

## INFORMATIVA ALL'ESECUZIONE DEL TEST EUBIOMEGUT/ EUBIOMEGUT COMPLETE

### Il microbioma intestinale

Il corpo umano ospita milioni di cellule microbiche. Tali popolazioni di cellule microbiche raggiungono la più alta densità nel comparto intestinale, dove formano una comunità microbica complessa conosciuta come microbiota intestinale.

Il **microbiota intestinale** è costituito dall'insieme di diversi microrganismi che coesistono nell'intestino. La presenza di tali microrganismi favorisce la corretta funzionalità del distretto gastroenterico, mantenendo uno stato di benessere generale (1,2).

Le comunità microbiche principalmente presenti a livello intestinale sono appartenenti a differenti Phyla: Batteri Gram Positivi (Firmicutes e BifidoBacteria), Batteri Gram negativi (Bacteroides). Potrebbero inoltre essere presenti quali commensali comunità fungine (Genere Candida) e Virali (Rotavirus, Adenovirus, tra altri) (1-5).

I batteri del genere Bifidobacteria rappresentano un biomarker di salute e benessere del distretto intestinale. I bifidobatteri, colonizzano l'intestino nei primi anni di vita aumentando fino alla fase adulta, dove permangono stabili, riducendo la loro carica e potenziale all'aumentare dell'età (6).

Negli ultimi anni, la letteratura scientifica ha descritto uno stretto rapporto tra il microbiota dell'intestino ed il sistema immunitario. Con l'aumentare dell'età, infatti, il microbiota intestinale tende a sviluppare squilibri nei phyla principali quali i firmicutes e i Bacteroides, con conseguente impatto sul sistema immunitario e sul conseguente stato di benessere, fenomeno definito "immunosenescenza" (6-9). Recenti studi hanno dimostrato che l'alterazione dell'equilibrio dei batteri (disbiosi) nell'intestino potrebbe avere un ruolo sullo stato di benessere, sull'insorgenza di intolleranze alimentari, insorgenza di patologie autoimmuni in individui predisposti geneticamente. Pertanto la presenza di disbiosi, ovvero mancato equilibrio dell'ecosistema intestinale è oramai considerato come un marcatore di predisposizione ad allergie e intolleranze o ipersensibilità, sindromi metaboliche quali insulino resistenza, diabete, iperlipidemia e ipercolesterolemia, obesità, oltre a infezioni batteriche, fungine e virali causative di gastroenteriti (7).

### Funzioni del Microbioma Intestinale:

Le principali funzioni del Microbioma intestinale sono:

- a. **Metabolica e Trofica** mediante la degradazione degli acidi grassi a catena lunga e al metabolismo dei carboidrati (6);
- b. **Immunologica/Immunomodulante:** Il termine "inflammaging" si riferisce ad un progressivo aumento del livello ematico di citochine e proteine infiammatorie accompagnato da una perdita di immunità protettiva nell'invecchiamento (7-10);
- c. **Antimicrobica/ Protettiva:** A seguito di acidificazione della mucosa da parte dei Lattobacilli e la produzione di batteriocine si evita la sovracrescita dei lieviti e di germi commensali, conservando la barriera mucosale sana con giunzioni cellulari salde, ed evitando il passaggio di macromolecole o immunocomplessi causativi di infiammazioni croniche localizzate (6).

I **microrganismi** comunemente riscontrati sono appartenenti ai phyla Firmicutes, Bacteroides e Prevotella, definendo tre principali enterotipi (3, 7-12):

1. ET-P: a Maggiore abbondanza di Prevotella tipico di chi ha un'alimentazione ricca di carboidrati;
2. ET-R: A maggiore abbondanza di Bacteroides tipico di chi ha una dieta molto varia con elevata assunzione di fibre giornaliere;
3. ET-B: a maggiore abbondanza di Firmicutes tipico di chi ha una alimentazione ricca di Grassi e Proteine.

## Finalità e Vantaggi di EUBIOMEGUT

### Finalità del test EUBIOMEGUT

**EUBIOMEGUT** è un test di screening che permette di studiare la composizione genetica del microbiota intestinale determinando lo stato di Eubiosi o Disbiosi. Il test **EUBIOMEGUT** fornisce una visione completa della composizione batterica Intestinale riportando i microrganismi più rappresentati nell'intestino, oltre a identificare i patogeni più comunemente causativi di gastroenterite batterica.

**EUBIOMEGUT COMPLETE** permette anche, su richiesta specifica, di valutare la presenza di virus, parassiti causativi di gastroenteriti, con contestuale ricerca dei principali miceti. **EUBIOMEGUT Complete** permette l'identificazione dei principali agenti infettivi ad eziologia parassitaria, virale in pazienti pediatriche, anziani, o di ritorno da soggiorni in zone tropicali, nonché la determinazione di patogeni causativi di tossinfezioni alimentari.

**EUBIOMEGUT** fornisce informazioni utili per la pianificazione del percorso di benessere e nutrizionale.

**EUBIOMEGUT** è rivolto a pazienti con sintomatologia gastroenterica, con tendenza ad obesità, con sindrome metabolica, con patologie autoimmuni, al fine di accedere a percorsi nutrizionali o di valutazione del proprio stato di salute.

