriche dovuto al fatto che i batteri intestinali rispondono ai neurotrasmettitori e ad altri mediatori legati allo stress.

Recentemente è stato dimostrato che è necessaria la presenza del microbiota per l'espressione dei comportamenti ansiosi e depressivi conseguenti alla separazione materna, infatti i topi GF non manifestano il fenotipo tipicamente dato da stress avvenuti nelle fasi precoci della vita come la separazione materna. Tale stress sembra anche alterare l'ambiente intestinale, che può potenzialmente portare a cambiamenti nella popolazione batterica. Quindi è possibile che lo stress cambi l'ambiente interno dell'intestino attraverso meccanismi immunitari, neurochimici e fisici, che lo rendano meno adatto per certe specifiche specie batteriche, ma porti all'aumento delle specie batteriche più patogene.³¹

Il microbiota e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene

L'uso di animali GF ha fornito una delle più significative informazioni sul ruolo del microbiota nella regolazione dello sviluppo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA).

Tuttavia, in assenza del microbiota intestinale residente, membri chiave della famiglia TLR (Toll-like receptor) hanno un'espressione bassa o assente nell'intestino, compromettendo così un'appropriata risposta neuroendocrina ai patogeni. Per esempio, il topo knockout per TLR4 non risponde a batteri Gram negativi con un'attivazione della HPA. Studi condotti da Sudo et al.⁷⁷ forniscono informazioni sul ruolo del microbiota intestinale nello sviluppo dell'asse HPA. In topi GF, uno stress di contenzione lieve induce un rilascio esagerato di corticosterone e ACTH rispetto ad animali di controllo specific pathogen free (SPF). La risposta allo stress nei topi GF è parzialmente ripristinata dalla colonizzazione con materiale fecale da animali SPF e completamente ripristinata con la somministrazione di *B. infantis* durante la prima infanzia. Questo studio ha chiaramente dimostrato che il contenuto microbico intestinale è fondamentale per lo sviluppo di un'adeguata risposta allo stress nella successiva vita adulta, e anche che vi è una stretta finestra temporale nella prima infanzia dove deve avvenire la colonizzazione per garantire il normale sviluppo dell'asse HPA.

La questione che emerge è se il microbiota intestinale possa avere un'influenza sui circuiti neurali e il comportamento associato con la risposta allo stress. Sudo et al.⁷⁷ hanno riportato una diminuzione del brain derived neurotrophic factor (BDNF), una neurotrofina chiave coinvolta nella crescita e la sopravvivenza neuronale, e dell'espressione della subunità 2A del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) nella corteccia e nell'ippocampo di animali GF maschi rispetto agli animali di controllo SPF. D'altra parte, Neufeld et al.⁷⁸ hanno effettivamente trovato un aumento ippocampale del mRNA del BDNF in topi di sesso

femminile che era in contrasto alle diminuzioni della proteina osservate nel precedente studio. Dinan et al.²⁸ hanno recentemente trovato anche la diminuzione dei livelli del mRNA del BDNF dell'ippocampo, così come i cambiamenti distinti nel sistema serotonergico in topi maschi, ma non nelle femmine. Ciò suggerisce che la regolazione del brain-gut-microbiota axis può essere dipendente dal sesso dell'ospite. In numerosi studi negli animali GF sono state dimostrate alterazioni dell'espressione nell'ippocampo del recettore NMDA e del recettore 1A della serotonina (5-HT_{1A}). Entrambi questi recettori sono noti per influenzare il rilascio di CRH dall'ipotalamo e le variazioni di espressione possono spiegare l'alterata funzione di HPA in tali animali.

Il fattore di stress aumentava anche i livelli circolanti di IL-6 e proteina-1 monociti chemiotattica (MCP-1), che sono stati significativamente correlati con le modifiche stress-indotte a tre generi batteri (cioè, Coprococcus, Pseudobutyrvibrio, e Dorea). In un modello di separazione materna, Desbonnet et al.⁷⁹ ha osservato cambiamenti comportamentali con il trattamento con *B. infantis*, ma non una riduzione del corticosterone, mentre con l'utilizzo di un modello simile, Gareau et al.⁸⁰ hanno trovato che aggiungendo all'alimentazione un *Lactobacillus* si riducevano i livelli di corticosterone, e McKernan et al.⁸¹ hanno trovato che la somministrazione di *B. infantis* ha ridotto i livelli di corticosterone, anche se la riduzione non ha raggiunto la significatività statistica. In un recente studio clinico, a volontari sani sono stati dati *L. helveticus* R0052 e *B. longum* R0175 in combinazione o placebo in doppio cieco, randomizzato, a gruppi paralleli per 30 giorni. I valori della raccolta nelle ventiquattro ore di cortisolo libero urinario erano ridotti con il trattamento probiotico.²⁸

- IL MICROBIOTA E IL SISTEMA IMMUNITARIO

È dovuto ricordare che l'intestino è il più importante organo a funzione immunitaria dell'individuo, tanto che circa il 60% delle cellule ad attività immunitaria dell'intero organismo sono localizzate nelle mucosa intestinale.

Lo sviluppo del SI intestinale è largamente dipende dall'esposizione ai microrganismi. Il microbiota intestinale regola lo sviluppo di strutture linfoidi e modula la differenziazione delle sottopopolazioni di cellule immunitarie, così mantenendo le interazioni omeostatiche tra l'ospite e il microbiota intestinale. Il modello GF si basa sul fatto che l'ambiente uterino è sterile durante lo sviluppo prenatale e con il parto chirurgico, in sostituzione del parto vaginale, la possibilità per la colonizzazione postnatale dell'intestino viene eliminata una volta che gli animali siano mantenuti in un ambiente sterile. Negli animali GF, che sono quasi

senza attività immunitaria, la somministrazione di alcuni microrganismi selezionati si è dimostrata efficace nella generazione del completo repertorio della funzione immunitaria.

L'interazione tra microbi intestinali e il sistema immune (SI) dell'ospite è ampiamente riconosciuta promuovere il buon funzionamento del SI, e questo è rafforzato da studi che suggeriscono che un'alterata composizione del microbiota intestinale può portare ad un'attività immunitaria alterata, che potrebbe condurre all'infiammazione di basso grado presente nell'IBS. Il putativo aumento dell'attività immunitaria nei pazienti con IBS può essere dovuto a fattori scatenanti esogeni o endogeni; tuttavia, il modello d'attività immunitaria nell'IBS è lungi dall'essere pienamente compreso e probabilmente coinvolge sia l'immunità innata che adattativa.

Il sistema immunitario innato

Avendo un ruolo fondamentale nel SI innato, i mastociti sono in prima linea nell'interfaccia tra l'ospite e il lume intestinale. Numerosi studi hanno riportato nei pazienti con IBS, un aumento del numero dei mastociti, del loro livello d'attivazione e dell'area occupata dai mastociti nella mucosa intestinale, rispetto ai controlli sani. Considerando la correlazione tra flora intestinale, il SI e i reperti di un aumento del numero dei mastociti in IBS, potrebbe essere ragionevole che un cambiamento nella composizione della flora intestinale potrebbe mediare una risposta immunitaria che porta ad un conseguente aumento dei mastociti, potenzialmente contribuendo all'ipersensibilità viscerale. Tuttavia, non vi è ancora alcuna prova a sostegno di un'associazione tra un'alterata composizione del microbiota e i livelli dei mastociti in IBS, così questo legame putativo resta ancora da essere definito.

Un altro aspetto dell'immunità innata sono i macrofagi. Attualmente, il rapporto tra un numero aumentato o diminuito dei macrofagi osservato in IBS, è ancora in via di discussione. Potenzialmente, per un sottogruppo di pazienti con IBS, potrebbe essere proposto che il SI può essere compromesso e quindi meno capace di rispondere ai microrganismi patogeni. Questa teoria è supportata dal riscontro in IBS di diminuiti livelli di chemochine secrete quali CXCL-9 e MCP-1, note per reclutare cellule dendritiche e altre cellule immunitarie. Tuttavia, anche i dati sull'espressione di fattori chemiotattici intestinali sono in discussione, dato che in IBS è stato riportato pure un aumento di MCP-1. Inoltre, nei pazienti con IBS tende ad essere trovato un aumento dei livelli sierici di citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-8, e TNF α , e ciò ancora una volta evoca l'idea che le alterazioni arrecate alla flora intestinale in seguito ad una risposta immunitaria, evocata da qualsiasi patogeno, provochi perturbazioni sistemiche.

I Toll-like receptor (TLR), recettori di pattern recognition, giocano un ruolo fondamentale e sono ampiamente espressi da molte cellule, incluse le cellule epiteliali e i macrofagi. I TLR intervengono nel riconoscimento dei segnali di pericolo quali strutture trovate su batteri e virus. Questi recettori sono la porta di accesso al SI innato e sono un primo passo nella cascata che porta alla produzione di citochine. Gli studi mostrano un'alterata espressione dei TLR nei pazienti con IBS rispetto ai controlli sani, con aumenti specifici dei TLR2, TLR4, e TLR5 e diminuzioni dei TLR7 e TLR8, e suggeriscono l'idea che l'IBS sia legata ad un'attivazione alterata del SI in risposta a microrganismi dell'intestino. Inoltre, le defensine, come la β -defensina 2 umana, che sono peptidi antimicrobici secreti dalle cellule epiteliali del colon in risposta a citochine proinfiammatorie o microrganismi patogeni, sono aumentate nei pazienti con IBS.

Il sistema immunitario adattativo

Seguendo l'ipotesi di un'attivazione immunitaria di basso grado che si verifica nell'IBS, le cellule T del SI adattativo sono state ipotizzate avere una maggiore prevalenza nei pazienti con IBS e in sottogruppi come IBS postinfettiva (PI-IBS). Similmente all'aumento dell'attività del SI innato osservato nell'IBS, una maggiore presenza o l'attivazione di cellule T possono contribuire alla generazione dei sintomi. Pertanto, l'aumento di cellule T del sangue, che esprimono marcatori di attivazione come CD69 e HLA-DR, così come l'integrina $\alpha 4\beta 7$ per l'homing a livello intestinale, suggerisce che i pazienti con IBS evidenziano cellule T con fenotipo attivato rispetto ai controlli sani. Inoltre, è stato osservato un aumento degli anticorpi sierici contro la flagellina in PI-IBS rispetto ai non-PI-IBS e ai controlli sani. Inoltre, sono stati riportati livelli comparabili di linfociti B nel sangue di pazienti con IBS e i controlli sani, anche se la frequenza di linfociti B che esprimono IgG, che indica una condizione di attivazione, è aumentata nei pazienti. Inoltre, dopo stimolazione in vitro dei linfociti B dei pazienti con IBS con un cocktail di batteri, è stata osservata un'espressione alterata del ligando costimolatorio CD80, che si ipotizza portare a restrizioni dell'attivazione delle cellule T. Questo suggerisce che l'espressione alterata di molecole costimolatorie dei linfociti B potrebbe essere una potenziale causa per l'aumento del numero delle cellule T riportato nei pazienti con IBS.⁴²

Evidenze di interazioni tra Microbiota e Sistema Immunitario nei disordini psichiatrici

I TLR sono anche universalmente distribuiti sui neuroni, permettendo così loro di rispondere a componenti batterici e virali. Mentre l'epitelio intestinale agisce sostanzialmente come una

barriera alla traslocazione di microrganismi nell'ambiente interno, il sistema nervoso è preparato e in grado di rispondere a tali interazioni. La depressione è associata alla presenza di biomarcatori dell'infiammazione quali elevati livelli di IL-6, TNF α , e proteina C reattiva. Simili biomarcatori d'infiammazione sono stati osservati elevati negli stati d'ansia e sono noti verificarsi a causa di stress. Il sito in cui queste molecole proinfiammatorie vengono prodotte nella depressione non è noto ed è ancora da verificare se l'elevazione è fondamentale per la fisiopatologia o semplicemente un epifenomeno. Esistono prove fornite da studi su roditori per indicare che lo stress altera la funzione della barriera intestinale, permettendo a LPS e ad altre molecole di accedere al flusso sanguigno, stimolando TLR4 e altri TLR con conseguente produzione di citochine infiammatorie. Se ciò si verifica nella depressione, cosa che deve essere ancora dimostrata, sarebbe d'aiuto per spiegare il fenotipo proinfiammatorio osservato. È da tempo riconosciuto che i microbi patogeni possono produrre una sindrome depressiva. Quindi, come viene indotta la sindrome? Ed è possibile che i batteri commensali possano avere un'azione inversa ed alleviare i sintomi depressivi? L'evidenza indica che l'attivazione immunitaria periferica può portare a cambiamenti dei neurotrasmettitori centrali.

Dinan et al.²⁸ hanno anche riferito che le aree d'attivazione del tronco encefalico, in particolare il nucleo del tratto solitario e il nucleo laterale parabrachiale, partecipano nell'elaborazione delle informazioni neurali che portano a risposte autonome, neuroendocrine, e comportamentali. Mentre un'eziologia infettiva dei disturbi dell'umore non è attualmente un importante argomento di ricerca, biomarcatori proinfiammatori elevati sono essi stessi associati con il cosiddetto "comportamento di malattia", un termine usato per descrivere i cambiamenti comportamentali secondari all'infiammazione causata da infezioni, come disturbi dell'umore, sonno, appetito e affaticamento. È chiaro ormai che le citochine infiammatorie prodotte perifericamente possono influenzare direttamente il cervello e si sono dimostrate in grado di aumentare la permeabilità della barriera ematoencefalica. Tuttavia, l'iniezione sistemica di citochine infiammatorie come l'IFN- α è associata con l'induzione di sintomi depressivi (per esempio nella pratica clinica questi effetti si possono osservare nella terapia per HCV con IFN-Pegilato), che possono essere prevenuti con la terapia antidepressiva. E' stato ipotizzato che le principali classi di antidepressivi lavorino, oltre ai loro effetti sulle monoammine centrali, sulla generazione della potente citochina immunoregolatoria, IL-10, sopprimendo in tal modo l'infiammazione e le modifiche del SNC associate alla depressione. In questo proposito, è interessante notare che gli effetti immunoregolatori dei probiotici sono anche pensati verificarsi attraverso la generazione di popolazioni di cellule T regolatorie (Treg) e la sintesi e la secrezione di IL-10. Macpherson e

Uhr⁸² hanno dimostrato che l'alimentazione con batteri commensali nei topi GF provoca il reclutamento locale di cellule dendritiche e modificazioni del fenotipo in grado di promuovere la produzione di Treg e la sintesi di IL-10. L'ingestione di *Lactobacillus rhamnosus* GG è stata suggerita come terapeutica nella gestione di diverse condizioni ed è stata dimostrata aumentare IL-10 nel plasma di questi pazienti. Mentre IL-10 ha potenti proprietà anti-infiammatorie, si è anche pensato che possa agire direttamente come un agente antinocicettivo, indicando che essa dispone di ampi effetti neuroimmuni. L'equilibrio del microbiota intestinale può modificare la regolazione della risposta infiammatoria e quindi possono essere coinvolti nella modulazione dell'umore e del comportamento.²⁸

Alcuni batteri specifici, compresi i membri della famiglia delle Enterobacteriaceae, sembrano essere meglio attrezzati per la sopravvivenza nelle condizioni prevalenti di un intestino infiammato, rispetto ai commensali anaerobici dominanti degli individui sani. Data l'azione antinfiammatoria del butirrato, è possibile che la deplezione dei batteri produttori di butirrato nella disbiosi possa contribuire all'infiammazione. Il Disturbo Depressivo Maggiore, il disturbo bipolare e la schizofrenia sono associati ad una disregolazione delle risposte immunitarie, come evidenziato dagli anormali profili delle citochine pro- ed anti-infiammatorie circolanti nei soggetti affetti.

La disbiosi del microbiota è stata per lo più studiata nel disturbo dello spettro autistico (ASD), un disturbo del neurosviluppo caratterizzata da interazioni sociali e comunicazione deteriorate e ridotte, comportamento ripetitivo, e spesso accompagnato da disturbi gastrointestinali. Diversi gruppi di ricerca hanno studiato il microbiota intestinale della popolazione autistica e hanno trovato una diversa composizione di varie specie microbiche in confronto ad una popolazione sana di controllo. Rispetto ai bambini sani, nei bambini con autismo è stato trovato un numero 10 volte maggiore di germi di tipo *Clostridium*, un aumento di *Bacteroidetes* e *Desulfovibrio*, e diminuiti i *Firmicutes* e i *Bifidobacterium*.

Uno studio condotto da Emanuele et al.⁸³ ha mostrato un aumento di LPS nel sangue di individui con ASD, che corrisponde ad un aumento di IL-6.

Alcuni studi hanno trovato un aumento della permeabilità intestinale nei soggetti autistici e nei loro parenti di primo grado, il che suggerisce che queste modifiche possono essere coinvolte nella patogenesi della malattia.

Rispetto ai bambini con sviluppo tipico e con sintomi gastrointestinali, nelle pareti del tratto gastrointestinale di alcuni bambini con ASD è stata trovata una sottile infiltrazione panenterica di cellule immunitarie, come linfociti, monociti, cellule NK, ed eosinofili. Quando è stato testato, il trattamento antibiotico nei bambini ASD, non solo ha portato a

miglioramenti gastrointestinali, ma anche al miglioramento delle capacità cognitive. Tuttavia, l'esistenza di una patologia gastrointestinale specifica nei soggetti con ASD rimane un argomento controverso.

Severance et al.⁸⁴ hanno recentemente misurato i marcatori sierologici surrogati della traslocazione batterica (CD14 solubile (sCD14) e lipopolysaccharide binding protein (LBP)) nei soggetti bipolari e soggetti con schizofrenia, rispetto ai controlli. La sieropositività a sCD14 conferisce una probabilità d'associazione con la schizofrenia 3,1 volte maggiore rispetto ai controlli.

È stato dimostrato che la somministrazione sperimentale dell'endotossina LPS in soggetti sani può essere associata ad un aumento dei tassi di ansia e depressione, a sua volta associato ad un aumento del cortisolo salivare, noradrenalina e citochine proinfiammatorie plasmatiche.

È stato scoperto che LPS modula la memoria emotiva in modo dose-dipendente. È stata segnalata nei pazienti con disturbi gravi di depressione una bassa secrezione acida gastrica e ciò è stato associato con la SIBO reversibile, con aumento della permeabilità della barriera intestinale, sindrome da malassorbimento, diarrea, dolore addominale e costipazione.

- **IL MICROBIOTA E L'IPERSENSIBILITA' VISCERALE**

La manipolazione del microbiota intestinale in modelli preclinici, per mezzo di trattamenti con probiotici e prebiotici, ha dimostrato che l'ipersensibilità viscerale può essere ripristinata.

In studi con topi, una mistura di 8 ceppi batterici probiotici ha dimostrato avere effetti protettivi contro lo sviluppo dell'ipersensibilità viscerale dovuta alla separazione materna.

Inoltre la stessa mistura somministrata in modo profilattico si è dimostrata efficace nel prevenire l'ipersensibilità viscerale indotta dall'infiammazione, evocata tramite l'istillazione per via intracolica di acido acetico 4%. Specie di Bifidobacteri, in particolare *B. infantis*, è stato dimostrato essere particolarmente efficace nel migliorare l'iperalgia viscerale sia nell'ipersensibilità viscerale indotta dallo stress che nelle coliti. Inoltre *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 si è dimostrato efficace in modelli che usavano topi con aumentata permeabilità colica, e svolgere effetti protettivi nelle funzioni di barriera intestinale, restaurando l'integrità della barriera e aumentando i livelli delle proteine presenti nelle tight-junction, l'occludina e l'E-caderina.

Inoltre, l'ipersensibilità viscerale indotta dall'uso di antibiotici è di nuovo alla base del ruolo del microbiota intestinale nella fisiopatologia del dolore viscerale, che sembra essere dipendente dall'età degli animali alla quale venivano esposti agli antibiotici. Infatti, quando

gli animali sono esposti all'antibiotico nelle fasi precoci della vita, essi sviluppano conseguentemente ipersensibilità viscerale nell'età adulta.

Evidenze precliniche hanno dimostrato che l'ipersensibilità viscerale può essere trasferita ai ratti attraverso il trapianto fecale del microbiota appartenente ad affetti da IBS.

Ad oggi sono ancora pochi gli studi che indagano le dirette interazioni del microbiota intestinale e i suoi metaboliti, sul dolore e i processi nocicettivi. Formil peptidi sono stati dimostrati stimolare direttamente i nervi afferenti primari, mentre altri prodotti batterici, come il LPS possono attivare direttamente i neuroni dei gangli dei cordoni posteriori del midollo spinale, adibiti alla ricezione delle afferenze nocicettive provenienti dal colon. I meccanismi dell'effetto terapeutico dell'uso dei probiotici è stato studiato usando *Lactobacillus reuteri*, che ha dimostrato effetti inibitori sui neuroni dei gangli dei cordoni posteriori del midollo spinale lombare.

Cenac et al.⁸⁵ hanno indagato le alterazioni del contenuto in acidi grassi polinsaturi nelle biopsie coliche dei pazienti con IBS. Gli acidi grassi polinsaturi sono agonisti endogeni dei transient receptor potential channels (TRP), che hanno un ruolo chiave nel segnale nocicettivo. TRPV4, in particolare, è coinvolto in numerosi processi associati all'ipersensibilità viscerale, che comprendono il dolore viscerale indotto da proteasi, istamina e 5-TH. Infatti i neuroni dei gangli dei cordoni posteriori del midollo spinale umani esprimono il TRPV4.

Le proteasi prodotte dal microbiota intestinale e dai mastociti attivati sono implicati nella patogenesi dell'ipersensibilità viscerale. Le proteasi esercitano il loro effetto attraverso i proteinase-activated receptors (PARs), che sono stati ritrovati sia sui neuroni enterici che sui nervi estrinseci che innervano l'intestino, e sono implicati nella mediazione del dolore.

Infine, una nuova supposizione è il ruolo degli SFCA nella comunicazione tra la flora intestinale e l'encefalo. Gli SCFAs prodotti nell'intestino, quali butirrato, sono noti per avere attività inibitoria sull'istone deacetilasi (HDAC). Quindi i processi epigenetici quale l'acetilazione degli istoni potrebbe anche essere alterata dal microbiota intestinale. Inoltre c'è evidenza che i cambiamenti epigenetici sia a livello del midollo spinale che a livello sovraspinale sono coinvolti nel dolore viscerale stress indotto nelle precoci fasi della vita e nell'età adulta.³¹

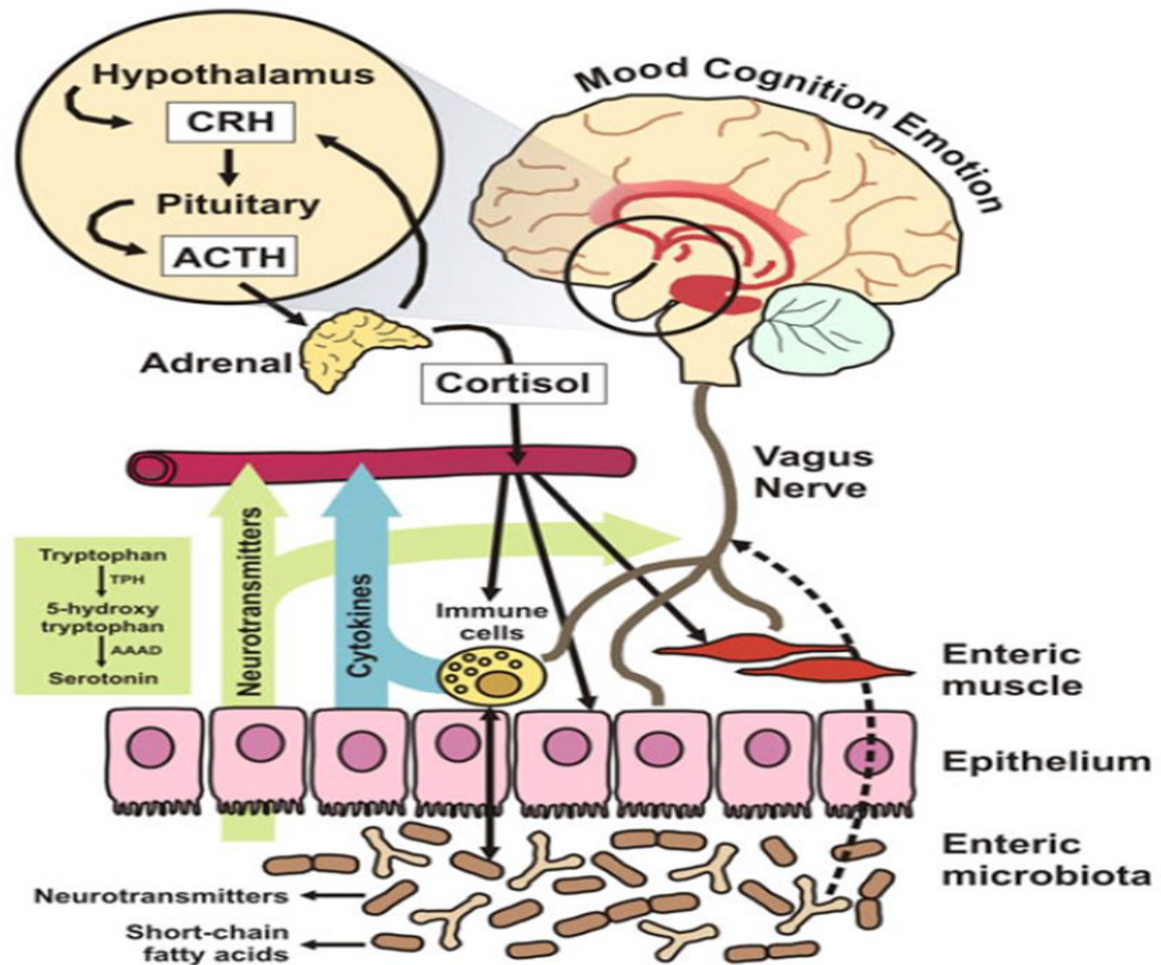


Figura 5. Vie di comunicazione lungo il Brain-Gut-Microbiota Axis. Sono state proposte numerose vie di comunicazione con le quali il microbiota può modulare i segnali lungo l'asse cervello-intestino, per esempio attraverso il sistema immunitario e vie neurali. Alcune di queste vie sono state riassunte in questa figura.

<p>From gut microbiota to brain:</p> <ul style="list-style-type: none"> Production, expression and turnover of neurotransmitters (i.e. serotonin, GABA) and neurotrophic factor (BDNF) Protection of intestinal barrier and tight junction integrity Modulation of enteric sensory afferents Bacterial metabolites Mucosal immune regulation
<p>From brain to gut microbiota:</p> <ul style="list-style-type: none"> Alteration in mucus and biofilm production Alteration in motility Alteration of intestinal permeability Alteration in immune function

Figura 6. Principali meccanismi bidirezionali nel Brain-Gut-Microbiota Axis.

1.4 IL MICROBIOTA INTESTINALE NELLE PATOLOGIE

IL RUOLO DEL MICROBIOTA INTESTINALE NELLE PATOLOGIE DIGESTIVE ED EXTRADIGESTIVE.

Il microbiota intestinale interagisce con l'ospite umano in un rapporto mutualistico. L'intestino dell'ospite fornisce ai batteri ricche risorse energetiche e un ambiente anaerobico, protetto in cui crescere e il microbiota partecipa alla regolazione dell'omeostasi all'interno dell'ospite, è legato al benessere dell'umore, del metabolismo, e del tratto gastrointestinale. Pertanto, è ragionevole che la mancanza di una sana flora intestinale può anche portare ad un deterioramento di queste relazioni e, infine, alla malattia. In effetti, una disfunzione del BGA è stata chiarita da una moltitudine di studi legati a disturbi gastrointestinali, neuropsicologici e metabolici.⁴²

Il microbioma intestinale comprende il genoma collettivo delle migliaia di miliardi di microrganismi residenti nel nostro ecosistema gastrointestinale. L'interazione tra l'ospite e il suo microbioma intestinale è un rapporto complesso, la cui manipolazione potrebbe rivelarsi fondamentale per prevenire o trattare non solo i vari disturbi intestinali, come l'IBS e la colite ulcerosa (UC), ma addirittura anche i disturbi del SNC, come il morbo di Alzheimer (AD) e di Parkinson (PD).

La disbiosi del microbiota intestinale è stata implicata in numerosi disturbi, che vanno da malattie intestinali, come il cancro del colon-retto e le malattie infiammatorie intestinali (IBD), a malattie più sistemiche come il diabete, sindrome metabolica, artrite e atopia (Walker e Lawley, 2013⁸⁶). Il microbiota intestinale ha anche influenze varie sulle complicazioni correlate al diabete di tipo 2 (T2D) tra cui la retinopatia diabetica, tossicità renale, aterosclerosi, ipertensione e ulcere del piede diabetico.⁵⁰

Negli ultimi dieci anni l'importanza del microbiota intestinale nell'**IBS** ha attirato una maggiore attenzione. Una crescente evidenza suggerisce che almeno in sottogruppi di pazienti con IBS vi è un'alterata composizione del microbiota intestinale o disbiosi. Presentandosi come un equilibrio alterato tra specie batteriche benefiche o patogene, si pensa che la disbiosi abbia un impatto maggiore sul benessere intestinale nei pazienti con IBS di quanto si pensasse.⁴²

L'IBS è il disturbo gastrointestinale più strettamente legato ad un alterato microbiota intestinale.²⁸

Oggi l'IBS è considerato un disturbo del brain-gut-microbiota axis. Pertanto l'uso di metodi terapeutici che interagiscono con il microbiota continuano ad essere un'opzione interessante nell'IBS sia per aumentare l'efficacia nell'ostacolare la crescita di specie indesiderate, che promuovendo batteri benefici. Una migliore comprensione del ruolo del microbiota nell'IBS può guidare le future strategie terapeutiche, con particolare attenzione alla modulazione della composizione del microbiota intestinale.⁴²

L'IBS Postinfettiva (PI-IBS) è probabilmente la più forte prova che il microbiota possa essere importante per lo sviluppo di IBS, e si può presentare dopo un attacco di gastroenterite causata da infezioni virali, parassitarie o batteriche. Patogeni enterici come lo *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, e le specie *Campylobacter* sono potenziali responsabili di PI-IBS, e potrebbero aumentare il rischio di sviluppare PI-IBS di almeno sei volte. Altre variabili quali la gravità e la durata dell'infezione iniziale, così come l'età e il sesso, sono fattori di rischio aggiuntivi per lo sviluppo di PI-IBS, con un rischio per lo sviluppo di tale patologia più alto tra le giovani femmine.⁴²

In particolare, un aumento dei Firmicutes associato e un impoverimento dei Bacteroidetes meglio caratterizzavano i soggetti IBS rispetto alla popolazione normale. Allo stesso modo, uno studio che analizza le colture batteriche di 320 soggetti ha trovato un legame diretto tra IBS e una crescita eccessiva del microbiota. Lo studio ha trovato che di quei pazienti con IBS, il 37,5% era positivo per SIBO, rispetto a meno del 10% in assenza IBS. Inoltre, questo eccesso di batteri nel piccolo intestino era presente con maggiore frequenza nei pazienti con IBS-D grave.

La SIBO è una malattia causata da un aumento del numero e delle specie di batteri nel piccolo intestino. Sebbene la prevalenza di SIBO è sconosciuta, si pensa sia sostanzialmente sottodiagnosticata. Ciò è dovuto al fatto che l'eziologia della SIBO rimane poco chiara e ai sintomi clinici variano notevolmente, da casi asintomatici a casi con molti sintomi non specifici come gonfiore, meteorismo, dolori addominali e diarrea, molti dei quali si sovrappongono con i sintomi di IBS. Nei casi più gravi, i sintomi possono includere anche il malassorbimento, che porta alla perdita di peso e a carenze nutrizionali, lesioni epatiche, e manifestazioni cutanee, come la rosacea.²⁸

In un individuo sano l'intestino tenue contiene una minore densità dei batteri rispetto all'intestino crasso. La SIBO è definita come una densità batterica $\geq 10^5$ unità formanti colonie (cfu) per ml di fluido intestinale, misurati col metodo "gold standard" di coltura da fluidi di

derivazione digiunale. La SIBO è, tuttavia, spesso diagnosticata attraverso le tecniche coltura-indipendenti, e meno invasive, come il breath test al lattulosio o glucosio.

Uno studio di metanalisi di Ford et al.⁸⁷ ha concluso che, sebbene la SIBO sia stata osservata in pazienti con IBS ad un tasso superiore rispetto ai controlli, la prevalenza con cui questo si è verificato, varia sensibilmente tra gli studi e i centri. A causa di tale discrepanza, la vera influenza della SIBO per quanto riguarda la genesi dei sintomi IBS, è ancora non definita.⁴⁴

La **colite ulcerosa** (UC) è un tipo di IBD caratterizzata da infiammazione cronica e lesioni ulcerose, lungo il rivestimento dell'intestino crasso e del retto.

UC deriva da una combinazione di fattori di rischio genetici dell'ospite, l'ambiente, e alterazioni nella composizione del microbiota intestinale. La disbiosi del microbiota intestinale nei pazienti con UC è caratterizzata da una percentuale inferiore di Firmicutes e una maggiore percentuale di Gammaproteobacteria, i solfato-riduttori Deltaproteobacteria, Actinobacteria e Proteobacteria rispetto a quella degli ospiti sani (Lepage, et al, 2011⁸⁸; Sokol, Lepage, Seksik, Dore, e Marteau, 2007⁸⁹; Sokol, et al. 2009⁹⁰). In generale, le popolazioni dei batteri Gram-negativi tendono ad aumentare, mentre quelli dei batteri Gram-positivi tendono a diminuire. Incrementi dei batteri Gram negativi come E. coli possono comportare un aumento della traslocazione di LPS nell'intestino e conseguentemente uno stato cronico d'infiammazione di basso grado, come visto in UC.

Oltre alla UC, la disbiosi del microbioma intestinale si verifica anche in altre forme di IBD, dove causa grandi cambiamenti nella funzione metabolica del microbiota intestinale e nella relazione del microbiota con il SI. Non sono pienamente compresi né la misura con la quale la disbiosi altera la funzione del microbioma intestinale, né le conseguenze specifiche di tali cambiamenti della composizione del microbioma, ed entrambi richiedono ulteriori studi metabolici e genetici.

Il butirrato derivato dai microbi può scatenare l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi delle cellule epiteliali del colon, che normalmente hanno un'alta frequenza di replicazione e, quindi, si è dimostrato che una probiosi a favore di specie batteriche produttrici di butirrato è efficace nel prevenire il **cancro del colon** (Rooks e Garrett, 2011⁹¹; Shenderov, 2012⁹²; Waby, et al., 2010⁹³).

La ricerca sul ruolo del microbiota intestinale umano nella genesi e/o mantenimento dei disturbi psichiatrici è solo agli albori, ma appare come uno dei filoni più promettenti nella ricerca in psichiatria.³⁷

È interessante notare che, in un recente studio, la somministrazione di prebiotici a volontari sani ha determinato livelli di cortisolo più bassi al risveglio e una migliore attenzione agli stimoli positivi rispetto agli stimoli negativi nella funzione di categorizzazione emozionale e nella funzione di riconoscimento emotivo. Nel complesso, questi studi in soggetti sani forniscono una chiara evidenza di un legame tra il microbiota e l'elaborazione emotiva. Anche se la **depressione** è un complesso disturbo dell'umore cronico associato a molti fattori che influenzano la sua eziologia, tra cui la genetica e l'ambiente, è stato recentemente collegato ad alterazioni del microbiota intestinale. Il risultato che risalta nei pazienti con diagnosi di depressione era una sottorappresentazione generale dei Bacteroidetes. Più in particolare, Alistipes, un genere nel phylum di Bacteroidetes era sovrarappresentato nei pazienti depressi. È interessante notare che, è stato riportato in topi Balb/C, dopo un periodo di stress, un rilevante aumento di Alistipes, che è anche sovrarappresentato nella sindrome da stanchezza cronica e in IBS, suggerendo una possibile caratteristica comune a diversi disturbi che hanno l'ansia e la depressione come comorbidità. È stato suggerito che gli Alistipes, in particolare, sono associati con l'infiammazione e quindi potenzialmente legati alla depressione attraverso pathways infiammatori. Da notare che i livelli Alistipes e altri componenti del microbiota intestinale possono essere modificati attraverso l'intervento dietetico, che può rivelarsi un intervento autorevole per i disturbi depressivi.

Disturbi d'ansia e dell'umore sono spesso comorbidità di altre condizioni mediche e in diversi studi che esaminano l'ansia come comorbidità, si è osservato un legame tra il microbiota e i sintomi psicologici.⁴² Vi è una crescente evidenza che i probiotici possano essere utili per ridurre i sintomi depressivi e d'ansia. Ad esempio, è stato trovato, in uno studio clinico a doppio cieco, randomizzato, che i soggetti sani a cui veniva somministrata una miscela di probiotici, contenenti *L. helveticus* e *B. longum* per 30 giorni, hanno mostrato molto meno disagio psicologico, come misurato da vari questionari, rispetto alle loro controparti di controllo abbinate al placebo. Allo stesso modo, un altro studio a doppio cieco, controllato con placebo, ha dimostrato che i soggetti depressi hanno mostrato un miglioramento significativo, dopo aver assunto una bevanda al latte contenente probiotici per 3 settimane, rispetto alle loro controparti di controllo con placebo.²⁸

L'ansia e depressione sono molto frequenti negli individui con IBS. Nei pazienti con IBS e con ansia clinicamente significativa, il trattamento giornaliero per 4 settimane con prebiotici,

una miscela di galacto-oligosaccaridi, ha ridotto i punteggi d'ansia e ha avuto un significativo impatto positivo sulla qualità della vita. In uno studio, un più alto rapporto Firmicutes:Bacteroides nei pazienti con IBS è stato correlato con la depressione e l'ansia clinicamente significativa. In senso più generale, i punteggi d'ansia più elevati nei pazienti IBS e nei controlli sani sono stati associati con una diversità microbica fecale inferiore, sostenendo un legame tra il microbiota e lo stato psicologico.

L'**encefalopatia porto-sistemica** (PSE), nota anche come encefalopatia epatica, è una sindrome neuropsichiatrica associata ad alterata flora intestinale. I sintomi includono un livello fluttuante di coscienza, confusione, e la progressione a coma. Nei casi più gravi, può anche portare a morte. La PSE si presenta a causa di problemi epatocellulari o shunt porto-sistemici venosi ed è dovuta ad un accumulo di tossine nel sangue derivate dall'intestino, che normalmente vengono rimosse dal fegato. Entrambe queste cause permettono a ipotizzate tossine contenenti azoto come l'ammoniaca (che si ritiene essere generata dai batteri intestinali dal cibo) di entrare nel flusso sanguigno e attraversare la barriera ematoencefalica. Quando queste tossine arrivano al cervello, tuttavia, possono causare i sintomi precedentemente menzionati con riferimento alla PSE. Gli effetti della PSE sono reversibili con trattamenti che funzionano sopprimendo la produzione di sostanze tossiche nell'intestino, e attualmente, la maggioranza di queste opzioni terapeutiche in uso sono i prebiotici, lassativi e antibiotici.⁴²

Come detto nel capitolo precedente, la colonizzazione precoce dei batteri intestinali regola lo sviluppo dell'asse HPA. La colonizzazione con batteri commensali che sono noti per la produzione di micronutrienti pro-salute è essenziale, dato che il neurosviluppo è compromesso se i batteri patogeni colonizzano il tratto gastrointestinale.

Gli studi hanno dimostrato che i problemi intestinali nella prima infanzia possono contribuire allo sviluppo di autismo. I vari disturbi, come **Attention Deficit Hyperactive Disorder (ADHD)** e **Autism Spectrum Disorder (ASD)** condividono anomalie comportamentali nella socialità, comunicazione e/o attività compulsive (Hsiao, et al. 2013⁹⁴). Sono stati implicati in questi disturbi una risposta anormale del HPA e profili microbici e metabolici alterati (Kaneko, Hoshino, Hashimoto, Okano, e Kumashiro, 1993⁹⁵; King, Barkley, e Barrett, 1998⁹⁶; Ming, Stein, Barnes, Rodi, e Guo, 2012⁹⁷). Un sottogruppo di bambini ASD con una storia di perturbazioni gastrointestinali ha avuto un alterato profilo microbico rispetto ai controlli. Essi di solito hanno una maggiore abbondanza di Proteobacteria e Bacteroidetes e

una minore abbondanza dei Firmicutes e Bifidobatteri, rispetto ai controlli sani (Finegold, et al, 2010⁹⁸; Finegold, Downes, e Summanen, 2012⁹⁹; Mezzelani, et al, 2014¹⁰⁰).

È interessante notare che, delle molte classi di batteri che costituiscono il Firmicutes, una classe in particolare, i Clostridi, si è dimostrata essere presente in un numero maggiore di bambini autistici con una storia di problemi gastrointestinali (Song, Liu, e Finegold, 2004¹⁰¹). Analogamente, nonostante l'abbondanza complessiva di Bacteroidetes nei soggetti autistici, sono stati visti numeri più bassi di Prevotella. Così, quantificare il relativo aumento o la diminuzione delle popolazioni di alcuni phyla, è necessario per determinare le popolazioni di specifici simbionti intestinali al fine di comprendere il significato di certi cambiamenti fisiologici nell'intestino e/o nel cervello. Uno dei motivi per cui i Clostridi sono implicati in ASD è che i bambini autistici sottoposti al trattamento per via orale con Vancomicina hanno mostrato una regressione dei sintomi caratteristici di questo disturbo. La Vancomicina non viene assorbita nell'intestino, ma può facilmente uccidere i batteri Gram positivi, come i Clostridi. Tuttavia, quando il trattamento è stato interrotto, i pazienti sono tornati di nuovo al loro comportamento autistico (Finegold, 2008¹⁰²).

Infatti, secondo una teoria corrente, la "leakygut" syndrome, la sindrome di "permeabilità intestinale", l'alta conta dei batteri patogeni nell'intestino compromette la barriera intestinale producendo neuro e endotossine, che poi espone la mucosa e la sottomucosa ai batteri.

L'invasione batterica di questo ambiente in precedenza asettico provoca l'infiltrazione e l'attivazione delle cellule immunitarie, così come la sovraregolazione di citochine proinfiammatorie, quali TNF α e IL-1 β . Questa risposta infiammatoria aumenta ulteriormente la permeabilità della barriera, perpetuando in tal modo un ciclo infiammatorio. Sandler et al. (2000¹⁰³) ha ipotizzato che in un sottogruppo di bambini, la distruzione della flora intestinale indigena potrebbe promuovere la colonizzazione di uno o più batteri produttori di neurotossine, contribuendo, almeno in parte, a suscitare i segni autistici. Questi stessi ricercatori hanno scoperto che con l'esposizione agli antibiotici ad ampio spettro, che portavano a diarrea cronica persistente, le competenze precedentemente acquisite si deterioravano e emergevano i tratti autistici (Sandler, et al. 2000¹⁰³).

Oltre ad ASD, c'è stato un considerevole interesse per la comprensione del ruolo che il microbiota intestinale gioca nello sviluppo di ADHD e la schizofrenia. In uno studio, ai neonati è stato somministrato o il probiotico *Lactobacillus rhamnosus* GG, o placebo durante i primi 6 mesi di vita e successivamente il microbiota intestinale è stato valutato su un periodo di 13 anni. Lo studio ha trovato una correlazione tra la minore conta di specie

Bifidobacterium e lo sviluppo di ADHD o della sindrome di Asperger (Partty, Kalliomäki, Wacklin, Salminen, e Isolauri, 2015¹⁰⁴).

Recenti ricerche hanno anche legato la disbiosi microbica ai disturbi neurologici, come il **Parkinson (PD)**, il **morbo di Alzheimer (AD)** e la **sclerosi multipla**.

Villarane et al. hanno riportato che l'infiammazione periferica, sotto forma di colite indotta da solfato di sodio destrano (DSS), può aggravare la neuroinfiammazione LPS-indotta e la neurodegenerazione (Villaran, et al., 2010¹⁰⁵) come indicato da un aumento di mRNA trascritti per TNF- α , iNOS e IL-6 nel mesencefalo.

Il ruolo del microbiota intestinale nella patogenesi di disturbi neurodegenerativi cronici come AD e PD sta cominciando ad emergere. Nel PD, la disregolazione gastrointestinale è spesso osservata diversi anni prima che la malattia sia ancora rilevata. Braak e al.¹⁰⁶ hanno ipotizzato che la malattia inizi nell'intestino e, successivamente, si diffonda dall'intestino al cervello, attraverso il BGA, per esempio, tramite il nervo vago e il midollo spinale. Infatti, le fibre parasimpatiche del nervo vago che innervano l'intestino, tra le altre regioni, nascono dal nucleo motore dorsale (DMVX). I corpi di Lewy (aggregati proteici, principalmente di alfa-sinucleina e ubiquitina), che sono il segno distintivo del PD, sono stati trovati nel SNE post-mortem nei casi di PD precoce (Braak, de Vos, Bohl, e Del Tredici, 2006¹⁰⁶). La presenza dei corpi di Lewy correla con l'avanzamento delle fasi di progressione del PD ed erano stati successivamente trovati nel midollo spinale, DMVX, corteccia prefrontale e, infine, nel mesencefalo di soggetti PD post-mortem. Un recente studio ha dimostrato che l'alfa-sinucleina iniettata nella parete intestinale dei ratti migrava al tronco cerebrale attraverso il nervo vago a una velocità stimata di 5-10mm/die (Holmqvist, et al. 2014¹⁰⁷). È stata suggerita da qualche tempo l'idea che i pazienti PD abbiano un'infiammazione di basso grado dell'intestino. Infatti, l'aumento dell'espressione di mRNA di citochine proinfiammatorie è stata osservata in biopsie del colon provenienti da pazienti parkinsoniani, rispetto a quelle dei soggetti di controllo (Devos, et al. 2013¹⁰⁸). Questa infiammazione cronica di basso grado potrebbe essere il fattore scatenante che porta alla lassià della barriera ematoencefalica, all'infiltrazione e all'attivazione delle cellule immunitarie e infine alla neuro-infiammazione nel SNC, ipotizzando che questo meccanismo sia potenzialmente coinvolto nelle malattie neurodegenerative.

In uno studio, il microbiota fecale raccolto da 72 soggetti con PD e controlli, associati per età, hanno mostrato elevati conteggi di Enterobacteriaceae e ridotti di Prevotellaceae nei pazienti con PD. Prevotella è nota per degradare i carboidrati complessi, fornendo SCFA nonché

tiamina e folati come sottoprodotti che promuovono un ambiente intestinale sano. Ridotti numeri di Prevotella sembrano portare a una ridotta produzione di questi importanti micronutrienti. A meno che non compensati da cambiamenti nella dieta che forniscano questi nutrienti in modo esogeno, la diminuzione di tiamina e folati potrebbe comportare una ridotta produzione di vitamine essenziali e problemi nella secrezione di ormoni intestinali (Scheperjans, et al.2015¹⁰⁹).

È stato ipotizzato che i cianobatteri, i quali sono presenti in piccoli numeri nel tratto gastrointestinale, producano β -N-metilammino-L-alanina (BMAA), che è elevata nel cervello dei pazienti con **sclerosi laterale amiotrofica** (SLA), AD, PD. La BMAA è un'eccitotossina che attiva il recettore metabotropico 5 del glutammato, inducendo in tal modo la deplezione del principale antiossidante, il glutatione. Come risultato, i neuroni e le cellule gliali non sono in grado di controllare efficacemente la produzione di ROS e di RNS nel cervello. La proteina BMAA è anche implicata nel favorire il misfolding proteico e l'aggregazione proteica tipicamente osservata in AD, PD e SLA (Brenner, 2013¹¹⁰). Tuttavia, se i pazienti che mostrano elevati livelli di BMAA nel loro cervello, mostrano anche un aumento delle popolazioni di cianobatteri nell'intestino non è chiaro e necessita di ulteriori studi.⁵⁰

Il **diabete mellito di tipo 2** (T2D) è una malattia metabolica cronica in cui il corpo o non produce abbastanza insulina o non può metabolizzare il glucosio in modo efficace, nonostante la produzione di insulina. Valutando il microbioma intestinale di individui sani e di pazienti con T2D si è dimostrato che i Betaproteobacteria erano presenti in proporzioni più elevate nei soggetti T2D (Larsen, et al. 2010¹¹¹). Questa differenza correla con un aumento dei livelli plasmatici di glucosio rispetto agli indici di massa corporea (BMI), suggerendo che questa specie potrebbe essere coinvolta nel metabolismo del glucosio (Larsen, et al.2010¹¹¹).

Recenti ricerche suggeriscono che l'alterazione del microbiota intestinale in topi alimentati con una dieta ricca di grassi (HFD) favorisce Akkermansia muciniphila, un batterio mucino-degradante recentemente scoperto, che può contribuire agli effetti anti-diabetici di metformina (N. R. Shin, et al. 2014¹¹²).

Infatti, il trattamento con A. muciniphila può invertire i disturbi metabolici HFD indotti come l'infiammazione del tessuto adiposo, aumento di peso, e insulino-resistenza (Everard, et al. 2013¹¹³). La metformina colpisce anche i livelli di metionina e acido folico dell'ospite, due sostanze nutritive essenziali per la salute umana che noi non produciamo de novo, ma che invece sono sintetizzati da alcuni microbi intestinali. I folati sono vitamine B coinvolti nella biosintesi delle purine e pirimidine, così come nella biotrasformazione degli aminoacidi

all'interno dell'ospite. È interessante notare che, carenze della vitamina B12 e acido folico in particolare, sono stati implicati in pazienti con malattia di Alzheimer (Lahiri e Maloney, 2010¹¹⁴). La metionina è un amminoacido contenente zolfo che si presenta in proteine con proposta attività antiossidante (Levine, Mosoni, Berlett, e Stadtman, 1996¹¹⁵). I folati e la metionina sono solo due esempi di possibili sottoprodotti intestinali che influenzano sia il metabolismo batterico che quello dell'ospite, ma che potrebbero anche essere coinvolte nello sviluppo di malattie del SNC.

Diversi studi, su animali e clinici, hanno dimostrato negli ultimi dieci anni che le alterazioni nella flora intestinale possono contribuire allo sviluppo dell'**obesità**. Sono state riportate differenze nella diversità e nella composizione del microbiota in individui obesi. C'è un'ipotesi emergente che la flora intestinale sia un modulatore per il genotipo obeso, per mezzo di un aumento del rapporto Firmicutes / Bacteroidetes (F: B). A supporto di questa ipotesi, uno studio ha confrontato l'apporto dietetico, le concentrazioni di SCFA fecali e i profili microbici intestinali in 52 partecipanti magri (BMI<25) e 42 partecipanti in sovrappeso o obesi (BMI>25), trovando una relazione positiva tra la combinazione del rapporto dei ceppi (F: B) e SCFA con i propri BMI. Questi risultati sono stati riprodotti in uno studio separato che ha registrato gli SCFA fecali e i rapporti F:B in 11 individui magri e 11 individui in sovrappeso o obesi. Allo stesso modo si è riscontrato che gli individui in sovrappeso o obesi avevano una maggiore abbondanza relativa di Firmicutes, un più alto rapporto F:B, e un aumento dei SCFA fecali. Questi risultati sono coerenti con l'ipotesi che gli individui in sovrappeso o obesi producono più SCFA nel colon rispetto agli individui magri a causa delle differenze del microbiota del colon.

Ci sono diversi possibili meccanismi legati al modo in cui la flora intestinale possa influenzare il metabolismo, ad esempio attraverso la regolazione degli ormoni gastrointestinali, la produzione di vitamine, partecipazione nella degradazione e la digestione delle sostanze nutritive, e il deposito di grasso, che portano tutte alla maggiore efficienza d'estrazione calorica dagli alimenti. In particolare, si suggerisce che i Firmicutes, i cui numeri sono stati trovati essere aumentati nei soggetti obesi, esprimono geni che codificano enzimi che degradano i polisaccaridi alimentari altrimenti indigeribili per l'ospite, aumentando così la capacità dell'ospite di estrarre più energia. Gli SCFA sono suggeriti come mediatori di questa epidemia di obesità, dato che un alto rapporto F:B porta alla produzione di un eccesso di SCFA, con conseguente aumento della disponibilità di energia nel colon, contribuendo all'aumento del peso complessivo. Con maggiore interesse in questo campo, vi è un numero

crescente di studi e teorie dedicate al meccanismo specifico mediante il quale la flora intestinale possa contribuire al peso.⁴²

La modulazione della flora intestinale nei soggetti in sovrappeso o obesi è un concetto attraente come un modo per combattere l'obesità, i disordini relativi e può essere ottenuta con vari metodi tra cui i probiotici, antibiotici e il trapianto fecale di microbiota.

Tra i topi con obesità dieta-indotta, quelli che sono stati trattati con i probiotici *L. curvatus* e *L. plantarum* hanno mostrato un aumento di peso ridotto, così come una diminuita espressione dei geni proinfiammatori nel tessuto adiposo.

Antibiotici come la vancomicina si sono dimostrati efficaci. Una volta somministrata nei topi, ha notevolmente ridotto le proporzioni di Firmicutes e Bacteroidetes e ha aumentato i Proteobacteria, con una conseguente riduzione della tendenza all'aumento di peso, una migliorata glicemia a digiuno e migliorati livelli di trigliceridi.

Anche i trapianti di flora intestinale possono rivelarsi efficaci; in un piccolo studio il trapianto di microbiota proveniente da donatori magri ai pazienti con sindrome metabolica hanno aumentato la loro sensibilità insulinica quando misurata a 6 settimane dopo il trapianto, aiutando nella perdita di peso.²⁸

Uno dei principali ostacoli in questo settore è la mancanza di un sistema di modello animale che replica con successo un microbioma intestinale sano o malato di un individuo. Dal momento che la dieta dei roditori differisce sostanzialmente dalla dieta degli esseri umani, rende gli studi di confronto tra il microbiota intestinale umano e quello dei roditori intrinsecamente problematici (Flint, 2011¹¹⁶; Ravussin, et al, 2012¹¹⁷). Mentre gli studi sono stati fatti usando topi convenzionali come organismi modello, in alcuni casi, le alterazioni viste nella popolazione batterica intestinale nei topi non sono convalidati dai dati umani. Per esempio, batteri come *Prevotella* e *Ruminococcus* sono dominanti nell'intestino umano, ma sono sottorappresentate nell'intestino dei topi.⁵⁰

Considerando la complessa e dinamica natura della popolazione microbica e il suo effetto sulla persona, deve essere ricercata la collaborazione tra i campi di microbiologia, neurobiologia, biochimica, immunologia, gastroenterologia, genetica, epidemiologia, farmacologia, e tossicologia per ottenere una migliore comprensione di questo importante rapporto ospite-batteri.⁵⁰

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il presente studio è stato condotto presso la U.O. di Gastroenterologia Universitaria dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana in collaborazione con l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa e con il Dipartimento DeFENS dell'Università degli Studi di Milano.

Scopo dello studio è stato quello di verificare in pazienti affetti da IBS se:

- la somministrazione di un probiotico (*Lactobacillus casei DG**; Enterolactis Plus®) fosse in grado di modificare significativamente la composizione del microbiota intestinale;
- la somministrazione di un probiotico (*Lactobacillus casei DG*; Enterolactis Plus®) fosse in grado di modificare la sintomatologia IBS correlata;
- esistesse una possibile relazione tra la modificazione del microbiota intestinale ed eventuali cambiamenti a carico della sfera emotiva, affettiva e cognitiva.

** Microrganismo depositato presso il "Pasteur Institute" di Parigi, deposit number n° I-1572CNM*

3. MATERIALI E METODI

PROCEDURA SPERIMENTALE

Il presente studio pilota, randomizzato, controllato, in doppio cieco, con cross-over prevedeva la somministrazione a pazienti affetti da IBS di *Lactobacillus casei* DG (Enterolactis plus®) o di placebo ed aveva la durata totale di 18 settimane. Nella figura 7 è riportato lo schema del protocollo che prevedeva 2 settimane di *run in*, 4 settimane di trattamento con farmaco o placebo, 4 settimane di *wash-out*, 4 settimane di secondo periodo *cross-over* e 4 settimane di *follow up*:

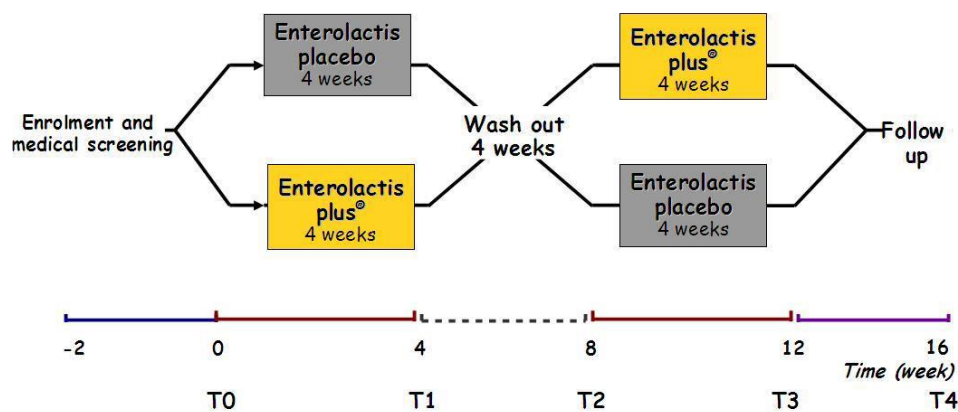


Figura 7.

- T0: *run in*
- T1: 1° trattamento (somministrazione o placebo o probiotico)
- T2: *wash-out*
- T3: 2° trattamento (somministrazione o placebo o probiotico)
- T4: *follow up*

Al T0 si eseguiva un'anamnesi clinica del paziente (conferma della diagnosi di IBS in base ai criteri di Roma III, valutazione del dolore addominale, classificazione diagnostica delle feci mediante la scala Bristol, valutazione dello stile di vita e delle abitudini alimentari, valutazione dei parametri biochimici di riferimento, pressione arteriosa, frequenza cardiaca, frequenza respiratoria).

Dopo il periodo di *run in*, a partire dal T1, veniva raccolto un campione di feci ad ogni visita. Tali campioni venivano conservati in provette sterili e in frigorifero a -80°C e successivamente sono stati utilizzati per l'analisi metagenomica del microbiota intestinale.

Inoltre i pazienti arruolati in questo studio, a partire dal periodo di *run in* e dopo aver rilasciato il consenso informato, sono stati istruiti all'adeguata auto-somministrazione del farmaco (Enterolactis plus®, una capsula apporta non meno di 24 miliardi di cellule vive di *Lactobacillus casei* DG) *due* volte al giorno prima dei pasti, attenendosi a adeguate regole dietetiche, in modo tale che l'assunzione di cibo (vedi Appendice, tavola 14) non potesse alterare i risultati.

Il paziente era poi invitato a compilare un apposito diario in cui raccoglieva *giornalmente*, per l'intera durata del relativo periodo dello studio il numero di evacuazioni, caratteristiche delle feci secondo la scala *Bristol Stool Chart*¹¹⁸, dolore addominale secondo la *Numerical Rating Scale*¹¹⁹ e l'eventuale assunzione di farmaci. Inoltre, *ogni settimana* il paziente era tenuto a indicizzare il grado di sollievo della sintomatologia di IBS rispetto al proprio valore di partenza (*Symptom Relief Scale*).

Inoltre, a tutti i soggetti inseriti nello studio sono stati somministrati alcuni test psicometrici durante un'intervista semi-strutturata, per la valutazione della sfera affettiva (*Profile of Mood State*¹²⁰, *State-Trait Anxiety Inventory*^{121, 122}, *Self Rating Anxiety Scale*¹²³, *Hospital Anxiety and Depression Scale*¹²⁴), del sonno (*Pittsburgh Sleep Quality Index*¹²⁵, *Insomnia Severity Index*¹²⁶, *Epworth Sleepiness Scale*¹²⁷, *Ford Insomnia Response to stress*¹²⁸), dello stress (*Perceived Stress Scale*^{129, 130}), della qualità di vita (*Psychological General Well Being Index*¹³¹, *Short Form-12*¹³²) e delle funzioni neurocognitive (*Trail Making Test A e B*¹³³).

Inoltre è stata condotta un'analisi dei comportamenti non verbali esibiti durante un'ulteriore intervista semi-strutturata della durata di 5 minuti, in cui i soggetti erano chiamati a rispondere a domande inerenti la propria personalità in un contesto sociale (*Ethological Coding System For Interview*^{134, 135, 136, 137}).

Criteri in inclusione

- Età ≥ 18 anni e ≤ 65 anni;
- Diagnosi di IBS secondo i criteri di Roma III;
- Esito negativo del Rx clisma opaco dc o Colonscopia virtuale o colonscopia sinistra nei due anni precedenti;
- Capacità di conformarsi al protocollo di studio.

Criteria di esclusione

- Malattie organiche intestinali;
- Presenza di qualsiasi rilevante patologia organica, sistemica o metabolica (in particolare significativa storia di patologie cardiache, renali, neurologiche, psichiatriche, oncologiche, endocrinologiche, metaboliche o epatiche) o valori di laboratori anormali ritenuti clinicamente significativi sulla base di valori predefiniti;
- Neoplasie maligne di qualsiasi tipo, sia in corso che in anamnesi patologica remota;
- Pregressi interventi di chirurgia addominale maggiore;
- Intolleranze alimentari, accertato o sospetto di intolleranza al lattosio, come definito dalla valutazione anamnestica o dal breath test al lattosio;
- Assunzione di probiotici o antibiotici durante l'ultimo mese;
- Sistemica/frequente assunzione di lassativi di contatto;
- Donne in gravidanza;
- Storia recente o sospetto di abuso di alcool o droga;
- Trattamento con qualsiasi farmaco sperimentale nei 30 giorni precedenti.

VALUTAZIONE DELLA SINTOMATOLOGIA IBS

- *Scala numerica per la valutazione del dolore (NRS)*: Tra le scale per la misurazione dell'intensità del dolore acuto, la Numerical Rating Scale, NRS, si basa sull'utilizzo di una scala costituita da 11 gradi (0-10) e si identifica lo 0 come totale assenza di dolore e 10 come il peggior dolore immaginabile dal paziente. Si chiede quindi al paziente di assegnare al suo dolore un punteggio di intensità che vada da 0 a 10.



Figura 8. Numerical Rating Scale (NRS)

- *Bristol Stool Chart*: La scala è uno strumento usato sia in ambito clinico che sperimentale, per classificare in 7 categorie le feci in base alla forma e alla consistenza. I Tipi 1 e 2 sono espressione di stipsi; i Tipi 3 e 4 rappresentano la forma/consistenza ideale, in particolare il tipo 4, in quanto sono i più facili da defecare. I Tipi 5 e 6 sono progressivamente tendenti alla diarrea, che è manifesta nel Tipo 7.

Bristol Stool Chart	
Tipo 1	 <p>Grumi duri separati tra loro, come noci (difficili da espellere)</p>
Tipo 2	 <p>A forma di salsiccia, ma formata da grumi uniti tra loro</p>
Tipo 3	 <p>Come un salame, ma con crepe sulla sua superficie</p>
Tipo 4	 <p>Come una salsiccia o un serpente, liscia e morbida</p>
Tipo 5	 <p>Pezzi separati morbidi con bordi come tagliati/spezzati; chiara (facile da evacuare)</p>
Tipo 6	 <p>Pezzi soffici/flocculari con bordi frastagliati, feci pastose</p>
Tipo 7	 <p>Acquosa, nessun pezzo solido Completamente liquida</p>

Figura 9. Bristol Stool Chart

- *Symptom Relief Scale*: associa un numero da 1 a 7 al grado di sollievo della sintomatologia addominale rispetto al proprio basale. (vedi Appendice, Tavola 16)

1= *sollievo completo*;

2= *sollievo consistente*;

3= *leggero sollievo*;

4= *sintomatologia inalterata*;

5= *leggero peggioramento sintomatologia*;

6= *consistente peggioramento sintomatologia*;

7= *totale peggioramento sintomatologia (non potrebbe andare peggio)*.

VALUTAZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE

I campioni fecali sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'isolamento del DNA metagenomico attraverso un protocollo che prevedeva l'omogeneizzazione del campione, la rottura delle cellule microbiche con sfere di vetro in bead-beater, e la purificazione in colonnine con membrana di silice. La quantità e la qualità del DNA estratto sono state poi stabilite allo spettrofotometro. Il DNA metagenomico così preparato è stato quindi sottoposto ad analisi 16S rRNA gene profiling, che prevede il sequenziamento di decine di migliaia di frammenti di DNA corrispondenti a una regione interna del gene batterico 16S rRNA amplificata via reazione a catena della polimerasi (PCR).¹³⁸

Nello specifico, i dati sperimentali di partenza sono stati rappresentati da dati grezzi di sequenziamento provenienti da prove di 16S rRNA gene profiling condotte sul DNA metagenomico di campioni fecali umani. Questi dati sono stati processati attraverso le pipeline bioinformatiche QIIME¹³⁹ e MOTHUR¹⁴⁰ al fine di ottenere la composizione batterica in termini di abbondanza relativa dei gruppi tassonomici fino al livello di specie. I dati di ecologia microbica ottenuti sono stati poi analizzati al fine di stabilirne la diversità intra-campione (diversità alpha) e inter-campione (diversità beta).