### Vantaggi del test EUBIOMEGUT nel rilevamento dei patogeni causativi di gastroenterite rispetto ai metodi classici

La coltura microbiologica classica è l'attuale metodica di riferimento per la valutazione della popolazione batterica del tratto gastrointestinale, tuttavia la metodica potrebbe essere non risolutiva nella definizione di disbiosi in particolare per la rilevazione di germi con particolari esigenze colturali. La valutazione molecolare del microbioma mediante **EUBIOMEGUT** consente di rilevare la presenza anche di batteri di difficile coltivazione che necessitano di terreni arricchiti e selezionati.

I limiti della coltura microbica si riflettono inevitabilmente sulla diagnosi di disbiosi che può essere sottostimata con le metodiche classiche.

**EUBIOMEGUT**, utilizzando approcci di microbiologia molecolare, rappresenta quindi un utile supporto nel percorso diagnostico delle infezioni del tratto gastrointestinale e nella valutazione dello stato di disbiosi.

### Indicazioni al test EUBIOMEGUT

**EUBIOMEGUT** è indicato in caso di:

- Pazienti con **sintomatologia gastroenterica** (Pediatrici, Adulti, Anziani)
- Pazienti con **Allergie o Sensibilità o Intolleranze alimentari**
- Pazienti con sindrome metabolica
- Pazienti con suscettibilità a patologie autoimmuni
- Pazienti con diagnosi di morbo celiaco
- Pazienti che approcciano un percorso **nutrizionale**
- Tutte i pazienti che ricercano uno stato di benessere anche in assenza di specifiche indicazioni cliniche.

### Risultati di EUBIOMEGUT

Il referto di **EUBIOMEGUT** fornisce informazioni sull'ambiente microbico intestinale, producendo i seguenti possibili risultati:

1. Stato di permeabilità intestinale, ricavato dalla concentrazione relativa dei microorganismi appartenenti ai Phyla Firmicutes e Bacteroides.
2. Indice di Disbiosi: Viene descritto lo stato e il grado di disbiosi calcolato come rapporto delle comunità microbiche Firmicutes vs Bacteroides.
3. Descrizione delle popolazioni microbiche: Viene descritta la popolazione microbica a livello di Phyla presente nel campione analizzato, e confrontato con un soggetto sano. In base al rapporto Firmicutes/Bacteroides viene valutato il rischio specifico di suscettibilità a patologie infiammatorie e l'efficienza metabolica nella digestione di carboidrati e acidi grassi. Viene descritta anche la Biodiversità Batterica in termini di specie. Maggiore è l'indice di biodiversità, maggiore è lo stato di benessere della mucosa intestinale.
4. Presenza/Assenza di Batteri associati a Gastroenterite o Tossinfezioni Alimentari:
  1. *E coli spp*
  2. *Salmonella spp*
  3. *Shigella Spp*
  4. *Campylobacter spp*
  5. *Klebsiella spp*
  6. *Haemophilus spp*
  7. *Proteus spp*
  8. *Helicobacter spp*
  9. *Clostridium spp*
  10. *Staphylococcus Aureus*
  11. *Bacillus cereus*
  12. *Aereomonas spp*
  13. *Listeria monocytogenes*
  14. *Yersinia enterocolitica*
  15. *Vibrio spp*

5. In caso di **EUBIOMEGUT Complete** il pannello delle gastroenteriti e del microbioma intestinale viene completato con la ricerca degli agenti infettivi ad eziologia virale quali:
  - a. *Adenovirus (AdV)*
  - b. *Astrovirus*
  - c. *Norovirus*
  - d. *Rotavirus*
  - e. *Sapovirus*
  
6. Agenti infettivi ad eziologia parassitaria, causativi di gastroenteriti:
  - a. *Blastocystis hominis (BH)*
  - b. *Cryptosporidium spp. (CR)*
  - c. *Cyclospora cayetanensis (CC)*
  - d. *Dientamoeba fragilis (DF)*
  - e. *Entamoeba histolytica (EH)*
  - f. *Giardia lamblia (GL)*
  
7. Agenti ad infezione fungina:
  - a. *Candida albicans*
  - b. *Candida glabrata*
  - c. *Candida krusei*
  - d. *Candida parapsilosis*
  - e. *Candida tropicalis*

#### **ESITO NON INFORMATIVO:**

L'esito del test risulta non informativo quando il profilo di sequenziamento genico ottenuto non consente di definire la costituzione del microbioma intestinale. Tale risultato può essere ottenuto in caso di presenza di inibitori di amplificazione genica nel campione analizzato. A seguito di tale risultato si consiglia la ripetizione del prelievo.

#### **DNA INSUFFICIENTE O DI SCARSA QUALITÀ:**

L'analisi non ha permesso di ottenere un risultato a causa della scarsa quantità e/o qualità di acido nucleico (DNA) estratta dal campione, si consiglia la ripetizione del prelievo.