Le analisi per l'identificazione del microbiota intestinale sono state svolte presso l'Università degli Studi di Milano, Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), Division of Food Microbiology and Bioprocessing, Milano.

VALUTAZIONE PSICOLOGICA MEDIANTE TEST PSICOMETRICI

(I testi completi dei questionari somministrati sono riportati in Appendice)

• Valutazione della qualità del sonno

- *Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)*: è un questionario self-rated che valuta la qualità e i disturbi del sonno nell'arco del mese precedente (Buysse et al., 1988¹²⁵). I fini di questo test sono: acquisire una misurazione valida e standardizzata della qualità del sonno; discriminare tra “buoni” e “cattivi” dormitori; introdurre un test facile da usare per i soggetti e facile da

interpretare per clinici e ricercatori; introdurre un breve e clinicamente utile accertamento della varietà dei disturbi che possono danneggiare la qualità del sonno.

Il test PSQI si è inoltre dimostrato efficace nell'esaminare le correlazioni tra la qualità del sonno e la gravità dei sintomi gastroenterologici in IBS.¹⁴¹

La scala è composta da 19 item raggruppati in 7 fattori: 1) qualità oggettiva del sonno, 2) latenza del sonno, 3) durata del sonno, 4) efficacia abituale del sonno, 5) disturbi del sonno 6) uso di farmaci ipnotici 7) disturbi durante il giorno.

Gli item sono valutati su una scala da 0 a 3 e sommati danno il punteggio globale del PSQI, che può variare da 0 a 21. I punteggi più elevati indicano una maggiore compromissione del sonno (un punteggio superiore a 5 è considerato indicativo di presenza di disturbi del sonno).

- *Insomnia Severity Index (ISI)*: è un questionario self-report per valutare la natura, la gravità e l'impatto diurno dell'insonnia. Il periodo riguarda il mese precedente e le dimensioni da valutare sono: 1) gravità dei problemi d'insonnia, 2) mantenimento del sonno, 3) problemi di risveglio nelle prime ore del mattino, 4) insoddisfazione del sonno, 5) disturbi del sonno con difficoltà di funzionamento diurno, 6) capacità di avvisare i problemi del sonno da parte degli altri, 7) disagio causato dalle difficoltà di sonno. Per ogni item si usa una scala Lickert da 0 a 4 (0= molto soddisfatto, 4= molto insoddisfatto), ottenendo un punteggio totale che arriva da 0 a 28.¹²⁶

- *Epworth Sleepiness Scale (ESS)*: La ESS (Johns, 1991¹²⁴) è stata messa a punto allo scopo di misurare il livello generale di sonnolenza diurna, come strumento rapido ed economico di screening per identificare coloro che hanno problemi diurni di sonnolenza. È una scala di autovalutazione di 8 item che prendono in considerazione varie situazioni della vita quotidiana che sappiamo avere un diverso effetto soporifero, per ognuna delle quali il soggetto deve stabilire in che misura tendano a farlo appisolare o addormentare. Ogni item è valutato su di una scala a 4 punti, da 0 = non mi appisolerei mai, a 3 = alta probabilità di appisolarsi. Le proprietà psicometriche dello strumento sono risultate assai buone, compresa una discreta sensibilità al cambiamento per effetto del trattamento.

- *Ford Insomnia Response to stress (FIRST)*: questo test è costituito da 12 domande, di cui le prime 9 volte a valutare la reattività del sonno di fronte a situazioni ben specifiche come ad esempio dover parlare in pubblico, dover partire per una vacanza etc, e le ultime tre volte a valutare quante volte nel mese passato il soggetto si è sentito stressato, quante volte è capitato

che lo stress gli rovinasse il sonno e la tipologia di stress. Il range di risposta delle prime nove domande è costruito su una scala Likert che va da un minimo di 1 che indica “mai”, ad un massimo di 4 che indica “molto frequentemente”, i punteggi intermedi 2 e 3 indicano rispettivamente “talvolta” e “spesso” (Drake et al., 2004¹²⁸).

• Valutazione della sfera affettiva

- *Profile of Mood State (POMS)*: è una scheda composta da 65 aggettivi dei quali il paziente deve dare una valutazione quantitativa da 0 a 4, facendo riferimento alla settimana precedente alla valutazione (McNair et al., 1992¹²⁰). L’analisi fattoriale ha isolato 6 fattori: Tensione/Ansia, Depressione/Abbattimento, Ansia/Ostilità, Energia, Fatica e Confusione. La scala è stata appositamente studiata per la valutazione dei sentimenti, emozioni ed umore e dei relativi cambiamenti sotto trattamento ed ha dimostrato una buona capacità di discriminare fra trattamenti.

- *State-Trait Anxiety Inventory (STAI-Y)*: La scala è stata inizialmente concettualizzata come strumento di ricerca per l’ansia nella popolazione adulta e successivamente validata nell’individuazione di un disturbo ansioso in epoca perinatale (Grant et al, 2008¹²¹).

La STAI (Spielberger et al., 1983¹²²) è un questionario di auto-valutazione dell’ansia sia di stato che di tratto, si articola in due sub-scale, la STAI T-Anxiety Scale e la STAI S-Anxiety Scale che esplorano, rispettivamente, l’ansia di tratto e l’ansia di stato. Nel 1993, sulla base dell’esperienza acquisita in oltre 10 anni di impiego, è stata pubblicata una revisione dello STAI, la Form Y, capace di distinguere in maniera più netta i due tipi di ansia.

La scala è costituita da 40 item complessivi di cui 20 esplorano l’ansia di tratto (ovvero lo stato d’ansia generale del soggetto) e 20 quella di stato (ovvero il livello d’ansia attuale). Gli item sono graduati in base ad una scala a 4 punti che corrispondono per la scala di tratto a “Per nulla, Un po’, Abbastanza, Moltissimo”. Per la scala di stato i punteggi equivalgono a “Quasi mai, Qualche volta, Spesso e Quasi sempre”. Lo strumento è ampiamente utilizzato sia nel contesto clinico che di ricerca.

- *Self Rating Anxiety Scale (SAS)*: è uno strumento costruito per quantificare il livello d’ansia intesa come disturbo psicopatologico (e cioè l’ansia di stato). La SAS è costituita da 20 item, alle quali il soggetto deve dare un punteggio, su di una scala da 1 a 4, in base a quanto queste

dichiarazioni lo descrivono in riferimento alla settimana precedente l'intervista. (William and Zung, 1971¹²³).

- *Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)*: è un questionario specificatamente sviluppato da Zigmond e Snaith¹²⁴ nel 1983 per individuare stati d'ansia e di depressione in pazienti affetti da patologie organiche o funzionali. Lo strumento è composto da due scale a 7 items, una per la valutazione dell'ansia (HADS-A) e l'altra per la valutazione della depressione (HADS-D), con punteggi variabili da 0 a 3 per ciascun item. Per ciascuna delle affermazioni al paziente viene chiesto quale fra quattro possibili opzioni descrive meglio il suo stato emotivo. I dati normativi considerano punteggi minori o uguali a 7 come normali (Non Cases), da 8 a 10 come Borderline Cases (situazioni che potenzialmente potrebbero evolvere in senso psicopatologico) e infine punteggi superiori a 11 come indicativi della presenza di ansia o depressione clinicamente rilevante.

• **Valutazione dello stress**

- *Perceived Stress Scale (PSS)*: è lo strumento psicologico maggiormente utilizzato per misurare la percezione dello stress. Si tratta di una misura del grado in cui vengono valutate le situazioni stressanti della propria vita. Gli item sono stati costruiti per intercettare il livello in cui le persone, che rispondono al test, trovano le loro vite imprevedibili, incontrollabili o sovraccariche. La scala contiene anche una serie di domande dirette sui livelli attuali di stress percepito.

La versione utilizzata in questo studio è quella ridotta (10 item), sebbene mantenga la qualità psicometrica necessaria per la valutazione (Cohen and Williamson, 1988¹²⁹). Gli item indagano i pensieri e i sentimenti dei soggetti durante l'ultimo mese; ad ogni domanda, infatti, ai soggetti viene richiesto di riferire quanto spesso si siano sentiti in un determinato modo dando un punteggio da 0 che equivale a "mai" a 4 "molto spesso" (Cohen et al., 1983¹³⁰). Il punteggio totale si ottiene sommando tutti i punteggi degli item, con particolare attenzione agli item 4,5,7 e 8 che hanno connotazione positiva.

• Valutazione della qualità di vita

- *Psychological General Well Being Index (PGWI)*: Tra gli strumenti disponibili in letteratura per la misurazione del benessere, il Psychological General Well Being Index, uno strumento sotto forma di questionario sviluppato negli anni 80 negli USA, viene ampiamente utilizzato in studi di tipo epidemiologico e clinico in tutto il mondo. I motivi di questa scelta sono essenzialmente legati all'estrema robustezza del questionario, alla sua elevata riproducibilità e consistenza interna e alla meticolosa impalcatura metodologica che lo sorregge.

A differenza della maggior parte degli strumenti di misurazione di indici soggettivi, lo PGWI è una scala bipolare, in grado cioè, non solo di misurare stati psicologici inferiori alla norma, ma di cogliere stati di benessere superiori ad un livello "normale" legato alla semplice mancanza di distress. Lo PGWI è in grado di fornire un indice che misura l'auto-rappresentazione dello stato di benessere o disagio legato alla sfera emotiva e affettiva. Si presenta come un questionario composto da 22 items, ciascuno dei quali presenta una serie di sei possibili risposte il cui punteggio è proporzionale alla positività del benessere riferito alle ultime quattro settimane.

Il punteggio globale oscilla da 0, cioè lo stato peggiore possibile, fino a 110, ovvero lo stato migliore possibile; il tempo per la compilazione è compreso tra 8 e 15 minuti. La scala si compone di 6 domini o dimensioni: ansia, depressione, positività e benessere, autocontrollo, stato di salute generale e vitalità (Ryff et al., 1995¹³¹).

La consistenza interna del PGWI è risultata essere consistentemente elevata, con valori di Cronbach alfa compresi tra 0.90 e 0.94. Anche le risposte individuali agli items si sono rivelate altamente consistenti. I coefficienti di test-retest hanno oscillato intorno ad un valore mediano di 0.80. Secondo le intenzioni degli autori lo strumento nasce per essere preferibilmente autosomministrato. Tuttavia, è stato anche validato per la somministrazione sotto forma di intervista nel caso di soggetti analfabeti, con ritardo mentale, non vedenti o stranieri. Lo strumento è stato utilizzato in diversi gruppi socio-demografici, come comunità rurali od urbane, pazienti ospedalizzati o anziani residenti in comunità. E' stato anche usato per valutare modificazioni del benessere soggettivo a seguito di trattamenti psicoterapici (Ryff et al., 1995¹³¹).

- *Short Form-12 (SF-12)*: Il questionario sulla salute SF-12 (Ware, Kosinski, & Keller, 1996¹³²) è stato sviluppato originariamente negli Stati Uniti per fornire una forma alternativa breve al questionario SF-36. L'SF-12 è composto da 12 item che producono due misure

relative a due diversi aspetti della salute: salute fisica e salute mentale. L'SF-12 è formato da 4 scale (funzionamento fisico, ruolo e salute fisica, ruolo e stato emotivo, salute mentale) misurate da 2 item ciascuna e da 4 scale misurate ognuna da un item (dolore fisico, vitalità, attività sociali e salute in generale). Al soggetto viene chiesto di rispondere su come si sente e su come riesce a svolgere le attività consuete, valutando la giornata in cui compila il questionario e le 4 settimane precedenti. Esempi di item sono “La sua salute la limita attualmente nello svolgimento di attività di moderato impegno fisico, come spostare un tavolo, usare l’aspirapolvere, giocare a bocce, fare un giro in bicicletta?”, “Nelle ultime 4 settimane, a causa del suo stato emotivo, ha reso meno di quanto avrebbe voluto?”, “Nelle ultime 4 settimane, per quanto tempo si è sentito calmo e sereno?”.

La sua compilazione non richiede più di 10 minuti, il che lo rende uno strumento molto utile, soprattutto con pazienti geriatrici. La versione originale del questionario, validata e comparata con l'SF-36 negli Stati Uniti sia sulla popolazione generale che su un gruppo di adulti con condizioni croniche di malattia, ha dimostrato che gli item dell’indice di salute fisica dell’SF-12 sono i migliori predittori dell’indice di salute fisica dell’SF-36 e gli item dell’indice di salute mentale dell’SF-12 sono i migliori predittori dell’indice di salute mentale dell’SF-36. La correlazione test-retest a distanza di due settimane risulta di 0.89 per l’indice di salute fisica e di 0.76 per l’indice di salute mentale.

- **Valutazione delle funzioni neurocognitive**

- *Trail Making Test (TMT) A e B*: è un test per valutare la velocità psicomotoria e le funzioni esecutive (Crowe, 1998¹³³). Nel TMT-A, il soggetto deve collegare i numeri che si trovano in ordine casuale il più rapidamente possibile, mentre TMT-B contiene sia numeri che lettere, e in questo caso il soggetto è tenuto a collegare i numeri e le lettere alternativamente (ad esempio, 1-A-2-B-3-C). Il punteggio per ogni sotto-test riguarda il tempo necessario a completare l'operazione. I punteggi riflettono la capacità di ricerca visiva e l’abilità motoria.

- **Valutazione del profilo comportamentale non verbale**

- *Ethological Coding System For Interview (ECSI)*: valuta il profilo etologico del soggetto mediante l’analisi off-line dei comportamenti non verbali. È una forma rivisitata di un’etogramma designato per interviste cliniche e coinvolge la diretta osservazione e analisi di

specifici pattern non verbali videoregistrati durante un'intervista di natura sociale (Troisi e Moles, 1999¹³⁴).

Questo sistema include 37 pattern non verbali, in gran parte espressioni facciali e movimenti della testa, suddivisi in 9 categorie (eye contact, affiliation, submission, prosocial, flight, assertion, gesture, displacement, relaxation), che se considerate nella loro totalità, definiscono il profilo etologico del soggetto, variabile in relazione all'ambiente, alle emozioni e agli stati affettivi a cui il soggetto è esposto. L'uso dell'ECSI richiede che vengano quantificati i comportamenti non verbali del soggetto.

La videoregistrazione del comportamento necessita che sia visibile il volto e il mezzo busto, e non richiede la registrazione dell'audio. Con l'impiego dell'intervista si è inteso valutare la naturale tendenza (più o meno marcata nei diversi individui) a sentirsi in difficoltà di fronte ad un soggetto estraneo, manifestando un comportamento rivolto a favorire o ad evitare il contatto sociale. È ormai riconosciuto che il comportamento non verbale umano si sviluppa come un flessibile sistema per regolare l'interazione sociale, non come sistema rigido e predefinito, ma, al contrario, riflette le emozioni e gli stati affettivi (Troisi e Moles, 1999¹³⁴).

Esaminate nel dettaglio, le categorie riflettono il Background emozionale individuale:

- La categoria *eye contact*, rappresentata dal singolo pattern "look at", esprime attenzione e coinvolgimento, è una componente essenziale nella formazione della struttura di un'interazione bilaterale.
- I pattern raggruppati nella categoria *affiliation* esprimono amichevolezza e consistono in espressioni facciali e movimenti della testa che invitano all'interazione sociale e riflettono un atteggiamento positivo, teso a rassicurare l'interlocutore e potenziare il legame.
- I pattern compresi nella categoria *submission* sono adottati per ammansire l'intervistatore cercando di prevenire o inibire un'eventuale risposta ostile e denotano una chiara attitudine sottomissiva. In studi condotti sulla competitività, si è riscontrato che solitamente i vincitori tendono ad avere una tendenza verso futuri incontri sociali, mentre gli sconfitti sviluppano una propensione verso componenti sottomissivi, con una diminuita inclinazione verso i litigi e l'ostilità (Salvador, 2005¹³⁵).

Tutti i pattern comportamentali inclusi nella categoria di affiliation e di submission mostrano una funzione comune nella regolazione dell'interazione sociale, che viene espressa nello stabilire e mantenere un contatto sociale non ostile. Siffatti moduli sono pertanto inclusi in un'unica categoria definita *prosocial*. I comportamenti inclusi in questo gruppo esprimono, quindi, da un lato la tendenza all'instaurare una relazione sociale e, dall'altro, un'attitudine a

calmare l'intervistatore; nonostante questa sottile distinzione, tutti i pattern racchiusi nel prosocial hanno come unico scopo quello di favorire i contatti interpersonali. (Troisi et al., 1998¹³⁶).

- La categoria *flight* include comportamenti non verbali assunti per “tagliare fuori” i recettori sensoriali dalla possibilità di ricevere stimoli esterni percepiti come stressanti o avversi. Questi comportamenti sono analoghi ad alcune risposte descritte in molte specie animali.

- La categoria *assertion* include espressioni facciali e movimenti del capo che segnalano un basso livello di aggressività e ostilità.

- La categoria *gesture* (che include solo l'omonimo pattern gesture), include movimenti delle mani che accompagnano, illustrano e accentuano il contenuto verbale dell'espressione. In un'interazione sociale, questo parametro riflette gli “sforzi” comunicativi del soggetto ed è un buon indice dell'attività psicomotoria globale.

Complessivamente, la combinazione di bassi livelli di eye contact, affiliation e gesture riflette una tendenza verso l'evitamento sociale su un deficit che è stato documentato in studi etologici sui pazienti depressi (Jones and Pansa, 1979¹³⁷).

- La categoria *displacement* include pattern comportamentali che consistono in movimenti focalizzati sul proprio corpo o rivolti alla manipolazione degli oggetti esterni.

Questo comportamento è presente anche in molte specie animali, dove si manifesta in situazioni caratterizzate da tensioni sociali e conflitti motivazionali. Nell'uomo, un aumento del comportamento di displacement correla con una sensazione soggettiva d'ansia e con uno stato emozionale negativo. Studi etofarmacologici su primati che vivono in gruppi sociali hanno mostrato che i comportamenti di displacement sono incrementati in situazioni stressanti e diminuiscono con la somministrazione di farmaci ansiolitici (Jones e Pansa, 1979¹³⁷).

- La categoria *relaxation* consiste di pattern comportamentali che indicano un basso livello di attivazione emozionale. Alti punteggi in questa categoria riflettono una riduzione nell'espressione dei segnali non verbali che invece denotano una certa sensibilità emozionale.

ANALISI STATISTICA

Data la non elevata numerosità dei pazienti esaminati (14), non è stato possibile sviluppare un solo modello statistico ma sono stati utilizzati due modelli ANOVA¹⁴² (ANalysis Of Variance) a 2 vie, separatamente.

- 1) ANOVA a due vie, con effetto soggetto e tempo;
- 2) ANOVA a due vie, con effetto soggetto e trattamento.

Data l'eterogeneità dei dati, le analisi ANOVA sono state effettuate dopo trasformazione delle variabili in ranghi.

Le correlazioni sono state fatte in modalità non parametrica (indice di correlazione R per ranghi di Spearman¹⁴³).

La significatività statistica delle differenze tra i campioni fecali è stata valutata attraverso metodi sia parametrici sia non-parametrici per mezzo del software STATISTICA (version 10; Statsoft Inc., USA). Sono state poi condotte anche analisi di correlazione PLS (Partial Least Squares). La significatività sarà fissata a $P \leq 0.05$, mentre le differenze medie con $0.05 < P \leq 0.10$ saranno accettate come tendenza.

Le concentrazioni delle specie della flora batterica sono state trasformate con la funzione logaritmo per renderle gaussiane.

Il valore di P, per la significatività dei risultati, è stato fissato a 0.05 senza correzioni per test multipli.

4. RISULTATI

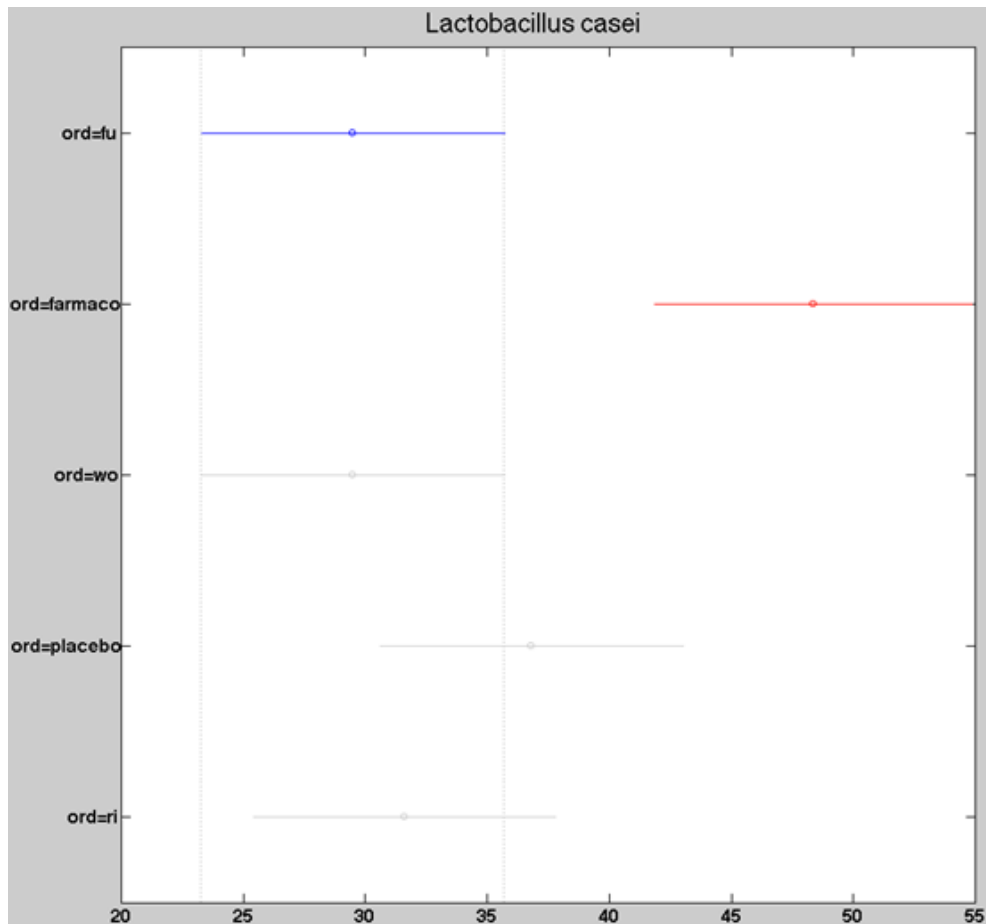
Popolazione di studio

La popolazione di studio era composta da 14 pazienti, 11 femmine e 3 maschi, con un'età compresa tra i 20 e i 65 anni (media \pm deviazione standard: $44,35 \pm 13,1$).

ANALISI METAGENOMICA DEL MICROBIOTA INTESTINALE

L'analisi metagenomica ha evidenziato che 7 specie batteriche (**Lactobacillus casei**, **L. paracasei**, **L. rhamnosus**, **L. zeae**, **L. thailandensis**, **L. camelliae** e **Pediococcus stilesii**) risultano maggiormente concentrate durante il trattamento con il farmaco, rispetto a tutti gli altri periodi dello studio ($p < 0.01$).

[In Appendice la tabella rappresentativa delle analisi microbiologiche effettuate per l'identificazione del microbiota intestinale, estesa a Phylum, Classe, Ordine, Famiglia, Genere e Specie]

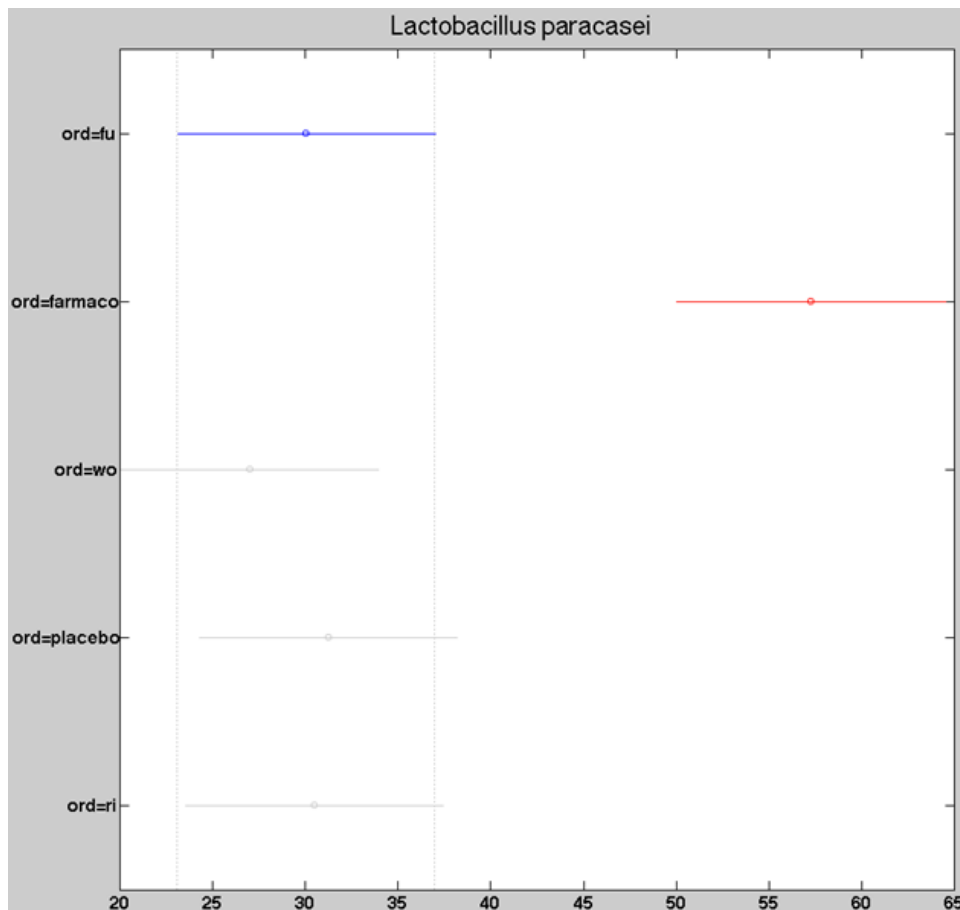


ord = fu : livello della concentrazione batterica nel periodo di Follow up;
ord = farmaco : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il farmaco;
ord = wo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Wash out;
ord = placebo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il placebo;
ord = ri : livello della concentrazione batterica nel periodo di Run in.

Figura 10. La distribuzione di *L. casei* nei pazienti trattati col farmaco e col placebo è risultata significativamente differente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

<i>Lactobacillus casei</i>:	Phylum	<i>Firmicutes</i>
	Classe	<i>Bacilli</i>
	Ordine	<i>Lactobacillales</i>
	Famiglia	<i>Lactobacillaceae</i>
	Genere	<i>Lactobacillus</i>
	Specie	<i>casei</i>

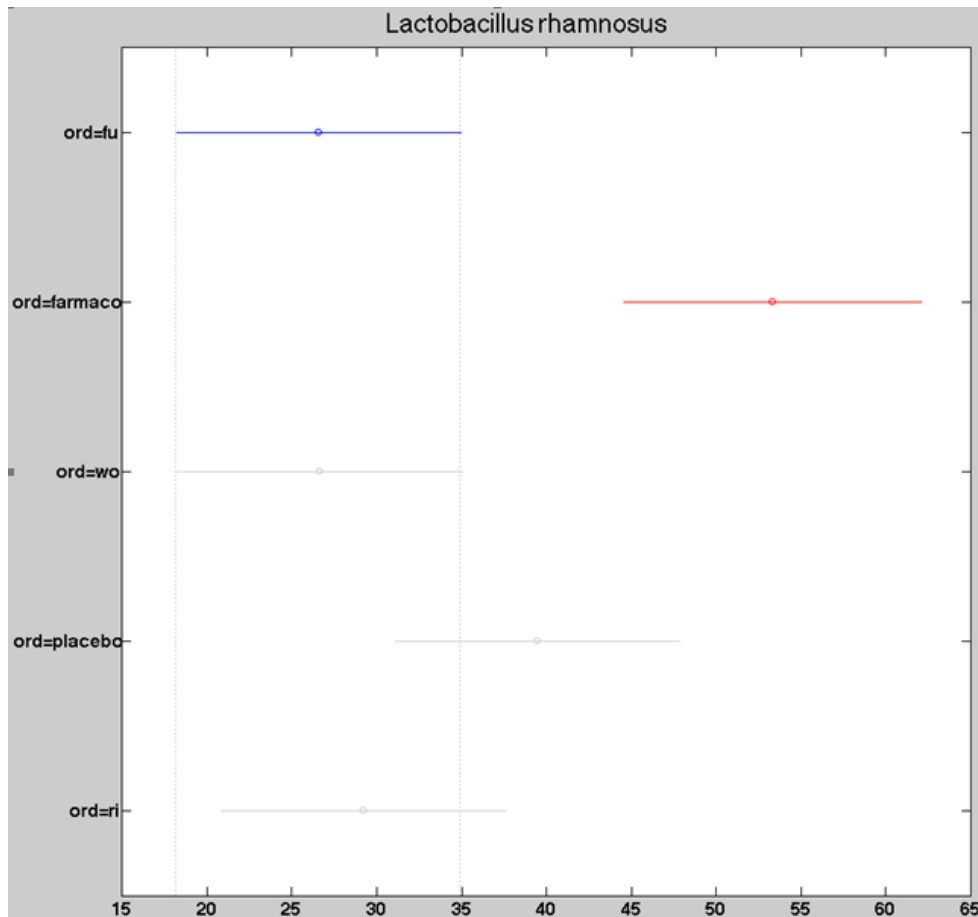


ord = fu : livello della concentrazione batterica nel periodo di Follow up;
ord = farmaco : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il farmaco;
ord = wo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Wash out;
ord = placebo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il placebo;
ord = ri : livello della concentrazione batterica nel periodo di Run in.

Figura 11. La distribuzione di *L. paracasei* nei pazienti trattati col farmaco e col placebo è risultata significativamente differente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

<i>Lactobacillus paracasei</i>:	Phylum	<i>Firmicutes</i>
	Classe	<i>Bacilli</i>
	Ordine	<i>Lactobacillales</i>
	Famiglia	<i>Lactobacillaceae</i>
	Genere	<i>Lactobacillus</i>
	Specie	<i>paracasei</i>

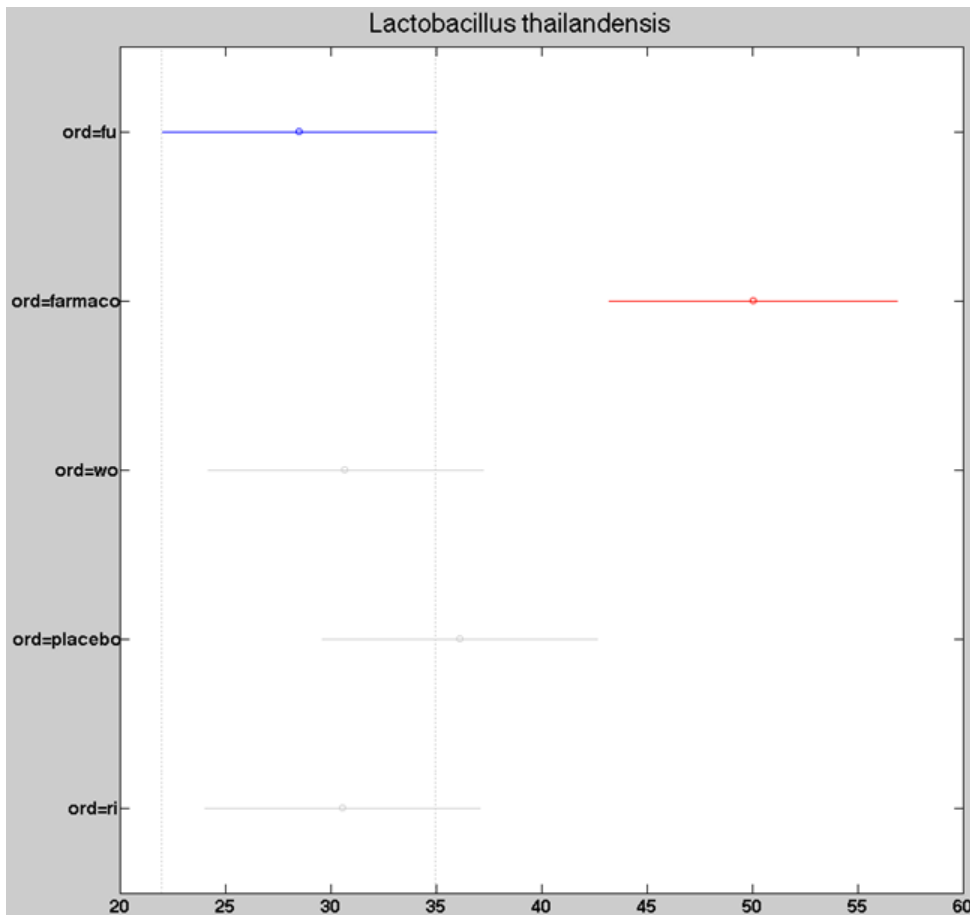


ord = fu : livello della concentrazione batterica nel periodo di Follow up;
ord = farmaco : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il farmaco;
ord = wo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Wash out;
ord = placebo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il placebo;
ord = ri : livello della concentrazione batterica nel periodo di Run in.

Figura 12. La distribuzione di *L. rhamnosus* nei pazienti trattati col farmaco e col placebo è risultata significativamente differente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

***Lactobacillus rhamnosus*:** Phylum *Firmicutes*
Classe *Bacilli*
Ordine *Lactobacillales*
Famiglia *Lactobacillaceae*
Genere *Lactobacillus*
Specie *rhamnosus*

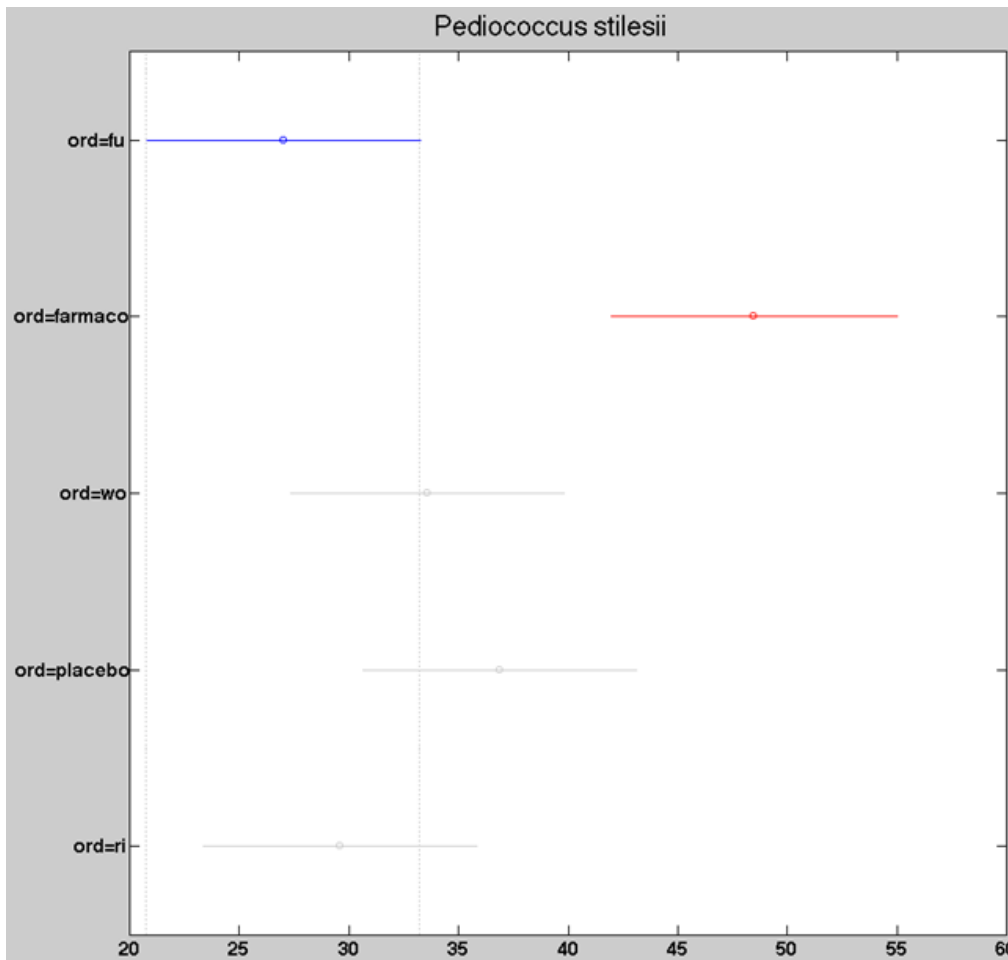


ord = fu : livello della concentrazione batterica nel periodo di Follow up;
ord = farmaco : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il farmaco;
ord = wo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Wash out;
ord = placebo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il placebo;
ord = ri : livello della concentrazione batterica nel periodo di Run in.

Figura 13. La distribuzione di *L. thailandensis* nei pazienti trattati col farmaco e col placebo è risultata significativamente differente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

<i>Lactobacillus thailandensis:</i>	Phylum	<i>Firmicutes</i>
	Classe	<i>Bacilli</i>
	Ordine	<i>Lactobacillales</i>
	Famiglia	<i>Lactobacillaceae</i>
	Genere	<i>Lactobacillus</i>
	Specie	<i>thailandensis</i>

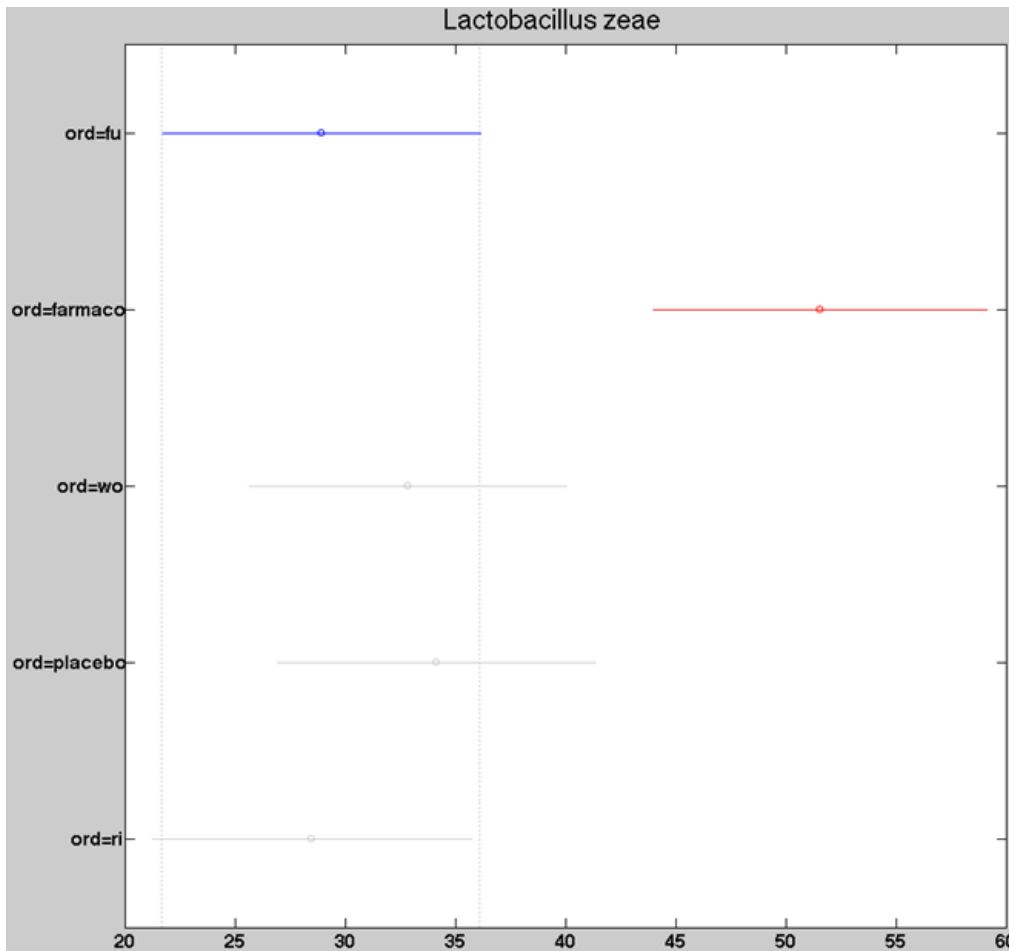


ord = fu : livello della concentrazione batterica nel periodo di Follow up;
ord = farmaco : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il farmaco;
ord = wo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Wash out;
ord = placebo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il placebo;
ord = ri : livello della concentrazione batterica nel periodo di Run in.

Figura 14. La distribuzione di *P. stilesii* nei pazienti trattati col farmaco e col placebo è risultata significativamente differente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

<i>Pediococcus stilesii</i>:	Phylum	<i>Firmicutes</i>
	Classe	<i>Bacilli</i>
	Ordine	<i>Lactobacillales</i>
	Famiglia	<i>Lactobacillaceae</i>
	Genere	<i>Pediococcus</i>
	Specie	<i>stilesii</i>

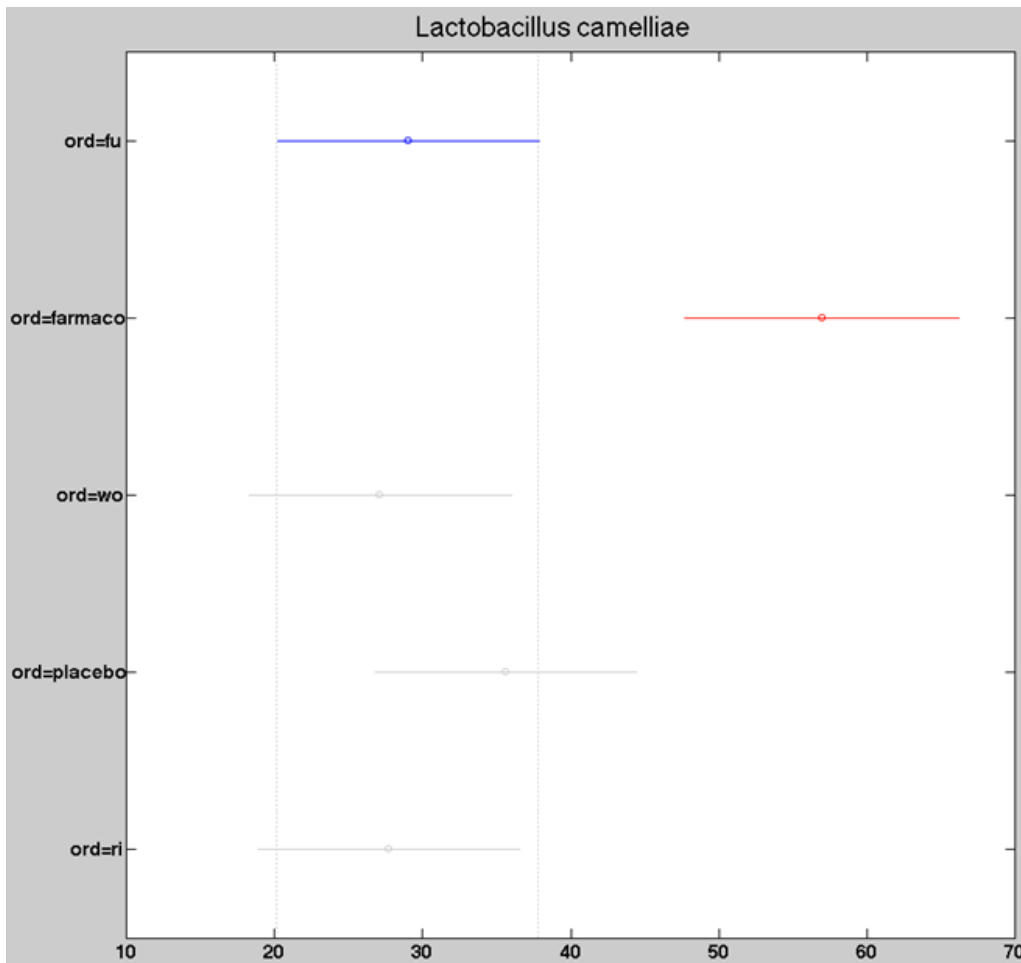


ord = fu : livello della concentrazione batterica nel periodo di Follow up;
ord = farmaco : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il farmaco;
ord = wo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Wash out;
ord = placebo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il placebo;
ord = ri : livello della concentrazione batterica nel periodo di Run in.

Figura 15. La distribuzione di *L. zae* nei pazienti trattati col farmaco e col placebo è risultata significativamente differente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

<i>Lactobacillus zae</i>:	Phylum	<i>Firmicutes</i>
	Classe	<i>Bacilli</i>
	Ordine	<i>Lactobacillales</i>
	Famiglia	<i>Lactobacillaceae</i>
	Genere	<i>Lactobacillus</i>
	Specie	<i>zae</i>



ord = fu : livello della concentrazione batterica nel periodo di Follow up;
ord = farmaco : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il farmaco;
ord = wo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Wash out;
ord = placebo : livello della concentrazione batterica nel periodo di Trattamento con il placebo;
ord = ri : livello della concentrazione batterica nel periodo di Run in.

Figura 16. La distribuzione di *L. camelliae* nei pazienti trattati col farmaco e col placebo è risultata significativamente differente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

<i>Lactobacillus camelliae</i>:	Phylum	<i>Firmicutes</i>
	Classe	<i>Bacilli</i>
	Ordine	<i>Lactobacillales</i>
	Famiglia	<i>Lactobacillaceae</i>
	Genere	<i>Lactobacillus</i>
	Specie	<i>camelliae</i>

Sono state identificate due specie batteriche (*Candidatus Amoebophilus asiaticus* e *Blautia obeum*) la cui concentrazione appare essere predittiva rispettivamente delle caratteristiche delle feci valutate con la Bristol Stool Chart (Bristol T) e del dolore addominale valutato con la Numerical Rating Scale (NRS).

In particolare, i soggetti con maggiori concentrazioni di *Candidatus Amoebophilus asiaticus* hanno più elevati valori di Bristol T, e negli stessi soggetti variazioni di concentrazione da una valutazione alla successiva della stessa specie batterica correla con variazioni dell'indice Bristol T.

Infine la concentrazione di *Blautia obeum* anticorrela con i livelli individuali di NRS.

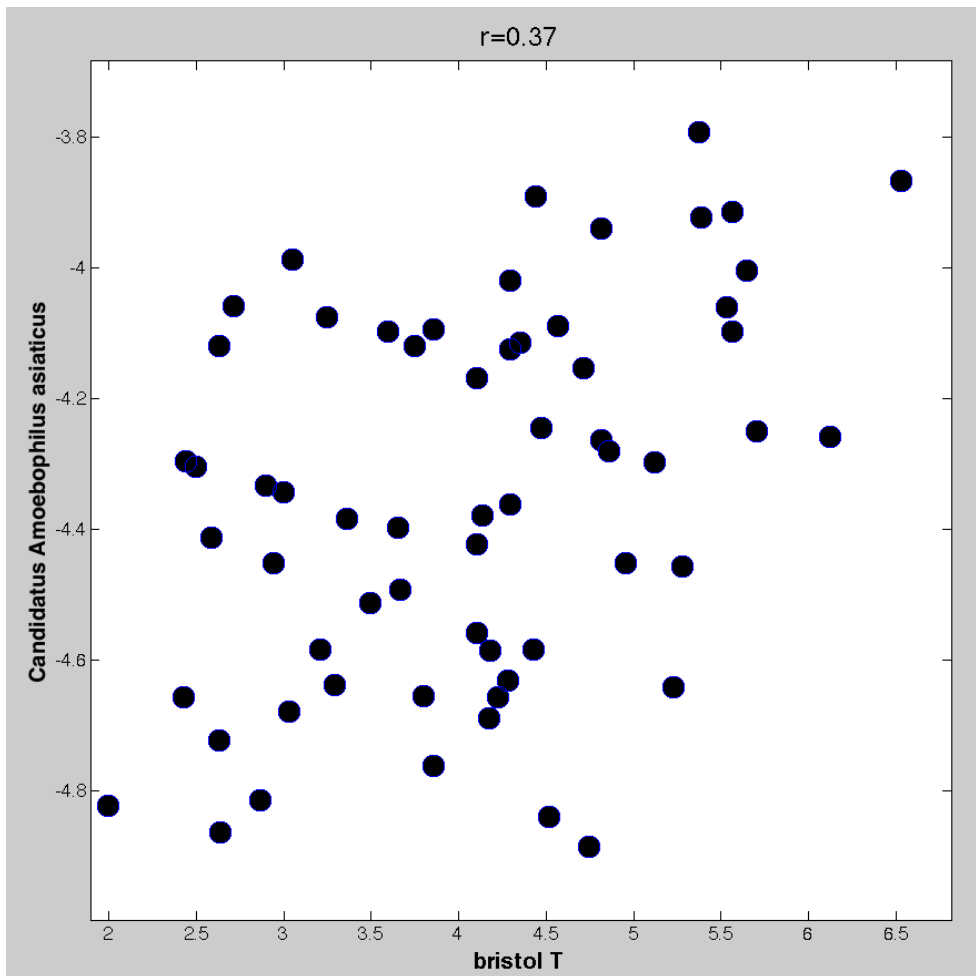


Figura 17. La correlazione tra la concentrazione di *Candidatus Amoebophilus asiaticus* e consistenza fecale espressa dalla Bristol Stool Chart è risultata significativa. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

<i>Candidatus Amoebophilus asiaticus</i>:	Phylum	<i>Bacteroidetes</i>
	Classe	<i>Cytophagia</i>
	Ordine	<i>Cytophagales</i>
	Famiglia	<i>Amoebophilaceae</i>
	Genere	<i>Candidatus Amoebophilus</i>
	Specie	<i>asiaticus</i>

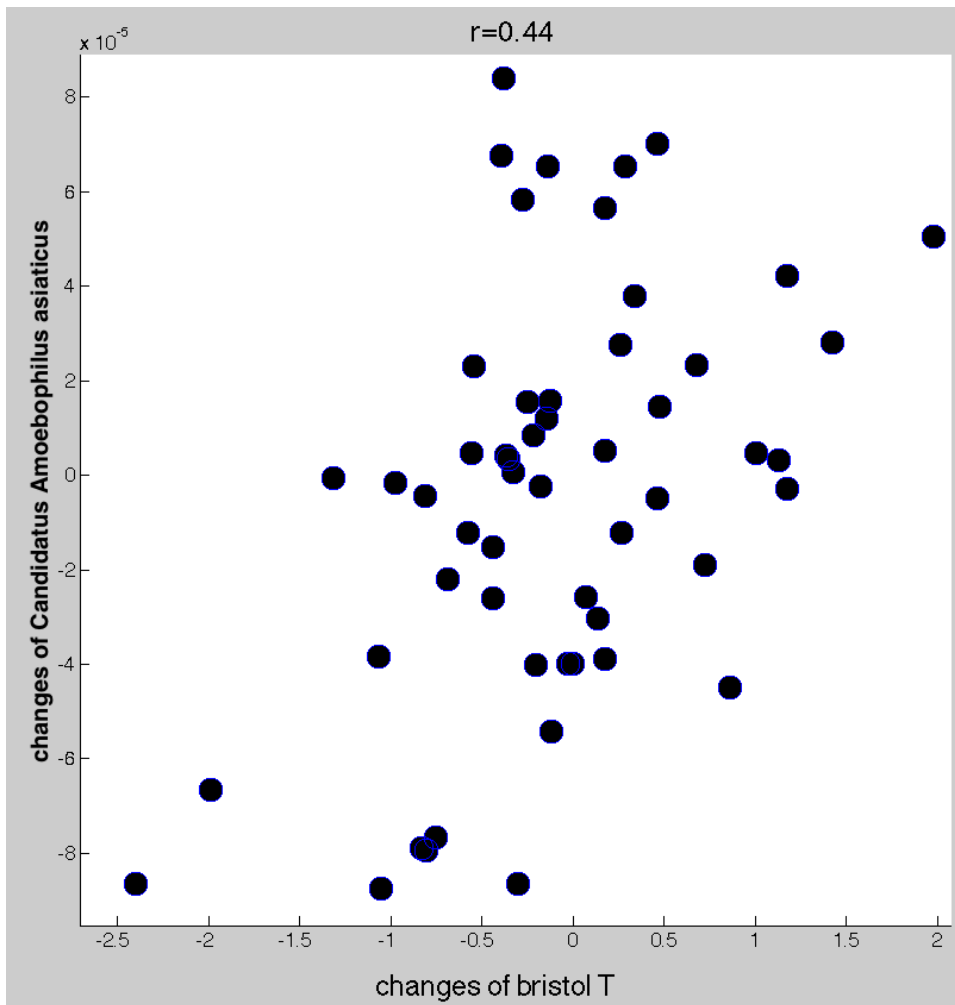


Figura 18. I cambiamenti della concentrazione di *Candidatus Amoebophilus asiaticus* sono risultati predittivi delle modificazioni della Bristol Stool Chart nel singolo paziente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

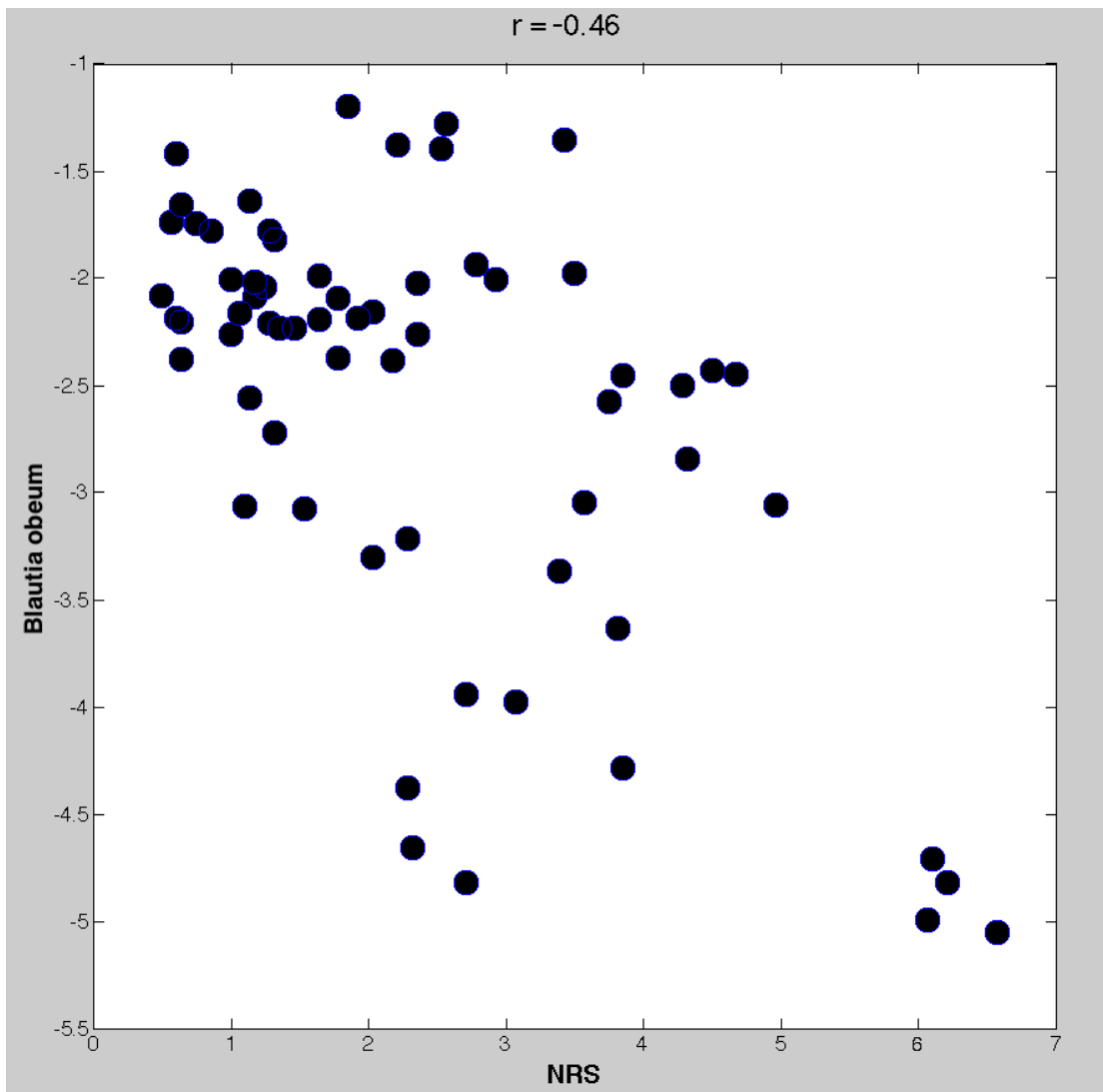


Figura 19. La correlazione tra la concentrazione di *Blautia obeum* e i valori della Numerical Rating Scale è risultata significativa. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

Blautia obeum:

Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Clostridia</i>
Ordine	<i>Clostridiales</i>
Famiglia	<i>Lachnospiraceae</i>
Genere	<i>Blautia</i>
Specie	<i>obeum</i>

Dalle analisi metagenomiche emerge una correlazione tra alcune variabili psicometriche e il microbiota intestinale. In particolare le concentrazioni del batterio *Bifidobacterium ruminantium* sono proporzionali ai valori ottenuti nella scala Psychological General Well-Being Index (PGWI), che valutava la qualità della vita.

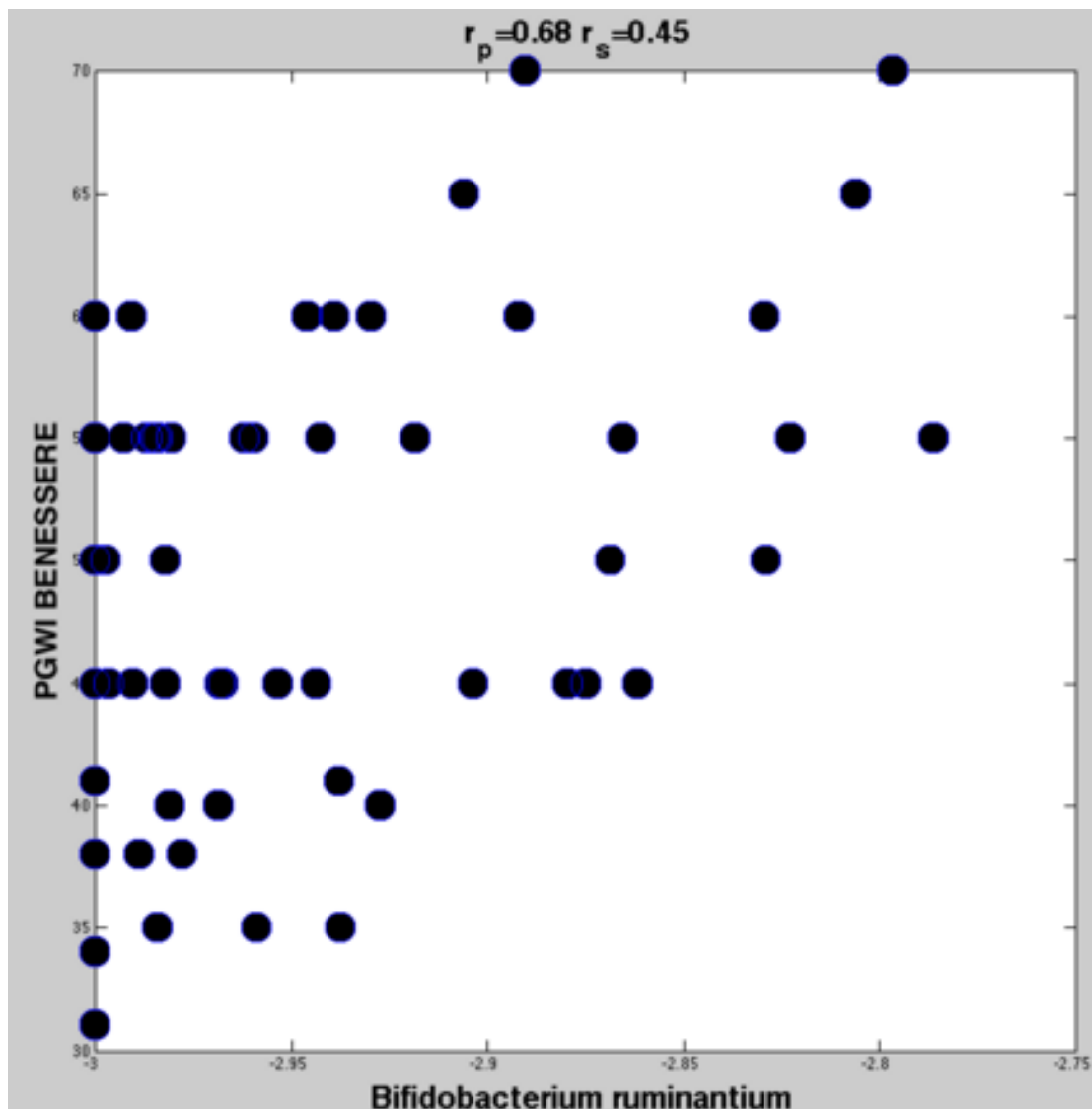


Figura 20. La correlazione tra la concentrazione di *Bifidobacterium ruminantium* e i risultati dello Psychological General Well Being Index è risultata significativa. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

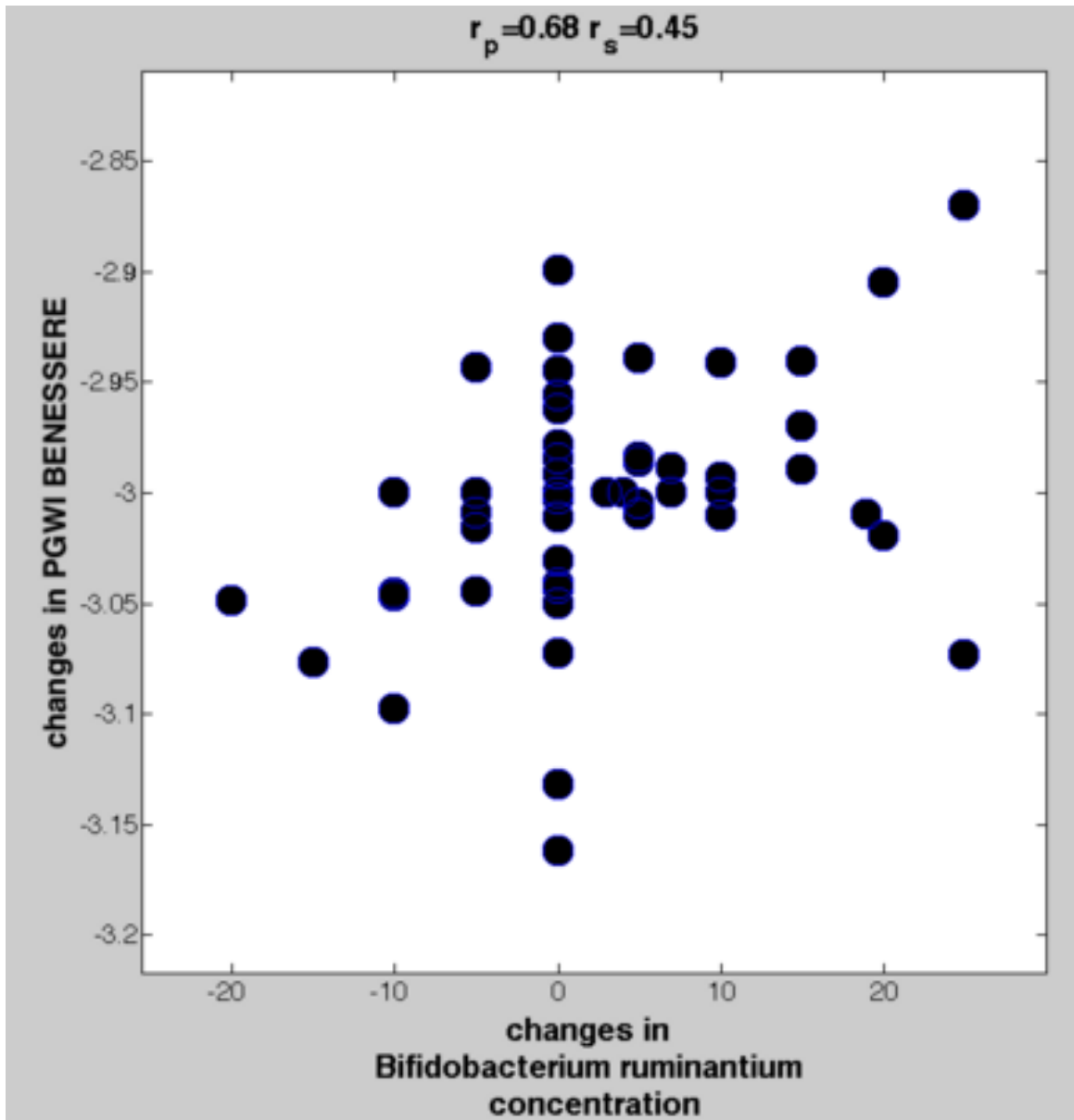


Figura 21. I cambiamenti della concentrazione di *Bifidobacterium ruminantium* sono risultati predittivi delle modificazioni dello Psychological General Well Being Index nel singolo paziente. Le concentrazioni sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

TASSONOMIA

<i>Bifidobacterium ruminantium:</i>	Phylum	<i>Actinobacteria</i>
	Classe	<i>Actinobacteria</i>
	Ordine	<i>Bifidobacteriales</i>
	Famiglia	<i>Bifidobacteriaceae</i>
	Genere	<i>Bifidobacterium</i>
	Specie	<i>ruminantium</i>

VALUTAZIONE DELLA SINTOMATOLOGIA IBS

Il trattamento con il farmaco non risulta modificare significativamente le caratteristiche cliniche dell'IBS. Infatti i valori medi del punteggio ottenuto dalla auto-valutazione giornaliera del dolore addominale (NRS), delle caratteristiche delle feci (Bristol Stool Chart), del numero delle evacuazioni giornaliere e dalla auto-valutazione settimanale del grado di sollievo della sintomatologia addominale rispetto al proprio basale (Symptom Relief Scale) non sono significativamente diverse tra il periodo di *run in*, il periodo di *trattamento con placebo* e il periodo di *trattamento con il farmaco* (vedi tabella 4).