#### **Metodo di Analisi:**

Il workflow d'analisi prevede l'estrazione del DNA dal campione biologico, seguita da amplificazione del DNA mediante PCR e successivo **sequenziamento** delle regioni ipervariabili (V3, V4,) del gene batterico 16S che codifica per l'RNA ribosomiale 16S.

Il gene batterico 16S del rRNA, conservato in tutti i batteri, presenta nove regioni variabili con le sequenze del DNA specie-specifiche. L'analisi delle regioni V3 e V4 permette l'assegnazione tassonomica e la quantificazione relativa di ogni batterio presente in un campione. Le sequenze genetiche risultanti sono analizzate attraverso un'analisi **bioinformatica**.

I **batteri** causativi di gastroenterite analizzati mediante sequenziamento sono:

1. *E coli spp*
2. *Salmonella spp*
3. *Shigella Spp*
4. *Campylobacter spp*
5. *Klebsiella spp*
6. *Haemophilus spp*
7. *Proteus spp*
8. *Helicobacter spp*
9. *Clostridium spp*
10. *Staphylococcus Aureus*
11. *Bacillus cereus*
12. *Aereomonas spp*
13. *Listeria monocytogenes*
14. *Yersinia enterocolitica*
15. *Vibrio spp*

I microorganismi ad eziologia Fungina (*Candida Spp*), virali, e parassitarie sono identificati mediante amplificazione genica con sonde target specifiche per ogni patogeno, con metodica realtime PCR, mediante l'utilizzo di Kit commerciali CE-IVD.

#### **Limiti dell'analisi:**

Il test **EUBIOMEGUT** fornisce risultati sulla composizione microbica intestinale e le sue indicazioni e risultanze devono essere valutate dallo specialista nel contesto clinico complessivo.

La mancata identificazione di batteri riferiti a patologie gastrointestinali, la definizione dell'enterotipo o lo stato di eubiosi/disbiosi devono essere valutate dallo specialista di riferimento (Dietologo, Nutrizionista, Gastroenterologo, Medico di medicina generale, Geriatra, Pediatra) prima di apportare modifiche allo stile di vita o ai piani terapeutici.

Esiste un rischio inferiore all'1% che con la procedura non si ottenga un campione idoneo all'analisi in quanto il materiale ottenuto è di qualità non ottimale o di quantità esigua. Esiste altresì la possibilità che il risultato ottenuto sia non informativo anche qualora il campione sia idoneo. In tal caso si raccomanda l'esecuzione di un nuovo prelievo.

Per l'esecuzione dell'analisi **EUBIOMEGUT** è necessario che sia correttamente compilato e firmato il Test Requisition Form (TRF). In caso alcune informazioni richieste siano mancanti il laboratorio contatterà il medico per ottenere tali informazioni. Tale comunicazione potrebbe modificare i tempi di lavorazione del campione e di emissione del referto.

**EUBIOMEGUT** è mirato alla valutazione dei batteri, virus, funghi e parassiti più comunemente causativi di gastroenteriti. Un risultato di microbioma normale non esclude la presenza di microorganismi diversi da quelli indicati. La metodica utilizzata non permette di discriminare i microorganismi sino al livello di specie in tutti i casi.

Qualora non fosse possibile definire la specie verrà valutato il livello superiore di genere. Per alcuni microrganismi la distinzione della specie presente può essere rilevante nel definire l'approccio terapeutico. Qualora **EUBIOMEGUT** non fosse in grado di discriminare il livello di specie potrebbero essere indicati ulteriori accertamenti.

### Bibliografia:

1. Falony G., Joossens M., Vieira-Silva S., et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352:560–564.
2. Asnicar F., Berry S.E., Valdes A.M., et al. Microbiome connections with host metabolism and habitual diet from 1,098 deeply phenotyped individuals. *Nat. Med.* 2021;27:321–33
3. Di Pierro F. Special Issue "Gut Microbioma Structure and Functions in Human Health and Disease": Editorial. *Microorganisms*. 2023 May 6;11(5):1220.
4. Wiertsema SP, van Berghenhenegouwen J, Garssen J, Knippels LMJ. The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of Infectious Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies. *Nutrients*. 2021;13(3):886.
5. Milani C Sabrina Duranti, a Francesca Bottacini et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2017 ; 81 4 e00036-17
6. Vemuri R. Gut Microbial Changes, Interactions, and Their Implications on Human Lifecycle: An Ageing Perspective. *Hindawi BioMed Research International* Volume 2018.
7. Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics* 2011; 5: 71-86.
8. Paul I. Costea, Falk Hildebrand, Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition: *Nat Microbiol.* 2018;3(1):8-16
9. Bosco N and Noti. M The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes & Immunity*. 2021; 22:289–303
10. Sadighi Akha AA. Aging and the immune system: an overview. *J Immunol Methods*. 2018;463:21–6
11. Manor O, Dai CL, Kornilov SA, et al. Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *NATURE COMMUNICATIONS* 2020; 11:5206
12. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E. et al. Erratum: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011 474, 666