	RUN IN	PLACEBO	LCDG
BRISTOL STOOL CHART	3,86 ± 1,07	3,98 ± 0,88	4,02 ± 1,08
NUMERO EVACUAZIONI	1,67 ± 1,17	1,55 ± 0,84	1,46 ± 0,65
NUMERICAL RATING SCALE	2,77 ± 1,43	2,45 ± 1,62	2,38 ± 1,71
SYMPTOM RELIEF SCALE		3,42 ± 0,78	3,37 ± 1,01

Tabella 4. I valori medi della Bristol Stool Chart, del numero delle evacuazioni, della Numerical Rating Scale e della Symptom Relief Scale non mostrano differenze significative tra il periodo di *run in*, il trattamento con placebo e quello con Lactobacillus casei DG (LCDG).

Anche analizzando le medie dei risultati delle stesse variabili considerate nella prima e nella quarta settimana di trattamento, sia con il placebo che con il farmaco, non si evidenziavano significative differenze né tra la prima e la quarta settimana di trattamento, né rispetto al periodo di *run in* (vedi tabella 5).

	RUN IN	PLACEBO 1° settimana	PLACEBO 4° settimana	LCDG 1° settimana	LCDG 4° settimana
BRISTOL STOOL CHART	3,86 ± 1,07	3,88 ± 1,16	4,10 ± 1,25	3,81 ± 0,94	3,97 ± 1,03
NUMERO EVACUAZIONI	1,67 ± 1,17	1,33 ± 0,64	1,37 ± 0,63	1,41 ± 0,72	1,52 ± 0,73
NUMERICAL RATING SCALE	2,77 ± 1,43	2,47 ± 2,04	1,97 ± 1,90	2,41 ± 1,86	2,27 ± 1,76
SYMPTOM RELIEF SCALE		3,51 ± 1,16	3,43 ± 0,93	3,35 ± 1,01	3,42 ± 1,39

Tabella 5. I valori medi della Bristol Stool Chart, del numero delle evacuazioni, della Numerical Rating Scale e della Symptom Relief Scale non mostrano differenze significative tra il periodo di run in, il trattamento con placebo e quello con Lactobacillus casei DG (LCDG) alla 1° e alla 4° settimana.

VALUTAZIONE PSICOLOGICA

Il trattamento con il farmaco non risulta inoltre modificare significativamente le caratteristiche psicologiche dei pazienti. Di seguito, vengono riportate le tabelle con i valori dei punteggi dei vari test psicometrici utilizzati nelle sedute sperimentali durante lo studio.

TEST	PLA 0	PLA 1	LCDG 0	LCDG 1
ISI	7,71 ± 6,87	7,29 ± 4,30	5,29 ± 3,63	5,71 ± 3,45
FIRST	23,71 ± 5,47	22,14 ± 8,58	23,00 ± 5,71	23,00 ± 6,47
ESS	3,93 ± 3,87	4,00 ± 3,23	5,21 ± 4,15	5,36 ± 4,07

PLA 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con placebo

PLA 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con placebo

LCDG 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con Lactobacillus casei DG

LCDG 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con Lactobacillus casei DG

Tabella 6. Valori medi ± deviazione standard dei punteggi dei test Insomnia Severity Index (ISI), Epworth Sleepiness Scale (ESS) e Ford Insomnia Response to stress (FIRST) nelle diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come valore medio ± deviazione standard.

PSQI	PLA 0	PLA 1	LCDG 0	LCDG 1
COMP 1	1,13 ± 0,64	1,00 ± 0,53	1,27 ± 0,59	1,27 ± 0,70
COMP 2	1,07 ± 1,16	1,07 ± 0,88	1,07 ± 1,13	1,27 ± 1,10
COMP 3	1,27 ± 1,22	1,43 ± 1,25	1,53 ± 1,13	1,47 ± 1,28
COMP 4	0,67 ± 1,11	0,77 ± 1,13	0,87 ± 1,13	0,87 ± 1,36
COMP 5	1,27 ± 1,22	1,33 ± 1,18	1,33 ± 1,29	1,40 ± 1,12
COMP 6	1,20 ± 1,82	1,00 ± 1,85	1,13 ± 1,85	1,00 ± 1,77
COMP 7	1,33 ± 1,80	1,17 ± 1,75	1,03 ± 1,88	0,87 ± 1,81
TOT	6,50 ± 4,24	6,57 ± 2,95	6,86 ± 4,35	6,57 ± 4,11

PLA 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con placebo

PLA 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con placebo

LCDG 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con Lactobacillus casei DG

LCDG 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con Lactobacillus casei DG

COMP 1: Qualità soggettiva del sonno; COMP 2: Latenza del sonno; COMP 3: Durata del sonno;

COMP 4: Efficacia abituale del sonno; COMP 5: Disturbi del sonno; COMP 6: Uso di ipnotici

COMP 7: Disturbi durante il giorno

Tabella 7. Medie dei punteggi nel test Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) nelle diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come valore medio ± deviazione standard.

TEST	PLA 0	PLA 1	LCDG 0	LCDG 1
SF12	37,79 ± 4,61	38,21 ± 4,64	38,71 ± 4,08	37,86 ± 2,48
PQWI				
Ansia	49,14 ± 15,62	52,57 ± 18,49	56,86 ± 16,47	59,71 ± 17,64
Depressione	59,98 ± 12,82	61,43 ± 16,57	62,29 ± 13,20	63,62 ± 5,14
Benessere	52,70 ± 8,53	51,85 ± 11,07	49,82 ± 7,90	50,28 ± 9,11
Autocontrollo	35,21 ± 22,28	33,81 ± 16,63	37,05 ± 14,05	35,71 ± 10,66
Salute	46,21 ± 13,95	48,57 ± 14,89	40,48 ± 14,19	42,38 ± 15,38
Vitalità	49,64 ± 17,48	49,64 ± 12,48	41,21 ± 18,36	39,86 ± 13,83

PLA 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con placebo

PLA 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con placebo

LCDG 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con Lactobacillus casei DG

LCDG 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con Lactobacillus casei DG

Tabella 8. Medie dei punteggi dei test Short Form-12 (SF-12) e Psychological General Well Being Index (PGWI) nelle diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come valore medio ± deviazione standard.

POMS	PLA 0	PLA 1	LCDG 0	LCDG 1
Tensione	57,64 ± 13,70	56,93 ± 12,21	52,29 ± 11,19	50,71 ± 15,15
Depressione	62,84 ± 17,58	61,43 ± 15,50	55,71 ± 14,74	53,14 ± 18,05
Aggressività	64,36 ± 20,57	64,36 ± 18,39	53,43 ± 12,86	51,64 ± 17,61
Vigore	43,93 ± 9,81	43,71 ± 10,00	43,64 ± 11,76	46,64 ± 13,29
Stanchezza	60,93 ± 16,55	61,00 ± 17,79	55,86 ± 15,66	52,57 ± 17,05
Confusione	55,64 ± 12,14	55,71 ± 16,03	52,79 ± 13,34	51,86 ± 14,11

PLA 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con placebo

PLA 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con placebo

LCDG 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con Lactobacillus casei DG

LCDG 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con Lactobacillus casei DG

Tabella 9. Medie dei punteggi nel test del Profile of Mood State (POMS) nelle diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come valore medio ± deviazione standard.

TEST	PLA 0	PLA 1	LCDG 0	LCDG 1
PSS	22,79 ± 9,17	22,21 ± 7,01	17,29 ± 9,96	16,21 ± 9,57
SAS	37,43 ± 10,38	36,43 ± 8,68	37,57 ± 9,16	38,36 ± 10,59
STAI-Y	50,14 ± 13,81	48,14 ± 14,89	45,57 ± 14,58	46,79 ± 14,36

PLA 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con placebo

PLA 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con placebo

LCDG 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con Lactobacillus casei DG

LCDG 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con Lactobacillus casei DG

Tabella 10. Medie dei punteggi nei test Perceived Stress Scale (PSS), Self Rating Anxiety Scale (SAS), State-Trait Anxiety Inventory (STAI-Y) nelle diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come valore medio ± deviazione standard.

HADS	PLA 0	PLA 1	LCDG 0	LCDG 1
A	8,07 ± 4,29	7,83 ± 4,15	7,00 ± 3,80	6,50 ± 5,24
D	7,07 ± 4,76	6,71 ± 4,10	5,93 ± 4,20	5,50 ± 4,94

PLA 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con placebo

PLA 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con placebo

LCDG 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con Lactobacillus casei DG

LCDG 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con Lactobacillus casei DG

Tabella 11. Medie dei punteggi nei test Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) nelle diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come valore medio ± deviazione standard.

TMT	PLA 0	PLA 1	LCDG 0	LCDG 1
TMT-A	24,21 ± 9,56	22,86 ± 8,15	23,64 ± 6,86	21,29 ± 4,94
TMT-B	49,57 ± 18,64	51,36 ± 17,98	51,71 ± 27,35	49,29 ± 12,81

PLA 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con placebo

PLA 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con placebo

LCDG 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con Lactobacillus casei DG

LCDG 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con Lactobacillus casei DG

Tabella 12. Medie dei punteggi del Trail Making Test (TMT) A e B nelle diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come valore medio ± deviazione standard.

ECSI	PLA 0	PLA 1	LCDG 0	LCDG 1
Eye Contact	99,64 ± 1,34	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Flight	83,93 ± 43,82	85,36 ± 47,82	77,50 ± 47,02	82,71 ± 40,09
Submission	30,36 ± 17,04	30,00 ± 21,03	29,29 ± 21,38	32,14 ± 20,07
Affiliation	92,14 ± 35,56	92,50 ± 42,46	85,00 ± 48,08	84,29 ± 41,55
Gesture	45,00 ± 28,76	48,57 ± 28,45	56,79 ± 30,86	55,71 ± 26,74
Displacement	85,36 ± 35,81	88,93 ± 36,75	68,21 ± 25,77	69,64 ± 23,44
Assertion	86,79 ± 80,01	80,36 ± 77,89	83,21 ± 92,54	82,14 ± 85,77
Relaxation	20,00 ± 36,32	23,50 ± 42,10	11,43 ± 28,78	9,29 ± 26,66
Prosocial	122,50 ± 33,56	122,50 ± 43,67	114,29 ± 49,99	116,43 ± 45,84

PLA 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con placebo

PLA 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con placebo

LCDG 0: valori medi ± deviazione standard all'inizio del trattamento con Lactobacillus casei DG

LCDG 1: valori medi ± deviazione standard alla fine del trattamento con Lactobacillus casei DG

Tabella 13. Medie dei punteggi nell'analisi dei comportamenti non verbali mediante Ethological Coding System For Interview (ECSI) nelle diverse sessioni sperimentali. I dati sono riportati come valore medio ± deviazione standard.

5. DISCUSSIONE

Ad oggi sono molto pochi gli studi pubblicati che abbiano valutato l'efficacia della somministrazione di probiotici in pazienti con malattie digestive, esaminando contemporaneamente, attraverso metodiche affidabili, la modificazione della composizione del microbiota intestinale. Nella quasi totalità dei casi si è infatti proceduto ad una valutazione di efficacia solo sulla base dei sintomi (dolore addominale, gonfiore, frequenza evacuativa, etc) e della qualità di vita riferiti dal paziente.¹⁴⁴

Il presente studio, seppure condotto su un numero di pazienti certamente non elevato, ha evidenziato che la somministrazione di *Lactobacillus casei DG* ha determinato un aumento della concentrazione di questa specie alla fine del trattamento. Viene quindi ad essere confermata la capacità del farmaco, alle dosi somministrate, di resistere all'acidità gastrica e all'azione delle secrezioni biliari e pancreatiche e di riprodursi efficacemente nell'ambiente intestinale. Questo dato non deve sembrare ovvio perché attualmente sul mercato sono presenti molti prodotti etichettati come "probiotici", ma che troppo spesso non soddisfano i criteri richiesti dal Ministero della Salute.¹⁴⁵

- Origine umana
- Acido, bile, succo pancreatico resistente
- Capacità di aderire alla cellula intestinale
- Capacità di colonizzare l'intestino
- Capacità di produrre sostanze antimicrobiche
- Capacità di stimolare il sistema immunitario
- Chiara caratterizzazione genetica (genere, specie, ceppo chiaramente indicati)
- Effetti positivi sulla salute dell'ospite
- Sicurezza e «resistenza» nel tempo

Inoltre, vi è la necessità di indicazioni chiare per i consumatori e gli operatori sanitari su come differenziare i prodotti probiotici. Purtroppo, questo obiettivo è difficile da raggiungere a causa di restrizioni delle agenzie normative su ciò che può essere comunicato sulle etichette dei prodotti. Verosimilmente si dovrà anche limitare l'uso del termine probiotico sugli alimenti, come è già avvenuto in alcuni paesi europei per tutelare il consumatore/paziente.⁶²

Nel presente studio la somministrazione di *L. casei DG* ha inoltre indotto l'incremento della concentrazione di altre 6 specie batteriche (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. zeae*, *L.*

thailandensis, *L. camelliae* e *Pediococcus stilesii*) appartenenti tutte alla famiglia delle Lactobacillaceae e tutte, ad eccezione di *Pediococcus*, al genere *Lactobacillus*, cioè a quella famiglia e a quel genere ritenuto particolarmente benefico per l'organismo. In particolare *L. rhamnosus* e *L. paracasei* sono due specie utilizzate nella pratica clinica perché dotate di azione probiotica e, come tali, capaci di favorire l'eubiosi dell'ecosistema intestinale.

E' probabile che la somministrazione di *L. casei* DG abbia determinato un ambiente intestinale più favorevole allo sviluppo degli altri batteri attraverso la produzione di metaboliti attivi e protettivi. Per verificare tale ipotesi nei campioni fecali di tutti i pazienti, è stato eseguito il dosaggio di IgA, SCFAs e IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- γ , TNF- α , TGF- β (ELISA test).¹⁴⁶ IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α and IFN- γ sono tipiche citochine Th1 e sono coinvolte nelle risposte proinfiammatorie. Inoltre la presenza di queste citochine sono la conseguenza dell'attivazione di TLR3 e TLR7 durante i processi infiammatori. In particolare, la produzione di IL-15 è correlata all'attivazione delle cellule NK intestinali e il possibile danno tissutale provocato dalle cellule NK nell'infiammazione gastrointestinale.

TGF- β e IL-10 invece sono citochine regolatorie ben conosciute, capaci di sopprimere le risposte infiammatorie e di indurre il corretto equilibrio tra le risposte immuni di tipo Th1 e di tipo Th2.^{147, 148, 149}

Al momento della redazione della presente tesi tali dosaggi sono tuttora in corso per cui allo stato attuale la nostra rimane un'ipotesi, seppur molto verosimile.

Il trattamento con *Lactobacillus casei* DG non ha modificato significativamente le variabili clinico/sintomatologiche dell'IBS anche se è stato evidenziato un trend, peraltro non significativo, verso il miglioramento della Symptom Relief Scale tra la prima e la quarta settimana a favore del trattamento con *L. casei* DG nei confronti del placebo. Ciò non deve meravigliare perché è verosimilmente dovuto al fatto che in questo studio, che rimane comunque uno studio pilota, sono stati arruolati soltanto 14 pazienti. Infatti il costo delle metodiche utilizzate, in particolare il sequenziamento del genoma del microbiota intestinale e il dosaggio delle IgA, delle citochine e degli acidi grassi fecali, rendeva tale studio non facilmente proponibile su numeri più ampi in un solo centro.

Tuttavia, lo stesso protocollo è in fase di realizzazione in altri 4 centri gastroenterologici in Italia (Policlinico San Donato, Milano; Azienda ULSS 1, Belluno; Azienda Ospedaliero-Universitaria Sant'Orsola Malpighi, Bologna; Policlinico Universitario Campus Biomedico, Roma), nell'ambito di una collaborazione multicentrica i cui risultati apportheranno senz'altro ulteriore forza ai nostri risultati.

Sono state inoltre identificate due specie la cui concentrazione sembra essere predittiva rispettivamente delle caratteristiche delle feci e del dolore addominale. In particolare i soggetti con maggiori concentrazioni di *Candidatus Amoebophilus asiaticus* presentano più elevati valori della Bristol Stool Chart (cioè presenza di feci più morbide). Tale conclusione sembra avvalorata anche dal fatto che nel medesimo soggetto variazioni di concentrazione della stessa specie, rilevate nei diversi tempi in cui sono stati eseguiti i dosaggi, si correla positivamente con le variazioni della Bristol Stool Chart.

Invece, la concentrazione di *Blautia obeum* correla in maniera inversa con i livelli individuali di Numerical Rating Scale, cioè l'aumento della sua concentrazione appare legata ad una minor gravità del dolore addominale.

Infine, la presenza di *Bifidobacterium ruminantium* è risulta correlarsi in maniera positiva con il miglioramento del benessere psicologico valutato con il Psychological General Well Being Index: tale dato avvalorata senz'altro la possibilità che una modifica del microbiota intestinale possa avere effetti benefici sugli aspetti psicologici e sulla qualità di vita. E' verosimile che la produzione di sostanze come serotonina e interleuchine ad azione antinfiammatoria possa svolgere un ruolo determinante in questo senso²⁸. Anche in questo caso il dosaggio dei prodotti metabolici presenti nelle feci, e che è attualmente in corso, potrebbe apportare ulteriori elementi di chiarezza.

6. CONCLUSIONI

Per quanto la scarsa numerosità del campione possa consentire di trarre conclusioni definitive è possibile dire che il trattamento con il probiotico Enterolactis Plus® (*Lactobacillus casei* DG), alle dosi e nelle modalità descritte nel protocollo di questo studio, ha determinato un aumento della concentrazione di questa specie batterica alla fine del trattamento, dimostrando di soddisfare pienamente tutti i criteri per la definizione di un “vero” probiotico forniti dall’OMS e dal Ministero della Salute.^{145, 62}

Nel presente studio il trattamento con *Lactobacillus Casei* DG ha inoltre indotto l’incremento della concentrazione di altre 6 specie batteriche (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. zeae*, *L. thailandensis*, *L. camelliae* e *Pediococcus stilesii*) appartenenti tutte alla famiglia delle *Lactobacillaceae* e tutte, ad eccezione di *Pediococcus*, al genere *Lactobacillus*, cioè a quella famiglia e a quel genere ritenuti particolarmente benefici per l’organismo. Probabilmente la somministrazione di *L. casei* ha determinato un ambiente intestinale più favorevole allo sviluppo degli altri batteri attraverso la produzione di metaboliti attivi e protettivi.

Tra quest’ultime specie batteriche spiccano *L. rhamnosus* e *L. paracasei*, che sono due specie presenti in prodotti farmaceutici e molto utilizzate nella pratica clinica perché dotate d’azione probiotica e, come tali, capaci di favorire l’eubiosi dell’ecosistema intestinale.

In questo studio il trattamento con Enterolactis Plus® non ha modificato significativamente le variabili cliniche considerate dell’IBS, anche se è stato evidenziato un trend, peraltro non significativo, verso il miglioramento della Symptom Relief Scale tra la prima e la quarta settimana a favore del trattamento con *Lactobacillus casei* DG nei confronti del placebo.

Ciò non deve meravigliare perché è verosimilmente dovuto al fatto che in questo studio, che rimane comunque uno studio pilota, sono stati arruolati soltanto 14 pazienti. Infatti il costo delle metodiche utilizzate, in particolare il sequenziamento del genoma del microbiota intestinale e il dosaggio delle IgA, delle citochine e degli SCFA fecali, rendeva tale studio non facilmente proponibile su numeri più ampi in un solo centro. E’ probabile che l’ampliamento della casistica renda tale trend più evidente.

È importante rimarcare che durante lo studio sono state identificate due specie la cui concentrazione sembra essere predittiva rispettivamente delle caratteristiche delle feci e del dolore addominale: in particolare i soggetti con maggiori concentrazioni di *Candidatus Amoebophilus asiaticus* presentano più elevati valori della Bristol Stool Chart (cioè presenza

di feci più morbide). Tale conclusione sembra avvalorata anche dal fatto che nel medesimo soggetto variazioni di concentrazione della stessa specie, rilevate nei diversi tempi in cui sono stati eseguiti i dosaggi, si correla positivamente con le variazioni della Bristol Stool Chart (vedi figure 17 e 18).

Mentre la concentrazione di *Blautia obeum* correla in maniera inversa con i livelli individuali di NRS, cioè l'aumento della sua concentrazione appare legata ad una minore gravità del dolore addominale (vedi figura 19).

Infine è interessante rilevare che la presenza di *Bifidobacterium ruminantium* risulta correlarsi in maniera positiva con il miglioramento del benessere psicologico valutato con il Psychological General Well Being Index.

Tale dato avvalora senz'altro la possibilità che una modifica del microbiota intestinale possa avere effetti benefici sugli aspetti psicologici e sulla qualità di vita. E' verosimile che la produzione di sostanze come serotonina e interleuchine ad azione antinfiammatoria possano svolgere un ruolo determinante in questo senso, richiamando il concetto di psicobiota.

Il dosaggio dei prodotti metabolici presenti nelle feci, che è attualmente in corso, potrebbe apportare ulteriori elementi di chiarezza.

Questi risultati sono molto suggestivi, ma parimenti devono essere confermati su un campione di pazienti più ampio: il medesimo protocollo è in fase di realizzazione in altri 4 centri gastroenterologici italiani nell'ambito di una collaborazione multicentrica i cui risultati sono attesi nei prossimi mesi.

In ogni caso la ricerca, sia preclinica che clinica, può fornire un decisivo apporto alla comprensione del complicato e multiforme rapporto tra il microbiota intestinale e l'organismo umano, sia nelle condizioni di normalità che in presenza di una patologia quale l'IBS.

Inoltre, dal presente studio trae ulteriore forza la necessità di una più stretta collaborazione tra microbiologia, neurobiologia, biochimica, immunologia, gastroenterologia, genetica, epidemiologia e farmacologia al fine di ottenere una migliore comprensione di questa così frequente e invalidante patologia.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1- Unigastro - Mazzella - Milani – Sturniolo. Manuale di gastroenterologia. Edizione 2013 – 2015. Editore: Il Pensiero Scientifico.
- 2- Bellini M, Gambaccini D, Usai-Satta P, De Bortoli N, Bertani L, Marchi S, Stasi C. Irritable bowel syndrome and chronic constipation: Fact and fiction. *World J Gastroenterol*. 2015 Oct 28;21(40):11362-70.
- 3- Brandt LJ, Chey WD, Foxx-Orenstein AE, et al. American College of gastroenterology Task Force on IBS. Systematic review on the management of irritable bowel syndrome in North America. *Am J Gastroenterol* 2209; 104(Suppl 1):S1-35.
- 4- Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 10th Edition. 2015. Editore: Elsevier
- 5- Spiller R, Aziz Q, Creed F, Emmanuel A, Houghton L, Hungin P, et al. Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut* 2007; 56:1770-98.
- 6- Talley N, Spiller RC. Irritable bowel syndrome: A little understood organic bowel disease? *Lancet* 2022; 360:555-64.
- 7- Bellini M, Gambaccini D, Stasi C, Urbano MT, Marchi S, Usai-Satta P. Irritable bowel syndrome: a disease still searching for pathogenesis, diagnosis and therapy. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 21; 20(27):8807-20.
- 8- Gecse K, Roka R, Ferrier L, et al. Increased faecal serine protease activity i diarrhoeic IBS patients: A colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 2008; 57:591-9.
- 9- Drossman DA, Corraziari E, Delvaux M, et al. *Roma III: The functional Gastrointestinal Disorders*. 3rd ed. McLean, Va: Degnon Associates; 2006.
- 10- Hiatt RB, Katz L. Mast cells in inflammatory conditions of the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 1962; 37:541-5.
- 11- Ringel Y, Drossman DA, Leserman JL, et al. Effect of abuse history on pain reports and brain responses to aversive visceral stimulation: An FMRI study. *Gastroenterology* 2008; 103:396-404.
- 12- Stasi C, Bellini M, Costa F, Mumolo MG, Ricchiuti A, Grosso M, Duranti E, Metelli MR, Gambaccini D, Bianchi L, Di Tanna GL, Laffi G, Taddei S, Marchi S. Neuroendocrine markers and psychological features in patients with irritable bowel syndrome. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Sep;28(9):1203-8.
- 13- Bengtson MB, Ronning T, Vatn MH, et al. Irritable bowel syndrome in twins: Genes and environment. *Gut* 2006; 55:1754-9.
- 14- Colucci R, Blandizzi C, Bellini M, Ghisu N, Tonini M, Del Tacca M. The genetics of the serotonin transporter and irritable bowel syndrome. *Trends Mol Med*. 2008 Jul;14(7):295-304.
- 15- Saito YA, Talley NJ. Genetics of irritable bowel syndrome. *AmJ Gastroenterol* 2008; 103:2100-4.
- 16- Hammer J, Eslick G, Howell S, et al. Diagnostic yield of alarm features in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Gut* 2004; 53:666-72.
- 17- Staudacher HM, Whelan K. Altered gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome and its modification by diet: probiotics, prebiotics and the low FODMAP diet. *Proc Nutr Soc*. 2016 Feb 24:1-13.
- 18- Molina-Infante J, Serra J, Fernandez-Bañares F, Mearin F. The low-FODMAP diet for irritable bowel syndrome: Lights and shadows. *Gastroenterol Hepatol*. 2016 Feb;39(2):55-65.

- 19- Ford AC, Talley NJ, Spiegel BM, et al. Efficacy of fibre, antispasmodics and peppermint oil in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008; 337:a2313.
- 20- Stasi C, Bellini M, Bassotti G, Blandizzi C, Milani S. Serotonin receptors and their role in the pathophysiology and therapy of irritable bowel syndrome. *Tech Coloproctol*. 2014 Jul;18(7):613-21.
- 21- Camilleri M, Atanasova E, Carlson PJ, et al. Serotonin-transporter polymorphism pharmacogenetics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123:425-32.
- 22- Drossman D, Toner BB, Whitehead WE, et al. Cognitive-behavioral therapy versus education and desipramine versus placebo for moderate to severe functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2003; 125:19-31.
- 23- Pimentel M, Park S, Mirocha J, et al. The effect of a nonabsorbed oral antibiotic (rifaximin) on the symptoms of the irritable bowel syndrome: A randomized trial. *Ann Intern Med* 2006; 145:557-63.
- 24- Brucker RM, Bordenstein SR. The capacious hologenome. *Zoology (Jena)*. (2013). 116, 260–261.
- 25- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol*. (2007). 5, 355–362.
- 26- Rosenberg E, Sharon G, Zilber-Rosenberg I. The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environ Microbiol*. (2009). 11, 2959–2962.
- 27- Arumugam M, Raes J, Pelletier E et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. (2011). 473, 174–180.
- 28- Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biol Psychiatry*. 2013 Nov 15;74(10):720-6.
- 29- Misra S, Medhi B. Role of probiotics as memory enhancer. *Indian J Pharmacol*. (2013). 45, 311–312.
- 30- Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. Microbial genes, brain & behaviour – epigenetic regulation of the gut–brain axis. *Genes Brain Behav*. 2014 Jan;13(1):69-86.
- 31- Moloney RD, Johnson AC, O'Mahony SM,3, Dinan TG, Greenwood-Van Meerveld B, Cryan JF. Stress and the Microbiota–Gut–Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. *CNS Neurosci Ther*. 2016 Feb;22(2):102-17.
- 32- Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res J Lab Clin Med*. (2012). 160, 246–257.
- 33- Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, Mende DR, Kultima JR, Martin J, Kota K, Sunyaev SR, Weinstock GM, Bork P. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*. (2013) 493, 45–50.
- 34- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. (2007). 449, 804–810.
- 35- Qin J, Li R, Raes J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. (2010). 464, 59–65.
- 36- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. (2012). 488, 178–184.
- 37- Fond G, Boukouaci W, Chevalier G, Regnault A, Eberl G, Hamdani N, Dickerson F, Macgregor A, Boyer L, Dargel A, Oliveira J, Tamouza R, Leboyer M. The "psychomicrobiotic": Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review. *Pathol Biol (Paris)*. 2015 Feb;63(1):35-42.

- 38- Forsythe P, Kunze WA. Voices from within: gut microbes and the CNS. *Cell Mol Life Sci.* (2013). 70, 55–69.
- 39- Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol.* (2008). 24, 4–10.
- 40- Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr.* (1972). 25, 1292–1294.
- 41- Parent A, Carpenter MB. (1996) *Carpenter’s Human Neuroanatomy.* Williams & Wilkins, Baltimore.
- 42- Bennet SM, Ohman L, Simren M. Gut Microbiota as Potential Orchestrators of Irritable Bowel Syndrome. *Gut Liver.* 2015 May 23;9(3):318-31.
- 43- Zhu B, Wang X, Li L. Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell.* (2010). 1, 718–725.
- 44- Sommer F, Backhed F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* (2013). 11, 227–238.
- 45- Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HG, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:1792-1801.
- 46- Wexler HM. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* (2007). 20:593-621.
- 47- Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, et al. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol.* (2005). 100:373-382.
- 48- Zhou L, Foster JA. Psychobiotics and the gut–brain axis: in the pursuit of happiness. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015 Mar 16;11:715-23.
- 49- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* (2012). 486, 222-227.
- 50- Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 2016 Feb;158:52-62.
- 51- Morelli L. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *J Nutr.* (2008). 138, 1791S-1795S.
- 52- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, Van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* (2006). 118, 511-521.
- 53- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (2000). 30, 61-67.
- 54- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (2011). 108 Suppl 1, 4578-4585.
- 55- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* (2002). 22, 283-307.

- 56- Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*. (1980). 21, 793-798.
- 57- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. (2006). 40, 235-243.
- 58- Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil*. (2011). 23(3):187–92.
- 59- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. (2011). 334(6052):105–8.
- 60- Burnet PW, Cowen PJ. Psychobiotics Highlight the Pathways to Happiness. *Biol Psychiatry*. 2013 Nov 15;74(10):708-9.
- 61- Dlugosz A, Winckler B, Lundin E, Zakikhany K, Sandström G, Ye W, Engstrand L, Lindberg G. No difference in small bowel microbiota between patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *Sci Rep*. 2015 Feb 17;5:8508.
- 62- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506-14.
- 63- Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. (1965). 147(3659):747–8.
- 64- Sha S, Liang J, Chen M, Xu B, Liang C, Wei N, Wu K. Systematic review: faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 May;39(10):1003-32.
- 65- Insel T (2012): National Institute of Mental Health. Director's Blog. Available at: <http://www.nimh.nih.gov/about/director/index.shtml>. Accessed January 15, 2013.
- 66- Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (2011). 108, 16050–16055.
- 67- Dinan TG, Cryan JF. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression?. *Neurogastroenterol.Motil*. (2013). 25, 713–719.
- 68- Smythies LE, Smythies JR. Microbiota, the immune system, black moods and the brain — melancholia updated. *Front Hum Neurosci*. 2014 Sep 15;8:720.
- 69- Brauser D. Probiotics a Potential Treatment for Mental Illness. *Medscape*. Nov 19, 2013.
- 70- Logan AC, Katzman M. Major depressive disorder: Probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses*. (2005). 64:533–538.
- 71- Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *Bioessays*. (2011). 33:574–581.
- 72- Roshchina VV. Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. *Springer*. (2010). 17–52.
- 73- Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res*. (2008). 43:164–174.

- 74- Stasi C, Rosselli M, Bellini M, Laffi G, Milani S. Altered neuro-endocrine-immune pathways in the irritable bowel syndrome: the top-down and the bottom-up model. *J Gastroenterol.* 2012 Nov;47(11):1177-85.
- 75- Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol.* 2015 Apr-Jun;28(2):203-209.
- 76- Tannock GW, Savage DC. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun.* (1974). 9:591–598.
- 77- Sudo N. Stress and gut microbiota: Does postnatal microbial colonization program the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response?. *Int Congr Ser.* (2006). 1287:350–354.
- 78- Neufeld K, Kang N, Bienenstock J, Foster J. Reduced anxiety like behavior and central neurochemical change in germ free mice. *Neurogastroenterol Motil.* (2011). 23:255–264.
- 79- Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience.* (2010). 170:1179–1188.
- 80- Gareau MG, Silva MA, Perdue MH. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med.* (2008). 8:274–281.
- 81- McKernan DP, Fitzgerald P, Dinan TG, Cryan JF. The probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 displays visceral antinociceptive effects in the rat. *Neurogastroenterol Motil.* (2010). 22:1029–1035.
- 82- Macpherson AJ, Uhr T. Gut flora—mechanisms of regulation. *Eur J Surg Suppl.* (2002). (587):53–57.
- 83- Emanuele E, Orsi P, Boso M, Broglia D, Brondino N, Barale F, et al. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neurosci Lett.* (2010). 471(3): 162–5.
- 84- Severance EG, Gressitt KL, Stallings CR, Origoni AE, Khushalani S, Leweke FM et al. Discordant patterns of bacterial translocation markers and implications for innate immune imbalances in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2013;148(1–3):130–7.
- 85- Cenac N, Bautzova T, Le FP, et al. Quantification and potential functions of endogenous agonists of transient receptor potential channels in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2015;149:433–444, e7.
- 86- Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacol Res.* (2013). 69, 75-86.
- 87- Ford AC, Spiegel BM, Talley NJ, Moayyedi P. Small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* (2009). 7:1279-1286.
- 88- Lepage P, Hasler R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinkas L, Dore J, Raedler A, Schreiber S. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology.* (2011). 141, 227-236.
- 89- Sokol H, Lepage P, Seksik P, Dore J, Marteau P. Molecular comparison of dominant microbiota associated with injured versus healthy mucosa in ulcerative colitis. *Gut.* (2007). 56, 152-154.
- 90- Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Dore J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* (2009). 15, 1183-1189.
- 91- Rooks MG, Garrett WS. Bacteria, food, and cancer. *F1000 Biol Rep.* (2011). 3, 12.
- 92- Shenderov BA. Gut indigenous microbiota and epigenetics. *Microb Ecol Health Dis.* (2012). 23.

- 93- Waby JS, Chirakkal H, Yu C, Griffiths GJ, Benson RS, Bingle CD, Corfe BM. Sp1 acetylation is associated with loss of DNA binding at promoters associated with cell cycle arrest and cell death in a colon cell line. *Mol Cancer*. (2010). 9, 275.
- 94- Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. (2013). 155, 1451-1463.
- 95- Kaneko M, Hoshino Y, Hashimoto S, Okano T, Kumashiro H. Hypothalamic pituitary-adrenal axis function in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Autism Dev Disord*. (1993). 23, 59-65.
- 96- King JA, Barkley RA, Barrett S. Attention-deficit hyperactivity disorder and the stress response. *Biol Psychiatry*. (1998). 44, 72-74.
- 97- Ming X, Stein TP, Barnes V, Rhodes N, Guo L. Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: a metabolomics study. *J Proteome Res*. (2012). 11, 5856-5862.
- 98- Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. (2010). 16, 444-453.
- 99- Finegold SM, Downes J, Summanen PH. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*. (2012). 18, 260-262.
- 100- Mezzelani A, Landini M, Facchiano F, Raggi ME, Villa L, Molteni M, De Santis B, Brera C, Caroli AM, Milanese L, Marabotti A. Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: A translational hypothesis for regressive autism pathogenesis. *Nutr Neurosci*. (2014).
- 101- Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol*. (2004). 70, 6459-6465.
- 102- Finegold SM. Therapy and epidemiology of autism--clostridial spores as key elements. *Med Hypotheses*. (2008). 70, 508-511.
- 103- Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Vaisanen ML, Nelson MN, Wexler HM. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol*. (2000). 15, 429-435.
- 104- Partty A, Kalliomaki M, Wacklin P, Salminen S, Isolauri E. A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. *Pediatr Res* (2015). 77, 823-828.
- 105- Villaran RF, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, De Pablos RM, Arguelles S, Delgado-Cortes MJ, Sobrino V, Van Rooijen N, Venero JL, Herrera AJ, Cano J, Machado A. Ulcerative colitis exacerbates lipopolysaccharide-induced damage to the nigral dopaminergic system: potential risk factor in Parkinson's disease. *J Neurochem*. (2010). 114, 1687-1700.
- 106- Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*. (2006). 396, 67-72.
- 107- Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Bjorklund T, Wang ZY, Roybon L, Melki R, Li JY. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol*. (2014). 128, 805-820.

- 108- Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, Coron E, Bruley des Varannes S, Naveilhan P, Nguyen JM, Neunlist M, Derkinderen P. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* (2013). 50, 42-48.
- 109- Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord.* (2015). 30, 350-358.
- 110- Brenner SR. Blue-green algae or cyanobacteria in the intestinal micro-flora may produce neurotoxins such as Beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) which may be related to development of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease and Parkinson-Dementia-Complex in humans and Equine Motor Neuron Disease in horses. *Med Hypotheses.* (2013). 80, 103.
- 111- Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sorensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE.* (2010). 5, e9085.
- 112- Shin JH, Ko HS, Kang H, Lee Y, Lee YI, Pletinkova O, Troconso JC, Dawson VL, Dawson TM. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell.* (2011). 144, 689-702.
- 113- Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2013). 110, 9066-9071.
- 114- Lahiri DK, Maloney B. The "LEARN" (Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer's disease, and proposes remedial steps. *Exp Gerontol.* (2010). 45, 291-296.
- 115- Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (1996). 93, 15036-15040.
- 116- Flint HJ. Obesity and the gut microbiota. *J Clin Gastroenterol.* (2011). 45 Suppl, S128-132.
- 117- Ravussin Y, Koren O, Spor A, LeDuc C, Gutman R, Stombaugh J, Knight R, Ley RE, Leibel RL. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity (Silver Spring).* (2012). 20, 738-747.
- 118- Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*, vol. 32, n° 9, settembre 1997, pp. 920-4.
- 119- Hartrick CT, Kovan JP, Shapiro S. The numeric rating scale for clinical pain measurement: a ratio measure?. *Pain Pract (December 2003).* 3 (4): 310-6.
- 120- Mc Nair DM, Lorr M, Droppleman LF. Edits manual for the profile of mood states. Edits Educational & Industrial Testing Service 1992.
- 121- Grant KA, McMahon C, Austin MP. Maternal anxiety during the transition to parenthood: a prospective study. *Journal of Affective Disorders.* (2008). 108(1-2):101-11.
- 122- Spielberger CD, Palo Alto CA. State-Trait Anxiety Inventory: A comprehensive bibliography. Consulting Psychologist Press. 1983

- 123- William WK, Zung MD. A Rating Instrument For Anxiety Disorders. *Psychosomatics*. 1971. 12.6: 371–379.
- 124- Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatrica Scandinavica* (1983). 67(6):361-370.
- 125- Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research*. (1989). 28(2):193-213.
- 126- Lackner JM, Ma CX, Keefer L, Brenner DM, Gudleski GD, Satchidanand N, Firth R, Sitrin MD, Katz L, Krasner SS, Ballou SK, Naliboff BD, Mayer EA. Type, rather than number, of mental and physical comorbidities increases the severity of symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Sep;11(9):1147-57.
- 127- Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. (1991). 14(6):540-5.
- 128- Drake C, Richardson G, Roehrs T, Scofield H, Roth T. Vulnerability to Stress-related Sleep Disturbance and Hyperarousal. *Sleep*. (2004). 27(2):285-291.
- 129- Cohen S, Williamson G. Perceived stress in a probability sample of the United States. In S. Spacapan & S. Oskamp (Eds.), *The social psychology of health: Claremont Symposium on applied social psychology*. Newbury Park, CA: Sage. 1988.
- 130- Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R. A global measure of perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior*. (1983). 24: 385-396.
- 131- Ryff CD, Lee KLM. The structure of psychological well-being revisited. *Journal of Personality and Social Psychology*. (1995). 69(4):719-727.
- 132- Ware Jr, Kosinski M, Keller SD. A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Medical Care*. (1996). 34(3):220-33.
- 133- Crowe SF. The differential contribution of mental tracking, cognitive flexibility, visual search, and motor speed to performance on parts A and B of the Trail Making Test. *Journal of Clinical Psychology*. (1998). 54(5): 585-91.
- 134- Troisi A, Moles A. Gender differences in depression: an ethology study of nonverbal study of drug-free patients. *Neuroscience Biobehavioral Review*. (1999). 23(7): 905-913.
- 135- Salvador A. Coping with competitive situation in human. *Neuroscience Biobehavioral Review*. (2005). 195-205.
- 136- Troisi A, Spalletta G, Pasini A. Non-verbal behavior deficits in schizophrenia: an ethological study of drug-free patients. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. (1998). 97: 109-115.
- 137- Jones IH, Pansa M. Some nonverbal aspects of depression and schizophrenia occurring during the interview. *Journal of mental disease*. (1979). 402-409.
- 138- Qin, J. *et al*. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65 (2010).
- 139- The Human Microbiome Project Consortium. Affiliations Contributions Corresponding author. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214 (14 June 2012) .
- 140- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin R, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-

- source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23), 7537-7541. (2009).
- 141- Bellini M, Gemignani A, Gambaccini D, Toti S, Menicucci D, Stasi C, Costa F, Mumolo MG, Ricchiuti A, Bedini R, de Bortoli N, Marchi S. Evaluation of latent links between irritable bowel syndrome and sleep quality. *World J Gastroenterol*. 2011 Dec 14;17(46):5089-96.
- 142- Zani S.; *Analisi dei dati statistici*, vol. I; 1994; Giuffrè editore; Milano
- 143- Spearman C. 1904. The proof and measurement of association between two things. *American Journal of Psychology* 15: 72–101.
- 144- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 2010;59:325-32.
- 145- Ministero della Salute. Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria, Sicurezza alimentare e Organi Collegiali per la Tutela della Salute. Direzione generale Igiene e Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione. Ufficio IV ex DG SAN. *Linee Guida su Probiotici e Prebiotici*. Revisione Maggio 2013
- 146- Ferrario et al. Modulation of Fecal Clostridiales Bacteria and Butyrate by Probiotic Intervention with *Lactobacillus paracasei* DG Varies among Healthy Adults. *J Nutr*. 2014 Nov; 144(11):1787-96.
- 147- Christensen HR, Frøkiær H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:171–8.
- 148- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
- 149- Eun CS, Kim YS, Han DS, Choi JH, Lee AR, Park YK. *Lactobacillus casei* prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. *APMIS* 2011;119:49-56.

8. APPENDICE

PITTSBURGH SLEEP QUALITY INDEX PSQI - # 925			
Cognome e Nome.....		Data di nascita.....	
Codice Paziente.....		Valutatore.....	
Data valutazione.....			
ISTRUZIONI:			
<i>Le domande che seguono si riferiscono alle sue abitudini di sonno <u>soltanto</u> durante il mese passato. Le sue risposte dovrebbero essere quanto più accurate possibile <u>per la maggior parte</u> dei giorni e delle notti del mese passato. Cerchi di rispondere a tutte le domande.</i>			
1. Durante il mese passato, a che ora è andato a letto, di solito? ORA IN CUI VA A LETTO: _____			
2. Durante il mese passato, quanto tempo (in minuti) gli è occorso, in generale, per prendere sonno? NUMERO DI MINUTI: _____			
3. Durante il mese passato, a che ora si è alzato, di solito, al mattino? ORA A CUI SI È ALZATO: _____			
4. Durante il mese passato, quante ore di <u>sonno effettivo</u> ha dormito alla notte? (Questo può essere diverso dal numero di ore trascorse a letto) ORE DI SONNO PER NOTTE: _____			
Per ciascuna delle seguenti domande, indichi la risposta più adatta alla sua realtà. Risponda, per favore, a <u>tutte</u> le domande.			
5. Durante il mese passato, con quale frequenza ha avuto difficoltà di sonno poiché...			
a) Non riusciva ad addormentarsi entro 30 minuti			
Mai durante il mese passato _____	Meno di una volta alla settimana _____	Una o due volte alla settimana _____	Tre o più volte alla settimana _____
b) Si svegliava nel mezzo della notte o presto al mattino			
Mai durante il mese passato _____	Meno di una volta alla settimana _____	Una o due volte alla settimana _____	Tre o più volte alla settimana _____
c) Doveva alzarsi per andare in bagno			
Mai durante il mese passato _____	Meno di una volta alla settimana _____	Una o due volte alla settimana _____	Tre o più volte alla settimana _____
d) Non riusciva a respirare in maniera soddisfacente			
Mai durante il mese passato _____	Meno di una volta alla settimana _____	Una o due volte alla settimana _____	Tre o più volte alla settimana _____

e) Tossiva o russava rumorosamente			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
f) Sentiva troppo freddo			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
g) Sentiva troppo caldo			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
h) Faceva brutti sogni			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
i) Aveva dolori			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
j) Altra/e ragione/i (descrivere: _____)			
Con quale frequenza, nel corso dell'ultimo mese, ha avuto difficoltà a dormire per questo?			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
6. Come giudica, globalmente, la qualità del suo sonno durante il mese scorso?			
Molto buona ___	Abbastanza buona ___	Abbastanza cattiva ___	Molto cattiva ___
7. Nel corso del mese passato, con quale frequenza ha assunto farmaci (prescritti o da banco) per migliorare il suo sonno?			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
8. Nel corso del mese passato, con quale frequenza ha avuto difficoltà a rimanere sveglio durante la guida, mentre mangiava o quando era coinvolto in attività sociali?			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
9. Nel corso del mese passato, in che misura è stato per lei un problema mantenere abbastanza entusiasmo per fare le cose appropriatamente?			
Nessun problema ___	Problema molto modesto ___	Un discreto problema ___	Un problema molto serio ___

10. Ha un partner di letto o un compagno di stanza?			
Nessun partner o compagno ___	Partner o compagno in altra stanza ___	Partner nella stanza ma non nel letto ___	Partner nello stesso letto ___
Se lei ha un compagno di stanza o un partner di letto, gli chieda con quale frequenza, nel corso del mese passato, lei...			
a) Russava rumorosamente			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
b) Aveva lunghe pause del respiro mentre dormiva			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
c) Aveva contrazioni o scosse delle gambe mentre dormiva			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
d) Aveva episodi di disorientamento o di confusione durante il sonno			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___
e) Altri tipi di agitazione mentre dormiva (descrivere: _____)			
Mai durante il mese passato ___	Meno di una volta alla settimana ___	Una o due volte alla settimana ___	Tre o più volte alla settimana ___

Tavola 1: Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)

The Insomnia Severity Index (ISI)

Nome e Cognome: _____ Data: _____

1. Valuti la gravità attuale (nell'ultimo mese) dei suoi problemi d'insonnia.

	No	Lieve	Media	Grave	Molto grave
a) Difficoltà ad addormentarsi	0	1	2	3	4
b) Difficoltà a restare addormentato	0	1	2	3	4
c) Risveglio troppo precoce	0	1	2	3	4

2. Quanto si sente soddisfatto/insoddisfatto del suo sonno attuale?

Molto Soddisfatto	Soddisfatto	Neutro	Non molto soddisfatto	Molto insoddisfatto
0	1	2	3	4

3. In quale misura ritiene che il problema di insonnia interferisca con la sua efficienza diurna (per es., affaticamento diurno, capacità di svolgere lavori/faccende di casa, concentrazione, memoria, umore ecc.)?

Per nulla	Un po'	Abbastanza	Molto	Moltissimo
0	1	2	3	4

4. Quanto pensa che il suo problema di insonnia sia evidente agli altri, in termini di peggioramento della qualità della sua vita?

Per nulla	Un po'	Abbastanza	Molto	Moltissimo
0	1	2	3	4

5. Quanto si sente preoccupato/stressato a causa del suo attuale problema di insonnia?

Per nulla	Un po'	Abbastanza	Molto	Moltissimo
0	1	2	3	4

Tavola 2: Insomnia Severity Index (ISI)

Epworth sleepiness scale – ESS

Cognome e Nome..... Codice

Data di valutazione..... Valutatore.....

Quale probabilità ha di appisolarsi o di addormentarsi nelle seguenti situazioni, in contrasto con il fatto che si sentiva solo stanco?

Faccia riferimento al suo normale stile di vita in questo periodo.

Anche se non si è verificata di recente qualcuna delle situazioni descritte, cerchi di immaginare come queste avrebbero potuto agire su di lei.

Usi la scala seguente per scegliere il numero di volte che meglio si adatta a ciascuna situazione:

0= Non mi sarei mai appisolato

1= Scarsa probabilità di appisolarmi

2= Moderata probabilità di appisolarmi

3= Alta probabilità di appisolarmi

Metta un numero (da 0 a 3) in ciascuno degli 8 riquadri.

SITUAZIONI	Probabilità di addormentarsi (0-3)
1. Star seduto a leggere
2. Guardare la TV
3. Star seduto, inattivo, in un luogo pubblico (ad es. teatro, conferenza)
4. Viaggiare per un'ora in macchina, senza interruzioni, come passeggero
5. Sdraiarsi per riposarsi nel pomeriggio, quando le circostanze lo consentono
6. Star seduto a parlare con qualcuno
7. Star seduto tranquillo dopo un pranzo senza aver bevuto alcolici
8. In macchina, mentre è fermo per pochi minuti nel traffico

Tavola 3: Epworth Sleepiness Scale (ESS)

Ford Insomnia Response to Stress Test (FIRST)

Quando lei vive le situazioni della vita elencate di seguito poi ha difficoltà a dormire? Risponda indicando con un cerchietto la risposta che le si addice.

1 - Il giorno precedente una riunione importante ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

2 - Dopo un evento stressante accaduto nella giornata ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

3 - Dopo un evento stressante accaduto nella serata ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

4 - Dopo aver ricevuto una brutta notizia durante il giorno ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

5 - Dopo aver visto un film spaventoso ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

6 - Dopo aver avuto una brutta giornata a lavoro ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

7 - Dopo una discussione ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

8 - Il giorno prima di dover parlare in pubblico ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

9 - Prima di partire per una vacanza ha difficoltà a dormire?

1. Mai 2. Talvolta 3. Spesso 4. Molto frequentemente

Nel mese passato per quanto tempo si è sentito stressato? _____

Nel mese passato quante volte le è capitato che lo stress le danneggiasse il sonno? _____

Che tipo di stress? _____

Tavola 4: Ford Insomnia Response to stress (FIRST)

Profile of Mood States

- POMS -

ISTRUZIONI La seguente lista comprende sensazioni che tutti possiamo avere. Per favore, legga con attenzione ciascuna voce e annerisca quello dei cinque cerchietti, sulla destra, che meglio descrive come si è sentito nell'ultima settimana. Tenga presente che i numeri nei cerchietti hanno i seguenti valori:
0 = PER NULLA **1 = UN POCO** **2 = UNA VIA DI MEZZO**
3 = MOLTO **4 = MOLTISSIMO**

1. Teso	0 1 2 3 4	21. Scontroso	0 1 2 3 4	41. Ribelle	0 1 2 3 4
2. Arrabbiato	0 1 2 3 4	22. A disagio	0 1 2 3 4	42. Senza aiuto, abbandonato	0 1 2 3 4
3. Stressato	0 1 2 3 4	23. Irrequieto	0 1 2 3 4	43. Annoiato	0 1 2 3 4
4. Infelice	0 1 2 3 4	24. Incapace di concentrarmi	0 1 2 3 4	44. Perplesso	0 1 2 3 4
5. Pieno di vita	0 1 2 3 4	25. Stanco	0 1 2 3 4	45. Pronto, in gamba	0 1 2 3 4
6. Con le idee confuse	0 1 2 3 4	26. Seccato	0 1 2 3 4	46. Deluso	0 1 2 3 4
7. Scontento di quello che ho fatto	0 1 2 3 4	27. Scoraggiato	0 1 2 3 4	47. Furibondo	0 1 2 3 4
8. Con un tremito diffuso	0 1 2 3 4	28. Pieno di risentimento	0 1 2 3 4	48. Efficiente	0 1 2 3 4
9. Svogliato	0 1 2 3 4	29. Nervoso	0 1 2 3 4	49. Pieno di iniziativa	0 1 2 3 4
10. Irritato	0 1 2 3 4	30. Solo, isolato dagli altri	0 1 2 3 4	50. Di cattivo umore	0 1 2 3 4
11. Malinconico	0 1 2 3 4	31. Avvilito	0 1 2 3 4	51. Persona di poco valore	0 1 2 3 4
12. Attivo	0 1 2 3 4	32. Scorbussolato	0 1 2 3 4	52. Smemorato	0 1 2 3 4
13. Coi nervi a fior di pelle	0 1 2 3 4	33. Di buon umore	0 1 2 3 4	53. Libero da preoccupazioni	0 1 2 3 4
14. Immusonito	0 1 2 3 4	34. Amareggiato	0 1 2 3 4	54. Terrorizzato	0 1 2 3 4
15. Triste	0 1 2 3 4	35. Esaurito	0 1 2 3 4	55. Tormentato dai rimorsi	0 1 2 3 4
16. Pieno di energia	0 1 2 3 4	36. Ansioso	0 1 2 3 4	56. Forte	0 1 2 3 4
17. In preda al panico	0 1 2 3 4	37. Pronto ad attaccar briga	0 1 2 3 4	57. Indeciso su cosa fare	0 1 2 3 4
18. Senza speranza	0 1 2 3 4	38. Di umore nero	0 1 2 3 4	58. Frastornato	0 1 2 3 4
19. Rilassato	0 1 2 3 4	39. Stiduciato	0 1 2 3 4		
20. Degno di disprezzo	0 1 2 3 4	40. Indolente	0 1 2 3 4		

Tavola 5: Profile of Mood State (POMS)

Cognome e Nome.....

State-Trait Anxiety Inventory Y

ISTRUZIONI: sono qui di seguito riportate alcune frasi che le persone spesso usano per descriversi. Legga ciascuna frase e poi contrassegni con una crocetta il numero che indica come lei si sente **adesso**, cioè in questo momento. Non ci sono risposte giuste o sbagliate. Non impieghi troppo tempo per rispondere alle domande e dia la risposta che le sembra descrivere meglio i suoi **attuali** stati d'animo.

	1 = Per nulla	2 = Un po'	3 = Abbastanza	4 = Moltissimo
21. Mi sento bene				1 2 3 4
22. Mi sento teso e irrequieto				1 2 3 4
23. Sono soddisfatto di me stesso				1 2 3 4
24. Vorrei poter essere felice come sembrano essere gli altri				1 2 3 4
25. Mi sento un fallito				1 2 3 4
26. Mi sento riposato				1 2 3 4
27. Mi sento calmo, tranquillo e padrone di me				1 2 3 4
28. Sento che le difficoltà si accumulano tanto da non poterle superare				1 2 3 4
29. Mi preoccupo troppo di cose che in realtà non hanno importanza				1 2 3 4
30. Sono felice				1 2 3 4
31. Mi vengono pensieri negativi				1 2 3 4
32. Manco di fiducia in me stesso				1 2 3 4
33. Mi sento sicuro				1 2 3 4
34. Prendo decisioni facilmente				1 2 3 4
35. Mi sento inadeguato				1 2 3 4
36. Sono contento				1 2 3 4
37. Pensieri di scarsa importanza mi passano per la mente e mi infastidiscono				1 2 3 4
38. Vivo le delusioni con tanta partecipazione da non poter togliermele dalla testa				1 2 3 4
39. Sono una persona costante				1 2 3 4
40. Divento teso e turbato quando penso alle mie attuali preoccupazioni				1 2 3 4

Tavola 6: State-Trait Anxiety Inventory (STAI-Y): (STAI-Y)

SELF-RATING ANXIETY STATE
SAS - # 054

Cognome e Nome..... Data di nascita.....

Codice Paziente..... Valutatore..... Data valutazione.....

ISTRUZIONI GENERALI

Legga attentamente ciascuna delle 20 frasi elencate qui sotto: in che misura ciascuna di queste frasi descrive come lei si è sentito nel corso di quest'ultima settimana? Si è sentito così "quasi mai o raramente", "qualche volta", "spesso", "quasi sempre"? Per ogni frase faccia una crocetta nella colonna che le sembra la più appropriata a descrivere come si è sentito.

	Quasi mai o Raramente	Qualche volta	Spesso	Quasi sempre
1. Mi sento più nervoso ed ansioso del solito	1	2	3	4
2. Mi sento impaurito senza alcun motivo	1	2	3	4
3. Mi spavento facilmente o sono preso dal panico	1	2	3	4
4. Mi sento a pezzi e mi sembra di stare per crollare	1	2	3	4
5. Mi sembra che tutto vada bene e che non capiterà niente di male	4	3	2	1
6. Mi tremano le braccia e le gambe	1	2	3	4
7. Sono tormentato dal mal di testa e dai dolori al collo e alla schiena	1	2	3	4
8. Mi sento debole e mi stanco facilmente	1	2	3	4
9. Mi sento calmo e posso star seduto facilmente	4	3	2	1
10. Sento che il mio cuore batte veloce	1	2	3	4
11. Soffro di vertigini	1	2	3	4
12. Mi sembra di stare per svenire	1	2	3	4
13. Respiro con facilità	4	3	2	1
14. Ho sensazioni di intorpidimento e di formicolio alle dita delle mani e dei piedi	1	2	3	4
15. Soffro di mal di stomaco o di indigestione	1	2	3	4
16. Ho bisogno di urinare spesso	1	2	3	4
17. Le mie mani sono in genere asciutte e calde	4	3	2	1
18. La mia faccia diventa facilmente calda e arrossata	1	2	3	4
19. Mi addormento facilmente e mi sveglio riposato	4	3	2	1
20. Ho degli incubi	1	2	3	4

Tavola 7: Self Rating Anxiety Scale (SAS)

HADS

Nome e Cognome _____

Data _____

1. Mi sento agitato e teso:

- Quasi sempre
- Spesso
- Qualche volta
- Mai

2. Le cose che un tempo mi piacevano, ora mi piacciono:

- Nello stesso modo
- Meno di prima
- Molto poco
- Quasi per niente

3. Provo un sentimento di apprensione, come se dovesse succedere qualcosa di terribile:

- Sicuramente e in modo intenso
- Sì, ma in modo non troppo intenso
- Un po', ma non da preoccuparmene
- Per niente

4. Riesco a ridere e vedere il lato divertente delle cose:

- Come ho sempre fatto
- Un po' meno di un tempo
- Molto meno di un tempo
- Non vi riesco affatto

5. Mi passano per la mente pensieri preoccupanti:

- Molto spesso
- Spesso
- A volte, non troppo spesso
- Solo ogni tanto

6. Mi sento di buon umore:

- Mai
- Raramente
- Qualche volta
- Quasi sempre

- 7. Riesco a sedermi e a rilassarmi:**
- Sempre
- Spesso
- Qualche volta
- Mai
- 8. Mi sento rallentato:**
- Quasi sempre
- Molto spesso
- Qualche volta
- Mai
- 9. Provo un sentimento simile alla paura, come con un senso di tensione allo stomaco:**
- Mai
- Qualche volta
- Abbastanza spesso
- Molto spesso
- 10. Non curo più il mio aspetto fisico:**
- Completamente
- Non me ne curo abbastanza
- Forse me ne curo di meno
- Me ne curo come al solito
- 11. Mi sento irrequieto e incapace di stare fermo:**
- Moltissimo
- Abbastanza
- Poco
- Per niente
- 12. Pregusto con piacere le cose:**
- Come ho sempre fatto
- Un po' meno di un tempo
- Molto meno di un tempo
- Quasi per niente
- 13. Provo delle sensazioni improvvise di panico:**
- Molto spesso
- Abbastanza spesso
- Non molto spesso
- Mai
- 14. Provo piacere leggendo un libro, oppure seguendo una trasmissione alla radio o alla TV:**
- Spesso
- Qualche volta
- Non spesso
- Molto raramente

Tavola 8: Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)

Cognome e Nome.....

Perceived Stress Scale

Le domande contenute in questa scala riguardano i Suoi sentimenti e pensieri durante l'ultimo mese. Per ogni domanda, Le viene chiesto di indicare la sua risposta specificando la frequenza con cui si è sentito o ha pensato in un certo modo.

0=Mai	1=Quasi mai	2=A volte	3=Abbastanza spesso	4=Molto spesso
1. Nell'ultimo mese, con che frequenza si è sentito fuori di sé poiché è avvenuto qualcosa di inaspettato?				0 1 2 3 4
2. Nell'ultimo mese, con che frequenza ha avuto la sensazione di non essere in grado di avere controllo sulle cose importanti della sua vita?				0 1 2 3 4
3. Nell'ultimo mese, con che frequenza si è sentito nervoso o "stressato"?				0 1 2 3 4
4. Nell'ultimo mese, con che frequenza si è sentito fiducioso sulla sua capacità di gestire i suoi problemi personali?				0 1 2 3 4
5. Nell'ultimo mese, con che frequenza ha avuto la sensazione che le cose andassero come diceva lei?				0 1 2 3 4
6. Nell'ultimo mese, con che frequenza ha avuto la sensazione di non riuscire a star dietro a tutte le cose che doveva fare?				0 1 2 3 4
7. Nell'ultimo mese, con che frequenza ha avvertito di essere in grado di controllare ciò che la irrita nella sua vita?				0 1 2 3 4
8. Nell'ultimo mese, con che frequenza ha sentito di padroneggiare la situazione?				0 1 2 3 4
9. Nell'ultimo mese, con che frequenza è stato arrabbiato per cose che erano fuori dal suo controllo?				0 1 2 3 4
10. Nell'ultimo mese, con che frequenza ha avuto la sensazione che le difficoltà si stavano accumulando a un punto tale per cui non poteva superarle?				0 1 2 3 4

Tavola 9: Perceived Stress Scale (PSS)

Questionario per la valutazione dello stato generale di benessere psicologico

Questo questionario si propone di verificare il Suo attuale stato di benessere ponendole alcune domande su “come si sente” e su come Le stanno andando le cose in generale. Dopo aver letto attentamente tutte le possibili risposte, scelga per ciascuna domanda la risposta che le sembra descrivere meglio la sua situazione.

1. Nelle ultime quattro settimane come si è sentito/a in generale? (Indichi una risposta)
 - Di umore eccellente
 - Di buon umore
 - Di buon umore per la maggior parte del tempo
 - Con molti alti e bassi d'umore
 - Giù di morale per la maggior parte del Tempo

 - Col morale a terra
2. Nelle ultime quattro settimane è stato/a infastidito/a da malattie, disturbi fisici o dolori?
 - Tutti i giorni
 - Quasi tutti i giorni
 - Per circa metà del tempo
 - Più volte, ma per meno di metà del tempo
 - Raramente
 - Mai
3. Nelle ultime quattro settimane si è sentito/a depresso/a?
 - Sì, al punto di pensare di farla finita
 - Sì, al punto che non mi importava più di nulla
 - Sì, mi sono sentito/a molto depresso /a quasi tutti i giorni
 - Sì, mi sono sentito/a piuttosto depresso/a parecchie volte
 - Sì, mi sono sentito/a un po' depresso/a qualche volta
 - No, non mi sono mai sentito/a depresso/a
4. Nelle ultime quattro settimane si è sentito/a padrone delle sue situazioni, pensieri, emozioni e sentimenti?
 - Sì, senz'altro
 - Sì, quasi del tutto
 - Sì generalmente
 - Non troppo
 - No, e questo mi disturba un po'
 - No, e questo mi disturba molto
5. Nelle ultime quattro settimane è stato/a infastidito/a da stati di tensione o perché aveva i nervi a fior di pelle?

- Enormemente, tanto da non riuscire a lavorare o ad occuparmi delle cose che dovevo fare
 - Moltissimo
 - Parecchio
 - Abbastanza tanto da esserne infastidito
 - Un po'
 - Per nulla
 - Nelle ultime quattro settimane
6. Nelle ultime quattro settimane quant'energia o vitalità ha avuto o ha sentito d'avere?
- Decisamente pieno di energia, molto vivace
 - Abbastanza pieno di energia per la maggior parte del tempo
 - Ho avuto notevoli alti e bassi di vitalità ed energia
 - Il mio livello di energia o vitalità è stato generalmente basso
 - Il mio livello di energia o vitalità è stato quasi sempre molto basso
 - Mi sono sentito/a senza forze, svuotato/a privo/a di energia o vitalità
7. Nelle ultime quattro settimane mi sono sentito/a scoraggiato/a e triste?
- Mai
 - Quasi mai
 - Una parte del tempo
 - Molto tempo
 - Quasi sempre
 - Sempre
8. Nelle ultime quattro settimane è stato/a generalmente teso/a o ha provato tensione?
- Sì, sono stato/a estremamente teso/a per tutto o quasi tutto il tempo
 - Sì, sono stato/a molto teso/a per la maggior parte del tempo
 - Generalmente no, ma mi è successo diverse volte di sentirmi teso/a
 - Alcune volte mi sono sentito/a un po' teso
 - Il mio livello di tensione è stato piuttosto basso
 - Non ho mai avuto la sensazione di essere teso/a
9. Nelle ultime quattro settimane in che misura si è sentito/a felice, soddisfatto/a o contento/a della sua vita personale?
- Veramente molto felice, non mi sarei potuto/a sentire più soddisfatto/a o contento/a
 - Quasi sempre molto felice
 - In generale molto soddisfatto/a
 - A volte abbastanza felice, a volte piuttosto infelice
 - In generale insoddisfatto/a o infelice

- Quasi sempre, o sempre molto insoddisfatto/a o infelice
10. Nelle ultime quattro settimane si è sentito/a così bene da fare quello che desiderava o doveva fare?
- Sì decisamente
 - Sì, per fare quasi tutto quello che desideravo o che dovevo fare
 - I miei problemi di salute mi hanno limitato/a in alcune cose importanti
 - A causa della mia salute sono stato/a appena in grado di prendermi cura di me stesso/a
 - Ho avuto bisogno di qualche aiuto per occuparmi di me stesso/a
 - Ho avuto bisogno di aiuto per tutto, o quasi tutto quello che dovevo fare
11. Nelle ultime quattro settimane si è sentito/a tanto triste, scoraggiato/a, disperato/o o ha avuto così tanti problemi da chiedersi se vale la pena di andare avanti?
- Sì, enormemente tanto da essere quasi sul punto di lasciare perdere tutto
 - Sì, moltissimo
 - Sì, parecchio
 - Sì, abbastanza tanto da turbarmi
 - Un po'
 - Per nulla
12. Nelle ultime quattro settimane mi sono svegliato/a fresco/a e riposato/a?
- Mai
 - Quasi mai
 - Alcune volte
 - Molte volte
 - Quasi sempre
 - Sempre
13. Nelle ultime quattro settimane ha provato apprensione, preoccupazione o paura per la sua salute?
- Enormemente
 - Moltissimo
 - Parecchio
 - Un po' ma non tanto
 - Quasi mai
 - Per nulla
14. Nelle ultime quattro settimane ha avuto qualche motivo per domandarsi se stesse perdendo la ragione o se stesse perdendo la memoria, il controllo del modo in cui agisce parla, pensa o sente?
- No per niente
 - Solo un po'
 - Qualche motivo, ma non sufficiente a causarmi apprensione o preoccupazione

- Qualche motivo, tanto da causarmi un po' di preoccupazione
 - Qualche motivo, tanto da causarmi molta preoccupazione
 - Sì molti motivi e sono molto preoccupato
15. Nelle ultime quattro settimane la mia vita quotidiana è stata interessante per me?
- Mai
 - Quasi mai
 - Una parte del tempo
 - Molto tempo
 - Quasi sempre
 - Sempre
16. Nelle ultime quattro settimane si è sentito/a attivo/a, in forze o lento/a e pigro/a?
- Sempre molto attivo/a e in forze
 - Quasi sempre molto attivo/a e in forze
 - Abbastanza attivo/a e in forze
 - Abbastanza lento/a e pigro/a
 - Quasi sempre molto lento/a e pigro/a
 - Sempre molto lento/a e pigro/a
17. Nelle ultime quattro settimane è stato/a in ansia, preoccupato/a o arrabbiato/a?
- Enormemente, tanto da sentirmi male o quasi
 - Moltissimo
 - Parecchio
 - Abbastanza tanto da turbarmi
 - Un po'
 - Per nulla
18. Nelle ultime quattro settimane mi sono sentito/a emotivamente stabile e sicuro/a di me stesso/a?
- Mai
 - Quasi mai
 - Una parte del tempo
 - Molto tempo
 - Quasi sempre
 - Sempre
19. Nelle ultime quattro settimane si è sentito/a rilassato/a, tranquillo/a oppure si è sentito molto teso/a, nervoso/a o agitato/a?
- Sempre rilassato/a tranquillo/a

- Quasi sempre rilassato/a e tranquillo/a
 - Generalmente rilassato/a e tranquillo/a, ma qualche volta abbastanza teso/a
 - Generalmente molto teso/a, ma qualche volta abbastanza rilassato/a
 - Quasi sempre molto teso/a, nervoso/a o agitato/a
 - Sempre molto teso/a, nervoso/a o agitato/a
20. Nelle ultime quattro settimane mi sono sentito/a allegro e sereno/a?
- Mai
 - Quasi mai
 - Una parte del tempo
 - Molto tempo
 - Quasi sempre
 - Sempre
21. Nelle ultime quattro settimane mi sono sentito/a stanco/a, esaurito/a, logorato/a o sfinito/a?
- Mai
 - Quasi mai
 - Una parte del tempo
 - Molto tempo
 - Quasi sempre
 - Sempre
22. Nelle ultime quattro settimane è stato/a o si è sentito/a sottoposto/a a stress o pressioni?
- Sì, quasi più di quanto potessi sopportare o reggere
 - Sì, molto
 - Sì, abbastanza, più del solito
 - Sì, abbastanza, ma quasi come al solito
 - Sì un po'
 - Per nulla

Tavola 10: Psychological General Well Being Index (PQWI)

Codice <input type="text"/>	Anno di nascita <input type="text"/>	Sesso <input type="text"/>	<input type="text"/>
-----------------------------	--------------------------------------	----------------------------	----------------------

1. In generale, direbbe che la Sua salute è
 Eccellente..... 1
 Molto buona..... 2
 Buona..... 3
 Passabile..... 4
 Scadente..... 5

2. La sua salute La limita attualmente nello svolgimento di attività di moderato impegno fisico (come spostare un tavolo, usare l'aspirapolvere, giocare a bocce o fare un giro in bicicletta, ecc.) ?
 SI, mi limita parecchio..... 1 SI, mi limita parzialmente..... 2 NO, non mi limita per nulla..... 3

3. La sua salute La limita attualmente nel salire qualche piano di scale ?
 SI, mi limita parecchio..... 1
 SI, mi limita parzialmente..... 2
 NO, non mi limita per nulla..... 3

4. Nelle ultime 4 settimane, ha reso meno di quanto avrebbe voluto sul lavoro o nelle altre attività quotidiane, a causa della sua salute fisica?
 SI..... 1 NO..... 2

5. Nelle ultime 4 settimane, ha dovuto limitare alcuni tipi di lavoro o di altre attività, a causa della sua salute fisica ?
 SI..... 1 NO..... 2

6. Nelle ultime 4 settimane, ha reso meno di quanto avrebbe voluto sul lavoro o nelle altre attività quotidiane, a causa del suo stato emotivo (quale il sentirsi depresso o ansioso) ?
 SI..... 1 NO..... 2

7. Nelle ultime 4 settimane, ha avuto un calo di concentrazione sul lavoro o nelle altre attività quotidiane, a causa del suo stato emotivo (quale il sentirsi depresso o ansioso)?
 SI..... 1 NO..... 2

8. Nelle ultime 4 settimane, in che misura il dolore l'ha ostacolata nel lavoro che svolge abitualmente (sia in casa sia fuori casa) ?
 Per nulla..... 1 Molto poco..... 2
 Un po'..... 3
 Molto..... 4
 Moltissimo..... 5

9. Per quanto tempo nelle ultime 4 settimane si è sentito calmo e sereno ?
 Sempre..... 1 Quasi sempre..... 2
 Molto tempo..... 3 Una parte del tempo..... 4
 Quasi mai..... 5
 Mai..... 6

10. Per quanto tempo nelle ultime 4 settimane si è sentito pieno di energia?
 Sempre..... 1
 Quasi sempre..... 2
 Molto tempo..... 3
 Una parte del tempo..... 4
 Quasi mai..... 5
 Mai..... 6

11. Per quanto tempo nelle ultime 4 settimane si è sentito scoraggiato e triste ?
 Sempre..... 1
 Quasi sempre..... 2
 Molto tempo..... 3
 Una parte del tempo..... 4
 Quasi mai..... 5
 Mai..... 6

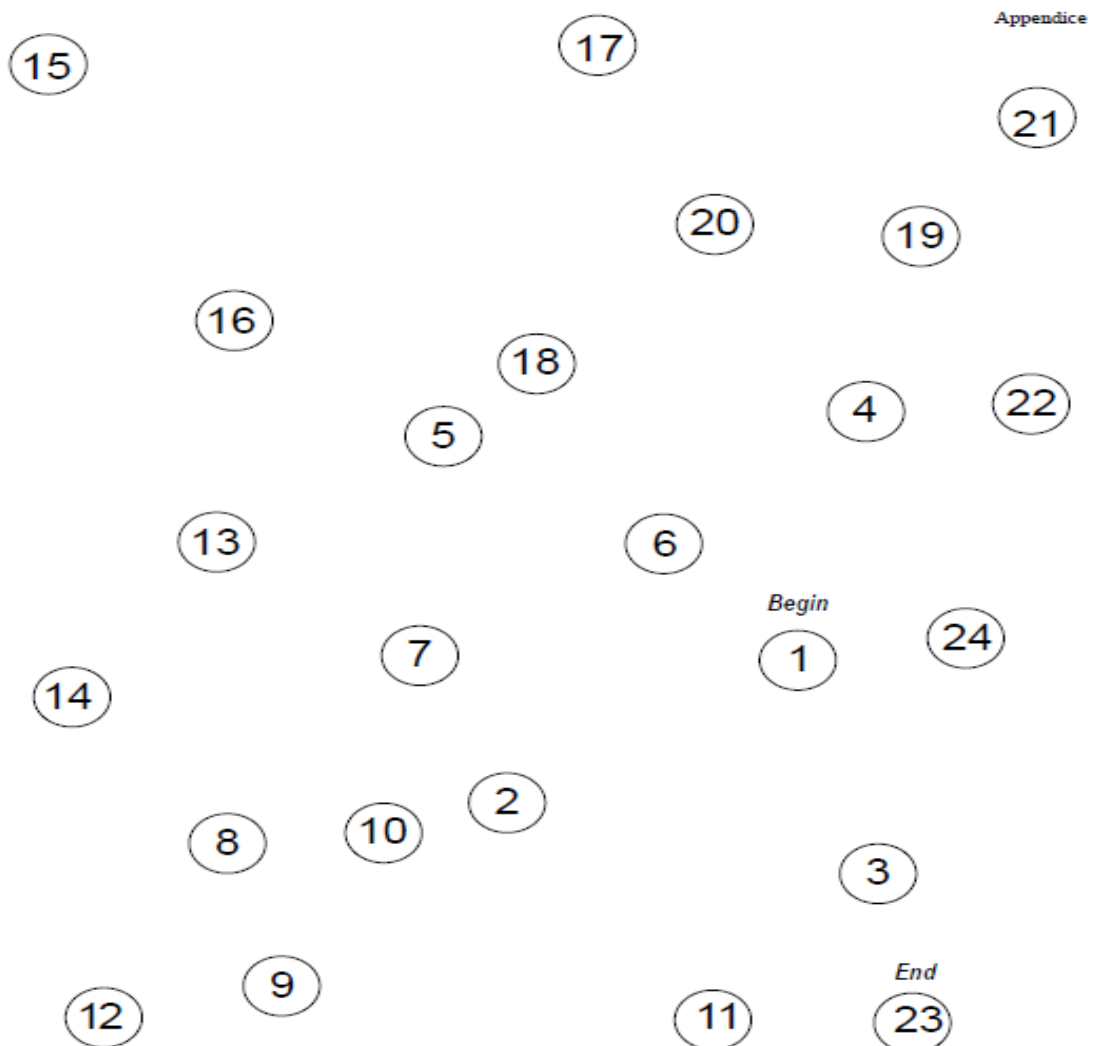
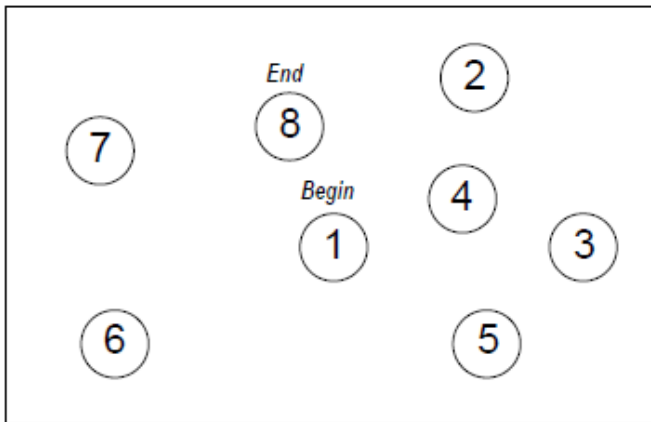
12. Nelle ultime 4 settimane, per quanto tempo la Sua salute fisica o il Suo stato emotivo hanno interferito nelle sue attività sociali, in famiglia, con gli amici?
 Sempre..... 1
 Quasi sempre..... 2
 Una parte del tempo..... 3
 Quasi mai..... 4
 mai..... 5

Tavola 11: Short Form-12 (SF-12)

TRAIL MAKING

Part A

Sample



TRAIL MAKING

Part B

Sample

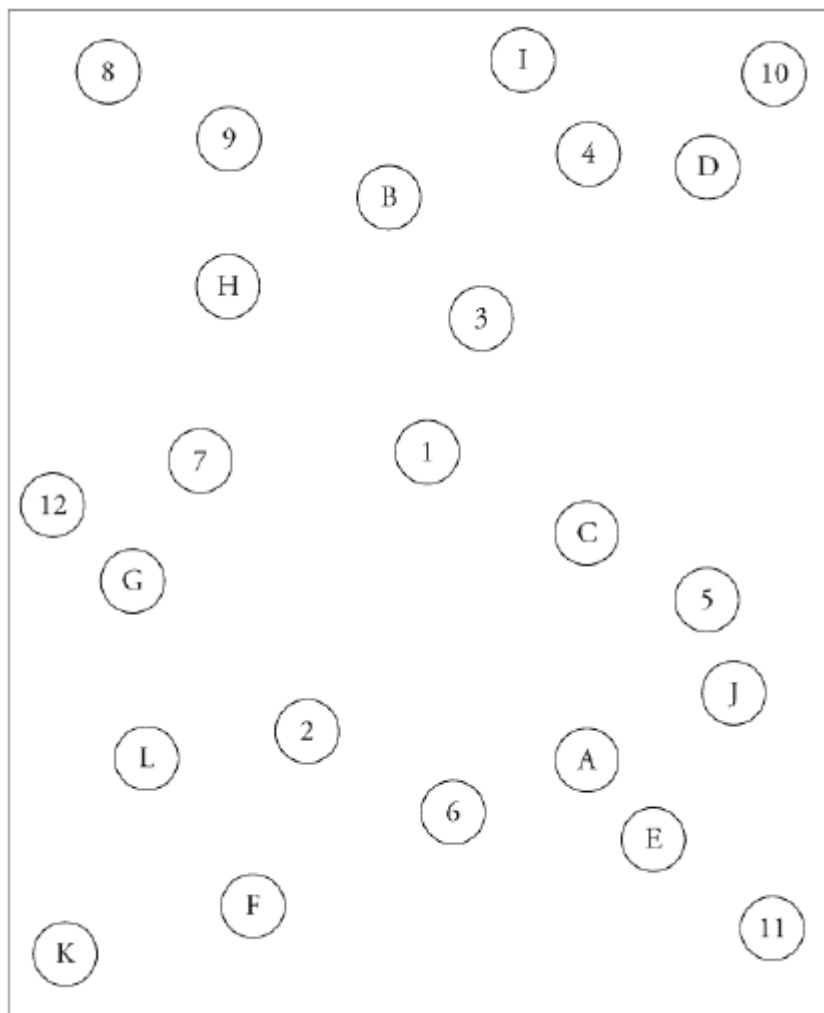
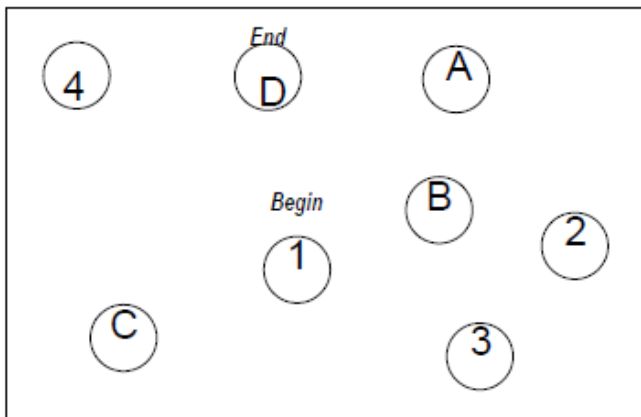


Tavola 12: Trail Making Test (TMT) A e B

Intervista di stress sociale per la valutazione dei comportamenti non verbali

Durante il test di stress sociale i soggetti venivano intervistati per un periodo di 5 minuti, in cui erano chiamati a rispondere a domande inerenti la propria personalità in un contesto sociale. L'intervista si svolgeva secondo un ordine riassunto nelle affermazioni/ domande di seguito riportate:

1. *“Adesso io le porgerò alcune domande che riguardano il suo carattere, la sua personalità e le chiederò di descrivere se stessa nelle relazioni sociali, sia negli aspetti positivi che negativi”.*
2. *“Che immagine ritiene gli altri abbiano di lei? Positiva o negativa? E soprattutto, ritiene che gli altri abbiano di lei un'immagine che corrisponde alla realtà?”*
 3. *“E' in grado di riferire esperienze personali in proposito?”*
4. *“Gli aspetti degli altri che la risultano infastidire di più, li ha riscontrati più frequentemente nel sesso maschile o femminile?”*
5. *“Per lei è facile aprirsi con e persone che le stanno attorno, parlare di sé, dei propri problemi?”*
 6. *“Quali sono gli aspetti caratteriali che apprezza di più negli altri?”*
7. *“Quali sono le caratteristiche della sua personalità che vorrebbe cambiare?”*
 8. *“Quali sono le situazioni sociali in cui si sente più a suo agio?”*
9. *“Quali, invece, i lati del suo carattere ai quali tiene di più, che reputa la rappresentino meglio in senso positivo?”*
 10. *“Quali, invece, quelle che ritiene più stressanti?”*
 11. *“Quali, invece, quelli che la irritano maggiormente?”*
 12. *“Ritiene di essere una persona socievole?”*

Tavola 13: valutazione del profilo comportamentale non verbale,
Ethological Coding System For Interview (ECSI)

LINEE GUIDA ALIMENTARI E COMPORTAMENTALI SUGGERITE

- Evitare cibi piccanti, bevande gassate, caffè e vino (concesse solo modeste quantità durante i pasti)
- Evitare latte e lattici freschi (consentiti solo in minima parte; permessi formaggi stagionati)
- Evitare superalcolici, grassi (specie se cotti), insaccati ad alto contenuto di grassi, carni rosse (ad es. selvaggina)
- Evitare verdure fibrose a foglia larga (lattuga, radicchio, verza, ecc.), legumi, conserva di pomodoro, frutta poco matura e con alto residuo fibroso (ananas, agrumi, ecc.), cibi integrali (ed in particolare la crusca)
- Assumere quantità abbondanti di ortaggi ad alto contenuto di fibre solubili (carote, zucchine, patate, ecc.) e frutta sbucciata e prevalentemente cotta (mele, pere, ecc.)
- Evitare pasti abbondanti ed assumere i pasti ad orari regolare, masticando bene e ingerendo sufficienti quantità di liquidi (privilegiare acque oligominerali, naturali)
- Favorire l'attività fisica

Tavola 14: Linee guida alimentari e comportamentali.

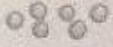

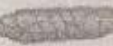



Giorno 1		Data: _____ giorno _____ mese _____ anno	
VALUTAZIONE GIORNALIERA DEL DOLORE/DISAGIO ADDOMINALE (NRS SCALE)			
Da 0 a 10 che punteggio darebbe al dolore/fastidio addominale da lei avvertito durante la giornata? (0=Nessun dolore/fastidio, 10=Il peggior dolore/fastidio provato)			
VALUTAZIONE GIORNALIERA DEL TIPO DI FECI (BRISTOL SCALE)			
Indicare il numero di evacuazioni effettuate in giornata	Tipo 1	Blocchi duri e distinti, simili a noci, difficili da evacuare	
	Tipo 2	A forma di salsiccia ma granulosa	
	Tipo 3	A forma di salsiccia ma con spaccature superficiali	
	Tipo 4	A forma di salsiccia o serpe, soffice e dalla superficie liscia	
	Tipo 5	Soffici masse con margini ben definiti facili da evacuare	
	Tipo 6	Soffici frammenti con margini frastagliati, feci molli	
	Tipo 7	Feci liquide, prive di parti solide	TOTALMENTE LIQUIDE
Indicare il tipo di feci facendo riferimento alla tabella riportata qui a fianco			

Tavola 15: Diario del paziente (Numerical Rating Scale, Stool Bristol Scale, Numero evacuazioni)

Giorno 7

VALUTAZIONE SETTIMANALE DELLO STILE DI VITA E REGIME ALIMENTARE SUGGERITO

Durante la settimana ha seguito le linee guida riguardanti le abitudini alimentari e lo stile di vita suggerite dallo Sperimentatore? Si No

VALUTAZIONE SETTIMANALE DEL GRADO DI SOLLIEVO

Indichi il grado di sollievo associato ai sintomi riguardanti la Sindrome dell'Intestino Irritabile durante l'ultima settimana (Indichi **solo** una delle seguenti risposte)

₁ Completamente sollevato
 ₂ Considerevolmente sollevato
 ₃ Leggermente sollevato
 ₄ Inalterato
 ₅ Leggermente peggiore
 ₆ Considerevolmente peggiore
 ₇ Non potrebbe andare peggio

Tavola 16: Diario del paziente (Symptom Relief Scale)

Phylum	9	Class	9
Firmicutes	60,57%	Clostridia	58,10%
Bacteroidetes	33,97%	Bacteroidia	30,61%
Actinobacteria	1,39%	Actinobacteria	1,42%
Proteobacteria	1,79%	Bacilli	1,90%
Verrucomicrobia	1,54%	Erysipelotrichi	2,03%
Cyanobacteria	0,48%	Verrucomicrobiae	1,58%
Tenericutes	0,03%	Gammaproteobacteria	0,24%
Nitrospirae	0,09%	Flavobacteriia	1,99%
Chloroflexi	0,05%	Sphingobacteriia	0,62%
Caldithrix	0,02%	Deltaproteobacteria	0,58%
Thermotogae	0,01%	Betaproteobacteria	0,16%
Synergistetes	0,03%	Nostocophycideae	0,40%
Euryarchaeota	0,00%	Alphaproteobacteria	0,05%
Deferribacteres	0,00%	Mollicutes	0,03%
Fusobacteria	0,00%	Oscillatoriophyycideae	0,03%
		Nitrospira	0,09%
		Caldithrixae	0,02%
		Anaerolineae	0,05%
		Thermotogae	0,01%
		Synergistia	0,03%
		Methanobacteria	0,00%
		Deferribacteres	0,00%
		Opitutae	0,01%
		Fusobacteria	0,00%

Order	9	Family	9
Clostridiales	55,79%	Lachnospiraceae	36,66%
Bacteroidales	30,68%	Bacteroidaceae	16,94%
Bifidobacteriales	0,75%	Ruminococcaceae	11,43%
Lactobacillales	1,64%	Bifidobacteriaceae	0,79%
Coriobacteriales	2,28%	Clostridiaceae	6,34%
Erysipelotrichales	2,04%	Streptococcaceae	0,86%
Verrucomicrobiales	1,58%	Coriobacteriaceae	2,42%
Flavobacteriales	1,99%	Porphyromonadaceae	7,38%
Actinomycetales	0,66%	Veillonellaceae	2,31%
Enterobacteriales	0,05%	Erysipelotrichaceae	2,15%
Sphingobacteriales	0,62%	Verrucomicrobiaceae	1,67%
Burkholderiales	0,15%	Flavobacteriaceae	2,11%
Desulfovibrionales	0,33%	Lactobacillaceae	0,33%
Nostocales	0,41%	Prevotellaceae	0,65%
Natranaerobiales	0,01%	Enterobacteriaceae	0,05%
Bacillales	0,18%	Sphingobacteriaceae	0,56%
Syntrophobacteriales	0,20%	Enterococcaceae	0,38%
Thiotrichales	0,01%	Odoribacteraceae	4,04%
Gemellales	0,06%	Leuconostocaceae	0,04%
Pasteurellales	0,02%	Streptomyetaceae	0,25%
Turicibacteriales	0,00%	Alcaligenaceae	0,10%
Rhodospirillales	0,02%	Nostocaceae	0,43%
Thermicanales	0,00%	Anaerobrancaceae	0,01%
Thermoanaerobacteriales	0,05%	Peptococcaceae	0,11%
Nitrospirales	0,09%	Peptostreptococcaceae	0,05%
Chroococcales	0,03%	Paraprevotellaceae	0,04%
Legionellales	0,01%	Desulfovibrionaceae	0,13%
Caldithriales	0,02%	Desulfobacteraceae	0,20%

Alteromonadales	0,04%		Coprobacillaceae	0,01%
Acholeplasmatales	0,02%		Microbacteriaceae	0,01%
Entomoplasmatales	0,01%		Desulfohalobiaceae	0,22%
Caldilineales	0,05%		Actinomycetaceae	0,05%
Thermotogales	0,01%		Heliobacteriaceae	0,02%
Pseudomonadales	0,01%		Thiotrichaceae	0,01%
Synergistales	0,03%		Gemellaceae	0,06%
Methanobacteriales	0,00%		Eubacteriaceae	0,07%
Rhodobacterales	0,01%		Pasteurellaceae	0,02%
Deferribacterales	0,00%		Brevibacteriaceae	0,09%
Halanaerobiales	0,03%		Turicibacteraceae	0,00%
Pelagicoccales	0,01%		Paenibacillaceae	0,02%
Desulfuromonadales	0,02%		Thermicanaceae	0,00%
Fusobacteriales	0,00%		Comamonadaceae	0,05%
			Rhodospirillaceae	0,01%
			Flexibacteraceae	0,05%
			Thermodesulfovibrionaceae	0,10%
			Bacillaceae	0,12%
			Legionellaceae	0,01%
			Caldithrixaceae	0,02%
			Acholeplasmataceae	0,02%
			Entomoplasmataceae	0,01%
			Caldilineaceae	0,06%
			Thermotogaceae	0,01%
			Moraxellaceae	0,01%
			Caldicellulosiruptoraceae	0,04%
			Phormidiaceae	0,01%
			Shewanellaceae	0,03%
			Methanobacteriaceae	0,00%
			Deferribacteraceae	0,00%
			Rhodobacteraceae	0,01%
			Propionibacteriaceae	0,00%
			Thermomonosporaceae	0,01%
			Halanaerobiaceae	0,03%
			Pelagicocccaceae	0,01%
			Synergistaceae	0,00%
			Acetobacteraceae	0,01%
			Staphylococcaceae	0,01%
			Fusobacteriaceae	0,00%
			Thermogemmatissporaceae	0,00%
			Geobacteraceae	0,01%
			Carboxydocellaceae	0,00%

Genus	9	Species	9
<i>Blautia</i>	25,26%	<i>Blautia coccoides</i>	17,00%
<i>Bacteroides</i>	17,34%	<i>Blautia wexlerae</i>	4,93%
<i>Bifidobacterium</i>	0,80%	<i>Ruminococcus bromii</i>	0,04%
<i>Faecalibacterium</i>	5,27%	<i>Bacteroides vulgatus</i>	14,46%
<i>Ruminococcus</i>	5,18%	<i>Bacteroides rodentium</i>	3,94%
<i>Streptococcus</i>	0,86%	<i>Bacteroides dorei</i>	0,00%
<i>Clostridium</i>	4,25%	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	1,59%
<i>Coprococcus</i>	4,14%	<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	1,32%
<i>Roseburia</i>	3,10%	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	0,76%
<i>Lachnospira</i>	0,95%	<i>Streptococcus vestibularis</i>	0,66%
<i>Alkaliphilus</i>	0,79%	<i>Collinsella aerofaciens</i>	1,93%
<i>Collinsella</i>	1,53%	<i>Bifidobacterium stercoris</i>	0,03%
<i>Parabacteroides</i>	1,58%	<i>Ruminococcus gnavus</i>	1,06%
<i>Erysipelothrix</i>	1,65%	<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>	1,96%
<i>Oscillospira</i>	2,41%	<i>Akkermansia muciniphila</i>	2,07%
<i>Flavobacterium</i>	2,02%	<i>Erysipelothrix muris</i>	1,50%
<i>Lactobacillus</i>	0,32%	<i>Bifidobacterium longum</i>	0,01%
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	1,22%	<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	0,20%
<i>Akkermansia</i>	1,29%	<i>Alkaliphilus peptidifermentans</i>	0,34%
<i>Prevotella</i>	0,66%	<i>Clostridium alkalicellulosi</i>	0,70%
<i>Dysgonomonas</i>	5,54%	<i>Dysgonomonas wimpennyi</i>	8,87%
<i>Eubacterium</i>	0,47%	<i>Dialister invisus</i>	0,00%
<i>Dialister</i>	0,00%	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0,01%
<i>Dorea</i>	0,56%	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	0,02%
<i>Slackia</i>	0,43%	<i>Roseburia faecis</i>	0,36%
<i>Eggerthella</i>	0,18%	<i>Bacteroides uniformis</i>	1,55%
<i>Escherichia</i>	0,01%	<i>Blautia obeum</i>	2,18%
<i>Megamonas</i>	0,00%	<i>Prevotella copri</i>	0,00%
<i>Acidaminococcus</i>	0,00%	<i>Alkaliphilus crotonatoxidans</i>	0,41%
<i>Natronincola</i>	0,17%	<i>Bifidobacterium scardovii</i>	0,01%
<i>Sedimentibacter</i>	0,60%	<i>Eubacterium bifforme</i>	0,00%
<i>Megasphaera</i>	0,01%	<i>Ruminococcus callidus</i>	4,95%
<i>Enterococcus</i>	0,32%	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0,25%
<i>Phascolarctobacterium</i>	2,17%	<i>Blautia hansenii</i>	0,48%
<i>Sutterella</i>	0,10%	<i>Escherichia albertii</i>	0,01%
<i>Butyricimonas</i>	3,93%	<i>Ruminococcus albus</i>	0,01%
<i>Pedobacter</i>	0,14%	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,01%
<i>Kitasatospora</i>	0,24%	<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i>	0,96%
<i>Anaerobranca</i>	0,01%	<i>Eggerthella lenta</i>	0,20%
<i>Rubritalea</i>	0,20%	<i>Bifidobacterium indicum</i>	0,07%
<i>Caloramator</i>	0,02%	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	0,03%
<i>Sphingobacterium</i>	0,34%	<i>Parabacteroides merdae</i>	1,17%
<i>Veillonella</i>	0,03%	<i>Ruminococcus torques</i>	0,14%
<i>Sarcina</i>	0,00%	<i>Oscillospira eae</i>	1,08%
<i>Leuconostoc</i>	0,03%	<i>Parabacteroides distasonis</i>	0,13%
<i>Adlercreutzia</i>	0,30%	<i>Collinsella intestinalis</i>	0,44%
<i>Anaerostipes</i>	0,09%	<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	0,17%
<i>Paraprevotella</i>	0,05%	<i>Bacteroides massiliensis</i>	1,18%
<i>Odoribacter</i>	0,20%	<i>Slackia piriformis</i>	0,35%
<i>Enterobacter</i>	0,01%	<i>Dorea formicigenerans</i>	0,57%
<i>Serratia</i>	0,00%	<i>Streptococcus bovis</i>	0,09%
<i>Peptoniphilus</i>	0,06%	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,00%
<i>Desulfonauticus</i>	0,22%	<i>Bacteroides stercoris</i>	0,00%
<i>Luteolibacter</i>	0,11%	<i>Megamonas funiformis</i>	0,00%
<i>Heliorestis</i>	0,02%	<i>Bacteroides ovatus</i>	0,15%
<i>Butyrvibrio</i>	0,01%	<i>Bacteroides fragilis</i>	0,00%
<i>Olivibacter</i>	0,05%	<i>Bacteroides coprocola</i>	0,00%

<i>Succiniclasticum</i>	0,00%	<i>Lactobacillus gasseri</i>	0,00%
<i>Polaribacter</i>	0,03%	<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	0,02%
<i>Anaerotruncus</i>	0,09%	<i>Eubacterium cylindroides</i>	0,61%
<i>Caldilinea</i>	0,06%	<i>Lactobacillus camelliae</i>	0,02%
<i>Acholeplasma</i>	0,01%	<i>Sphingobacterium shayense</i>	0,05%
<i>Klebsiella</i>	0,00%	<i>Bacteroides eggerthii</i>	0,00%
<i>Pectinatus</i>	0,00%	<i>Johnsonella ignava</i>	0,20%
<i>Marinitoga</i>	0,01%	<i>Parapedobacter koreensis</i>	0,01%
<i>Sharpea</i>	0,00%	<i>Gemella cunicula</i>	0,10%
<i>Prostheco bacter</i>	0,04%	<i>Bacteroides caccae</i>	0,22%
<i>Caldicellulosiruptor</i>	0,05%	<i>Prevotella shahii</i>	0,00%
<i>Mannheimia</i>	0,00%	<i>Porphyromonas canis</i>	0,30%
<i>Pediococcus</i>	0,02%	<i>Lactobacillus brantae</i>	0,16%
<i>Shewanella</i>	0,03%	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	0,02%
<i>Vagococcus</i>	0,00%	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	0,00%
<i>Bacillus</i>	0,11%	<i>Blautia glucerasea</i>	0,04%
<i>Methanobrevibacter</i>	0,00%	<i>Bilophila wadsworthia</i>	0,15%
<i>Peptococcus</i>	0,00%	<i>Bifidobacterium saeculare</i>	0,00%
<i>Mucispirillum</i>	0,00%	<i>Pedobacter kwangyangensis</i>	0,00%
<i>Oribacterium</i>	0,00%	<i>Clostridium chartatabidum</i>	0,00%
<i>Emticicia</i>	0,00%	<i>Sphingobacterium bambusae</i>	0,50%
<i>Fructobacillus</i>	0,00%	<i>Prevotella dentasini</i>	0,30%
<i>Halanaerobium</i>	0,03%	<i>Negativicoccus succinicivorans</i>	0,00%
<i>Citrobacter</i>	0,00%	<i>Streptococcus australis</i>	0,00%
<i>Pelagicoccus</i>	0,01%	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,00%
<i>Acinetobacter</i>	0,00%	<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	0,00%
<i>Haemophilus</i>	0,00%	<i>Streptococcus milleri</i>	0,01%
<i>Roseomonas</i>	0,01%	<i>Blautia producta</i>	0,01%
<i>Tenacibaculum</i>	0,00%	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	0,01%
<i>Candidatus Tammella</i>	0,00%	<i>Streptococcus fryi</i>	0,01%
<i>Johnsonella</i>	0,13%	<i>Erysipelothrix inopinata</i>	0,49%
<i>Actinomyces</i>	0,05%	<i>Clostridium frigoris</i>	0,01%
<i>Thiothrix</i>	0,01%	<i>Clostridium cadaveris</i>	0,08%
<i>Weissella</i>	0,01%	<i>Bacteroides paurosaccharolyticus</i>	0,58%
<i>Gemella</i>	0,06%	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	0,00%
<i>Lachnobacterium</i>	0,11%	<i>Bacteroides stercorisoris</i>	0,41%
<i>Parapedobacter</i>	0,01%	<i>Lactobacillus antri</i>	0,01%
<i>Brevibacterium</i>	0,09%	<i>Bacteroides sartorii</i>	0,34%
<i>Turicibacter</i>	0,00%	<i>Eubacterium dolichum</i>	0,09%
<i>Bilophila</i>	0,10%	<i>Anaerobranca zavarzinii</i>	0,01%
<i>Porphyromonas</i>	0,21%	<i>Enterococcus lactis</i>	0,39%
<i>Acetobacterium</i>	0,06%	<i>Megasphaera hominis</i>	0,01%
<i>Coprobacillus</i>	0,01%	<i>Coprococcus eutactus</i>	0,00%
<i>Desulfobacter</i>	0,20%	<i>Sarcina maxima</i>	0,00%
<i>Thermicanus</i>	0,00%	<i>Caloramator mitchellensis</i>	0,02%
<i>Negativicoccus</i>	0,00%	<i>Streptococcus tigurinus</i>	0,01%
<i>Anaerofilum</i>	0,06%	<i>Coprococcus catus</i>	0,00%
<i>Desulfovibrio</i>	0,03%	<i>Collinsella tanakaei</i>	0,00%
<i>Desulfosarcina</i>	0,01%	<i>Acidaminococcus intestini</i>	0,00%
<i>Desulfotomaculum</i>	0,08%	<i>Butyricimonas synergistica</i>	5,61%
<i>Paenibacillus</i>	0,01%	<i>Clostridium taeniosporum</i>	0,66%
<i>Rhodospirillum</i>	0,01%	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	0,48%
<i>Thermodesulfovibrio</i>	0,10%	<i>Bacteroides denticanum</i>	0,04%
<i>Limnobacter</i>	0,03%	<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	2,19%
<i>Bulleidia</i>	0,00%	<i>Megasphaera elsdenii</i>	0,00%
<i>Candidatus Blochmannia</i>	0,03%	<i>Serratia entomophila</i>	0,00%
<i>Legionella</i>	0,01%	<i>Desulfonauticus autotrophicus</i>	0,36%
<i>Caldithrix</i>	0,03%	<i>Luteolibacter algae</i>	0,17%
<i>Lactococcus</i>	0,01%	<i>Eggerthella sinensis</i>	0,08%
<i>Mesoplasma</i>	0,01%	<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	0,01%

<i>Desulfosporosinus</i>	0,00%	<i>Desulfotomaculum indicum</i>	0,13%
<i>Propionibacterium</i>	0,00%	<i>Anaerofilum pentosovorans</i>	0,10%
<i>Tepidibacter</i>	0,00%	<i>Veillonella atypica</i>	0,02%
<i>Fusobacterium</i>	0,00%	<i>Prevotella buccalis</i>	0,01%
<i>Staphylococcus</i>	0,01%	<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	0,26%
<i>Thermogemmatispora</i>	0,00%	<i>Bacteroides graminisolvans</i>	0,04%
<i>Geobacter</i>	0,01%	<i>Leuconostoc garlicum</i>	0,00%
<i>Erwinia</i>	0,00%	<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	0,04%
<i>Carboxydocella</i>	0,00%	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	1,02%
<i>Allobaculum</i>	0,00%	<i>Bifidobacterium bombi</i>	0,01%
<i>Cloacibacillus</i>	0,00%	<i>Peptoniphilus methioninivorax</i>	0,03%
<i>Yersinia</i>	0,00%	<i>Odoribacter denticanis</i>	0,08%
<i>Brenneria</i>	0,00%	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	0,07%
<i>Thermoanaerobacterium</i>	0,11%	<i>Thermodesulfovibrio thiophilus</i>	0,16%
		<i>Limnobacter litoralis</i>	0,05%
		<i>Peptoniphilus coxii</i>	0,03%
		<i>Turicibacter sanguinis</i>	0,01%
		<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	0,10%
		<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	0,00%
		<i>Blautia schinkii</i>	0,01%
		<i>Mesoplasma entomophilum</i>	0,01%
		<i>Succiniclasticum ruminis</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,00%
		<i>Clostridium histolyticum</i>	0,25%
		<i>Clostridium fallax</i>	0,00%
		<i>Sutterella wadsworthensis</i>	0,00%
		<i>Sutterella sanguinis</i>	0,00%
		<i>Caldilinea tarbellica</i>	0,09%

		<i>Lactobacillus japonicus</i>	0,05%
		<i>Veillonella denticariosi</i>	0,00%
		<i>Paraprevotella clara</i>	0,07%
		<i>Weissella salipiscis</i>	0,00%
		<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0,02%
		<i>Enterobacter amnigenus</i>	0,01%
		<i>Anaerotruncus colihominis</i>	0,06%
		<i>Prevotella albensis</i>	0,00%
		<i>Bacteroides plebeius</i>	0,00%
		<i>Bacteroides intestinalis</i>	0,00%
		<i>Oscillospira guilliermondii</i>	0,09%
		<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	0,00%
		<i>Veillonella montpellierensis</i>	0,01%
		<i>Sharpea azabuensis</i>	0,00%
		<i>Streptococcus lactarius</i>	0,00%
		<i>Bacteroides clarus</i>	0,01%
		<i>Prevotella timonensis</i>	0,00%
		<i>Mannheimia caviae</i>	0,00%
		<i>Clostridium thermoalcaliphilum</i>	0,02%
		<i>Desulfovibrio piger</i>	0,00%
		<i>Polaribacter butkevichii</i>	0,00%
		<i>Clostridium malenominatum</i>	0,00%
		<i>Actinomyces naturae</i>	0,02%
		<i>Lactobacillus paracasei</i>	0,00%
		<i>Brevibacterium album</i>	0,02%
		<i>Planifilum fimeticola</i>	0,03%
		<i>Natronincola peptidivorans</i>	0,01%
		<i>Bifidobacterium dentium</i>	0,00%

		<i>Butyricimonas virosa</i>	0,16%
		<i>Clostridium caenicola</i>	0,25%
		<i>Prevotella loescheii</i>	0,00%
		<i>Bacteroides coprophilus</i>	0,00%
		<i>Enterobacter soli</i>	0,00%
		<i>Actinomyces meyeri</i>	0,02%
		<i>Sporotomaculum syntrophicum</i>	0,03%
		<i>Streptococcus gordonii</i>	0,02%
		<i>Leuconostoc argentinum</i>	0,00%
		<i>Micromonospora rifamycinica</i>	0,01%
		<i>Lactobacillus hayakitensis</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0,01%
		<i>Vagococcus teuberi</i>	0,01%
		<i>Methanobrevibacter smithii</i>	0,00%
		<i>Streptomyces lazureus</i>	0,02%
		<i>Peptococcus niger</i>	0,01%
		<i>Rikenella microfusis</i>	0,06%
		<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,00%
		<i>Bifidobacterium subtile</i>	0,01%
		<i>Acetobacterium tundrae</i>	0,03%
		<i>Tetragenococcus doogicus</i>	0,01%
		<i>Mucispirillum schaedleri</i>	0,00%
		<i>Oribacterium sinus</i>	0,01%
		<i>Acholeplasma palmae</i>	0,01%
		<i>Streptococcus peroris</i>	0,00%
		<i>Zobellia laminariae</i>	0,02%
		<i>Weissella cibaria</i>	0,00%
		<i>Streptococcus intermedius</i>	0,00%

		<i>Streptococcus anginosus</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	0,00%
		<i>Prevotella multisaccharivorax</i>	0,00%
		<i>Veillonella dispar</i>	0,00%
		<i>Klebsiella variicola</i>	0,00%
		<i>Streptococcus oralis</i>	0,00%
		<i>Actinomyces lingnae</i>	0,01%
		<i>Enterobacter aceae</i>	0,00%
		<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	0,00%
		<i>Acholeplasma cavigenitalium</i>	0,01%
		<i>Bifidobacterium angulatum</i>	0,01%
		<i>Runella limosa</i>	0,01%
		<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	0,00%
		<i>Lactococcus fujiensis</i>	0,00%
		<i>Peptoniphilus olseni</i>	0,03%
		<i>Selenomonas infelix</i>	0,04%
		<i>Clostridium straminisolvens</i>	0,00%
		<i>Bacteroides gallinarum</i>	0,00%
		<i>Veillonella parvula</i>	0,00%
		<i>Bdellovibrio exovorax</i>	0,01%
		<i>Bacteroides salyersiae</i>	0,00%
		<i>Clostridium hveragerdense</i>	0,00%
		<i>Marinobacter arcticus</i>	0,02%
		<i>Enterobacter ludwigii</i>	0,00%
		<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0,00%
		<i>Granulicatella adiacens</i>	0,01%
		<i>Coprobacillus cateniformis</i>	0,01%
		<i>Rhodothermus clarus</i>	0,01%
		<i>Prevotella paludivivens</i>	0,00%

		<i>Bifidobacterium gallicum</i>	0,00%
		<i>Pediococcus argentinus</i>	0,01%
		<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,00%
		<i>Halanaerobium fermentans</i>	0,04%
		<i>Lactobacillus ultunensis</i>	0,00%
		<i>Escherichia coli</i>	0,00%
		<i>Tolomonas auensis</i>	0,00%
		<i>Candidatus Tammella caduceiae</i>	0,01%
		<i>Bacteroides finegoldii</i>	0,00%
		<i>Streptococcus mutans</i>	0,00%
		<i>Candidatus Contubernalis alkalaceticum</i>	0,00%
		<i>Propionispora hippei</i>	0,06%
		<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	0,00%
		<i>Bacteroides nordii</i>	0,00%
		<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,00%
		<i>Klebsiella granulomatis</i>	0,00%
		<i>Fructobacillus pseudoficulneus</i>	0,00%
		<i>Desulfovibrio tunisiensis</i>	0,01%
		<i>Lactococcus garvieae</i>	0,02%
		<i>Alkalibacterium subtropicum</i>	0,00%
		<i>Citrobacter freundii</i>	0,00%
		<i>Campylobacter canadensis</i>	0,01%
		<i>Enterococcus gilvus</i>	0,00%
		<i>Thermovenabulum ferriorganovororum</i>	0,00%
		<i>Enterobacter nickellidurans</i>	0,00%
		<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	0,00%
		<i>Acidaminococcus fermentans</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus equicursoris</i>	0,00%
		<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	0,00%

		<i>Gemella sanguinis</i>	0,00%
		<i>Enterococcus avium</i>	0,00%
		<i>Bulleidia moorei</i>	0,00%
		<i>Weissella koreensis</i>	0,00%
		<i>Thiohalorhabdus denitrificans</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus frumenti</i>	0,00%
		<i>Leuconostoc citreum</i>	0,00%
		<i>Geobacter pickeringii</i>	0,02%
		<i>Salinivibrio budaii</i>	0,01%
		<i>Actinocorallia herbida</i>	0,01%
		<i>Clostridium termitidis</i>	0,02%
		<i>Streptococcus dentirosetti</i>	0,00%
		<i>Clostridium perfringens</i>	0,00%
		<i>Prostheco bacter fluviatilis</i>	0,02%
		<i>Streptococcus troglodytae</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,00%
		<i>Desulfovibrio psychrotolerans</i>	0,02%
		<i>Carboxydocella ferrireducens</i>	0,00%
		<i>Bifidobacterium merycicum</i>	0,00%
		<i>Atopobium fossor</i>	0,01%
		<i>Bacteroides faecis</i>	0,00%
		<i>Lentibacillus salinarum</i>	0,00%
		<i>Sutterella stercoricanis</i>	0,00%
		<i>Rothia mucilaginosa</i>	0,00%
		<i>Emticicia oligotrophica</i>	0,00%
		<i>Mogibacterium neglectum</i>	0,02%
		<i>Roseomonas massiliensis</i>	0,01%
		<i>Enterococcus durans</i>	0,00%

		<i>Bacteroides salanitronis</i>	0,00%
		<i>Actinokineospora inagensis</i>	0,00%
		<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0,00%
		<i>Actinomyces turicensis</i>	0,00%
		<i>Candidatus Amoebophilus asiaticus</i>	0,00%
		<i>Anaerofustis stercorihominis</i>	0,01%
		<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	0,00%
		<i>Helicobacter suncus</i>	0,00%
		<i>Agromyces salentinus</i>	0,00%
		<i>Erwinia billingiae</i>	0,00%
		<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	0,00%
		<i>Desulfurispora thermophila</i>	0,00%
		<i>Leuconostoc palmae</i>	0,00%
		<i>Clostridium cavendishii</i>	0,00%
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,00%
		<i>Citrobacter werkmanii</i>	0,00%
		<i>Virgibacillus salexigens</i>	0,00%
		<i>Megasphaera micronuciformis</i>	0,00%
		<i>Coriobacterium glomerans</i>	0,01%
		<i>Litoricola lipolytica</i>	0,01%
		<i>Leuconostoc carnosum</i>	0,00%
		<i>Fusobacterium naviforme</i>	0,00%
		<i>Streptacidiphilus griseus</i>	0,00%
		<i>Moorella glycerini</i>	0,00%
		<i>Edaphobacter modestus</i>	0,00%
		<i>Porphyromonas circumdentaria</i>	0,03%
		<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	0,00%
		<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>	0,00%

		<i>Lactobacillus zeae</i>	0,00%
		<i>Streptococcus oligofermentans</i>	0,00%
		<i>Prevotella amnii</i>	0,15%
		<i>Thiomonas thermosulfata</i>	0,01%
		<i>Enterococcus faecalis</i>	0,00%
		<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	0,00%
		<i>Methylobacillus glycogenes</i>	0,01%
		<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	0,00%
		<i>Halanaerobium alcaliphilum</i>	0,00%
		<i>Methylostratum kenyense</i>	0,01%
		<i>Muricauda lutimaris</i>	0,00%
		<i>Prevotella maculosa</i>	0,00%
		<i>Mycoplasma edwardii</i>	0,01%
		<i>Oxalobacter vibrioformis</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus apis</i>	0,00%
		<i>Paenibacillus taiwanensis</i>	0,00%
		<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	0,00%
		<i>Atopobium parvulum</i>	0,00%
		<i>Yersinia nurmii</i>	0,00%
		<i>Acinetobacter antiviralis</i>	0,00%
		<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	0,00%
		<i>Slackia faecicanis</i>	0,00%
		<i>Dokdonella fugitiva</i>	0,00%
		<i>Streptococcus gallinaceus</i>	0,00%
		<i>Enterobacter hormaechei</i>	0,00%
		<i>Vagococcus penaei</i>	0,00%
		<i>Kribbella ginsengisoli</i>	0,00%
		<i>Calothrix parietina</i>	0,00%

		<i>Segetibacter aerophilus</i>	0,00%
		<i>Prevotella bivia</i>	0,00%
		<i>Roseomonas terpenica</i>	0,00%
		<i>Leptolyngbya laminosa</i>	0,00%
		<i>Pediococcus stilesii</i>	0,01%
		<i>Cohnella laeviribosi</i>	0,00%
		<i>Moryella indoligenes</i>	0,00%
		<i>Caloramator uzoniensis</i>	0,00%
		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,00%
		<i>Streptococcus infantis</i>	0,00%
		<i>Kineosporia mikuniensis</i>	0,00%
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,00%
		<i>Desulfonatronum thiosulfatophilum</i>	0,00%
		<i>Pelotomaculum isophthalicum</i>	0,01%
		<i>Thermoanaerobacterium islandicum</i>	0,17%
		<i>Tindallia magadiensis</i>	0,00%
		<i>Corynebacterium durum</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus senmaizukei</i>	0,00%
		<i>Luteibacter anthropi</i>	0,01%
		<i>Fingoldia magna</i>	0,00%
		<i>Prevotella oris</i>	0,00%
		<i>Azospirillum zeae</i>	0,00%
		<i>Catonella morbi</i>	0,00%
		<i>Aminiphilus circumscriptus</i>	0,01%
		<i>Lactococcus lactis</i>	0,00%
		<i>Sporosarcina pasteurii</i>	0,01%
		<i>Enterococcus hawaiiensis</i>	0,00%
		<i>Desulfurispirillum alkaliphilum</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus pentosus</i>	0,00%
		<i>Oerskovia ginkgo</i>	0,00%
		<i>Amycolatopsis methanolica</i>	0,00%
		<i>Deferribacter autotrophicus</i>	0,00%
		<i>Helicobacter mastomyrinus</i>	0,00%
		<i>Erythrobacter aquimaris</i>	0,00%
		<i>Sulfobacillus yellowstonensis</i>	0,00%
		<i>Mycoplasma iguanae</i>	0,00%
		<i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus equi</i>	0,00%
		<i>Pediococcus cellicola</i>	0,00%
		<i>Clostridium proteolyticus</i>	0,00%
		<i>Olivibacter soli</i>	0,00%
		<i>Propionibacterium acnes</i>	0,00%
		<i>Vibrio litoralis</i>	0,00%
		<i>Odoribacter laneus</i>	0,00%
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,00%
		<i>Propionibacterium microaerophilum</i>	0,00%
		<i>Propionibacterium humerusii</i>	0,00%
		<i>Bifidobacterium magnum</i>	0,00%
		<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus siliginis</i>	0,00%
		<i>Brevibacillus ginsengisoli</i>	0,00%
		<i>Weissella confusa</i>	0,00%
		<i>Halanaerobacter chitinivorans</i>	0,00%
		<i>Maricaulis indicus</i>	0,00%
		<i>Euzebya tangerina</i>	0,00%
		<i>Symbiobacterium toebii</i>	0,00%
		<i>Olsenella uli</i>	0,00%
		<i>Arcobacter butzleri</i>	0,00%

		<i>Bifidobacterium breve</i>	0,00%
		<i>Trabulsilla odontotermitis</i>	0,00%
		<i>Agromyces terreus</i>	0,00%
		<i>Brachyspira ibaraki</i>	0,00%
		<i>Caloramator fervidus</i>	0,00%
		<i>Bifidobacterium animalis</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus intermedius</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus thailandensis</i>	0,00%
		<i>Veillonella ratti</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus lindneri</i>	0,00%
		<i>Chroococcus minutus</i>	0,00%
		<i>Pyramidobacter piscolens</i>	0,00%
		<i>Coraliomargarita akajimensis</i>	0,00%
		<i>Paenibacillusarangshiensis</i>	0,00%
		<i>Leuconostoc lactis</i>	0,00%
		<i>Caldanaerobacter hydrothermalis</i>	0,01%
		<i>Enterobacter asburiae</i>	0,00%
		<i>Dolichospermum curvum</i>	0,00%
		<i>Propionibacterium avidum</i>	0,00%
		<i>Veillonella criceti</i>	0,00%
		<i>Microvirus Enterobacteria phage PhiX174</i>	0,00%
		<i>Mycobacterium lepromatosis</i>	0,00%
		<i>Alkalibacillus salilacus</i>	0,00%
		<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	0,00%
		<i>Erwinia papayae</i>	0,00%
		<i>Anaerococcus vaginalis</i>	0,00%
		<i>Acinetobacter gernerii</i>	0,00%
		<i>Streptococcus cristatus</i>	0,00%
		<i>Deinococcus piscis</i>	0,02%

		<i>Arcobacter marinus</i>	0,00%
		<i>Anaerobacillus alkalilacustre</i>	0,00%
		<i>Abiotrophia defectiva</i>	0,00%
		<i>Parabacteroides gordonii</i>	0,00%
		<i>Clostridium bovipellis</i>	0,00%
		<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	0,00%
		<i>Cerasicoccus arenae</i>	0,00%
		<i>Desulfofrigus oceanense</i>	0,00%
		<i>Rhodocyclus purpureus</i>	0,00%
		<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	0,00%
		<i>Clostridium paraputrificum</i>	0,00%
		<i>Tetragenococcus halophilus</i>	0,00%
		<i>Carnobacterium funditum</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus casei</i>	0,00%
		<i>Campylobacter concisus</i>	0,00%
		<i>Desulfovibrio litoralis</i>	0,00%
		<i>Neisseria mucosa</i>	0,00%
		<i>Dietzia alimentaria</i>	0,00%
		<i>Weissella soli</i>	0,00%
		<i>Zhouia amylolytica</i>	0,00%
		<i>Prevotella micans</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus panis</i>	0,00%
		<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	0,00%
		<i>Agrococcus versicolor</i>	0,00%
		<i>Scardovia wiggisiae</i>	0,00%
		<i>Desulfosporosinus lacus</i>	0,00%
		<i>Salinimicrobium terrae</i>	0,00%
		<i>Staphylococcus massiliensis</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus secaliphilus</i>	0,00%

		<i>Prevotella disiens</i>	0,00%
		<i>Prevotella aurantiaca</i>	0,00%
		<i>Schlegelella aquatica</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus tucseti</i>	0,00%
		<i>Leuconostoc gelidum</i>	0,00%
		<i>Uliginosibacterium gangwonense</i>	0,00%
		<i>Desulfovibrio simplex</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus versmoldensis</i>	0,00%
		<i>Granulicatella elegans</i>	0,00%
		<i>Variovorax boronicumulans</i>	0,00%
		<i>Novosphingobium subterraneum</i>	0,00%
		<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,00%
		<i>Clostridium caliposporum</i>	0,00%
		<i>Fructobacillus tropaeoli</i>	0,00%
		<i>Prevotella corporis</i>	0,00%
		<i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i>	0,00%
		<i>Kosmotoga arenicorallina</i>	0,00%
		<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	0,00%
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,00%
		<i>Arcobacter skirrowii</i>	0,00%
		<i>Carnobacterium inihbens</i>	0,00%
		<i>Luteococcus peritonei</i>	0,00%
		<i>Clostridium aestuarii</i>	0,00%
		<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	0,00%
		<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	0,00%
		<i>Pasteurella eae</i>	0,00%
		<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	0,00%
		<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	0,00%

		<i>Emticia ginsengisoli</i>	0,00%
		<i>Gemella haemolysans</i>	0,00%
		<i>Anaeroplasma abactoclasticum</i>	0,00%
		<i>Azospirillum halopraeferens</i>	0,00%
		<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,00%
		<i>Erwinia mallotivora</i>	0,00%
		<i>Streptococcus sobrinus</i>	0,01%
		<i>Weissella viridescens</i>	0,00%
		<i>Porphyromonas uenonis</i>	0,00%
		<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,01%
		<i>Desulfovibrio aceae</i>	0,00%
		<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	0,00%
		<i>Cetobacterium ceti</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus farciminis</i>	0,00%
		<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,01%
		<i>Lactobacillus salivarius</i>	0,00%
		<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0,00%
		<i>Campylobacter hominis</i>	0,00%
		<i>Achromobacter arsenitoxydans</i>	0,00%
		<i>Comamonas testosteroni</i>	0,00%
		<i>Bacteroides zooglyphiformans</i>	0,00%
		<i>Macroccoccus brunensis</i>	0,00%
		<i>Sarcina ventriculi</i>	0,00%
		<i>Tetragenococcus koreensis</i>	0,00%
		<i>Flammeovirga pacifica</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus brevis</i>	0,00%
		<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,00%
		<i>Clostridium cellulolyticum</i>	0,00%

		<i>Deinococcus caeni</i>	0,00%
		<i>Lactobacillus nodensis</i>	0,00%
		<i>Methanobrevibacter acididurans</i>	0,00%
		<i>Bacillus boroniphilus</i>	0,00%
		<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	0,00%
		<i>Psychrobacter halophilus</i>	0,00%
		<i>Prevotella saccharolytica</i>	0,00%
		<i>Microbacterium aurum</i>	0,00%
		<i>Yersinia frederiksenii</i>	0,00%

Tavola 17: Risultati delle analisi metagenomiche per l'identificazione del microbiota intestinale di un paziente (paziente numero 9 al tempo T3).

9. RINGRAZIAMENTI

Colgo l'occasione al termine di questo lavoro di tesi per ringraziare diverse persone che mi sono state molto vicine in questo mio percorso di studi, ma soprattutto nella vita, aiutandomi passo dopo passo, un pezzettino alla volta a realizzare il sogno di una vita, avere la fortuna di poter esercitare una professione che amo e che mi permetta di aiutare le altre persone, in altre parole diventare un medico.

Ringrazio il Professore Santino Marchi per la sua costante cordialità e per aver saputo trasferirmi la passione per la Gastroenterologia.

Ringrazio il Dott. Massimo Bellini, per tutto il tempo che mi ha dedicato in questo percorso intensamente formativo per me. Ringrazio Massimo per avermi sempre accolto col sorriso, per la sua umanità e disponibilità.

Ringrazio il Dott. Lorenzo Bertani, il Dott. Danilo Menicucci e la Dott.ssa Francesca Mastorci per l'aiuto che mi hanno dato.

Ringrazio il Dott. Dario Gambaccini per i consigli che ha saputo darmi.

Ringrazio l'intero staff della Gastroenterologia della AOUP per la meravigliosa accoglienza che mi hanno sempre riservato durante questo mio percorso formativo.

Ringrazio la mia Mamma, che mi è sempre stata vicina e mi ha sempre sostenuto soprattutto nei momenti più difficili. Ringrazio la mia Mamma perché mi ha dimostrato cosa vuol dire essere tenaci e caparbi nella vita. Ringrazio la mia mamma perché mi ha dato sempre tutto quello che aveva, mettendo sempre me e mia sorella davanti a tutto e tutti. Mamma, ti ringrazio per tutto quello che hai fatto e per tutti i consigli fondamentali che mi hai dato nei momenti belli e meno belli. Grazie di riuscire sempre a sciogliere i miei nodi. Grazie di ascoltarmi sempre e di aiutarmi con gesti, sguardi, sentimenti, che vanno ben oltre le tue importantissime parole.

Ringrazio il mio nonno che mi ha riempito di amore ogni giorno, e mi ha dimostrato cos'è l'amore.

Ringrazio la mia sorella perché semplicemente è la mia "Giulietta", con la quale ho condiviso tutto.

Ringrazio la mia fidanzata Vanessa, la mia compagna di vita, che mi ha sostenuto, e ha spesso dovuto sopportarmi nei momenti più duri. Oggi si realizza un'importante tappa anche per i nostri progetti futuri. Devo rendere merito, seppur con poche righe, a questa donna unica con

la quale sono cresciuto, perché ha sempre ricercato il mio bene e appoggiato le mie scelte. Giorno dopo giorno, senza risparmiare in fantasia, abbiamo tanto sognato questo momento. Non solo a parole, né solo con ciò che hai fatto, mi hai dimostrato il tuo amore, ma soprattutto con i tuoi sacrifici lo hai fatto. Oggi voglio che tu sappia che è anche la tua festa. Ti sarò sempre grato. TI AMO!

Infine una dedica particolare a una persona unica... al mio angelo custode, che mi dà la forza e mi protegge da tutto e da tutti...

Dedico questo lavoro di tesi al mio Babbo.

Per la prima volta mi sento di mettere in forma scritta delle parole dedicate a mio padre per ringraziarlo davanti a tutti, perché credo che questo sia il momento giusto.

Dedico al mio Babbo l'intero mio percorso di studi perché lui ha creduto in me prima di chiunque altro.

Dedico al mio Babbo la "missione" che mi accingo a svolgere perché lui è stata la mia figura di riferimento ogni giorno della mia vita, con parole, fatti e il suo vissuto.

Dedico al mio Babbo questa nostra vittoria perché, seppur questo giorno sia solo il primo passo di un lungo viaggio, non un traguardo, è per noi una bellissima tappa, tanto sudata e agognata, ma soprattutto tanto sognata fin dai tempi dell'infanzia.

Dedico questo sogno che si sta per realizzare al mio Babbo perché è stato il mio esempio di vita e ha seminato in me i semi dei valori della vita, con i quali sono cresciuto e di cui vado fiero.

Ci sarebbero tanti altri perché, ma il motivo più importante di questa mia dedica è che te la meriti più di chiunque altro.

Sono orgoglioso, fortunato e felice di essere tuo figlio, e spero tanto che oggi tu sia orgoglioso di essere il mio Babbo.

Andrei avanti per ore e ore a cantare le tue lodi e il mio infinito amore per te, ma non basterebbero chilometri di pagine.

Ora che mi assale un misto di emozioni che vanno dal sorriso al pianto, per il quale non esistono parole atte a descriverle pienamente, decido di far prevalere un bel sorriso, di quelli che ti piacciono tanto, e di finire questa mia dedica con un'ultima parola: GRAZIE! GRAZIE BABBO! SEI LA MIA FORZA!

Ehi! Questo non è solo che l'inizio! Sai bene che ho tanti altri sogni dentro di me da realizzare! Quindi rimbocchiamoci le mani! Ahahahahahahahah =) =) =)

Andrea Pancetti