



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

"Scienze Mediche e Chirurgiche Traslazionali"

CICLO XXXIV

***"EFFETTO DELLA TERAPIA BIOLOGICA SUL MICROBIOTA INTESTINALE DI PAZIENTI
AFFETTI DA MALATTIA INFIAMMATORIA CRONICA INTESTINALE"***

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Nicola Sverzellati

Tutore:

Chiar.mo Prof. Gian Luigi de'Angelis

Dottoranda: Dott.ssa Federica Gaiani

Anni Accademici 2018/2019 – 2020/2021

ABSTRACT

Introduzione

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) sono patologie con eziologia multifattoriale e patogenesi autoimmune. Tra i fattori eziologici chiave si riconosce il microbiota intestinale, che, secondo i dati di letteratura, presenta squilibri nei pazienti affetti da MICI rispetto ai soggetti sani, con incremento di specie pro-infiammatorie, calo di specie anti-infiammatorie e della biodiversità. Non è ancora stato stabilito se e come il microbiota sia in grado di influenzare la risposta alla terapia delle MICI o se al contrario la terapia sia in grado di modificare le caratteristiche del microbiota, in primis la terapia biologica, sempre più utilizzata in questi pazienti per efficacia e sicurezza superiori rispetto alle terapie tradizionali. Scopo dello studio è quello di descrivere eventuali modificazioni del microbiota intestinale di pazienti affetti da Morbo di Crohn (CD) e sottoposti a terapia biologica con anti-TNF α .

Materiali e Metodi

L'arruolamento è stato condotto presso la UOC di Gastroenterologia ed Endoscopia digestiva della Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma dal settembre 2020 al giugno 2021. Per ogni paziente sono stati raccolti 3 campioni consecutivi di feci prima dell'inizio della terapia, dopo l'induzione e dopo 12 settimane di terapia (T0-T1-T2). Sono inoltre stati raccolti dati demografici e clinici tra cui CDAI score per l'andamento clinico di malattia e SES-CD score per l'andamento endoscopico del CD. L'analisi dei campioni è stata condotta mediante shotgun metagenomics presso il Laboratorio di Probiognomica dell'Università di Parma. Sono state calcolate per ogni campione l'alfa diversità (species richness) e la beta diversità per ogni paziente calcolando le differenze tra T0 e T2 secondo matrici di Bray-Curtis.

Risultati

Sono stati arruolati 13 pazienti adulti affetti da CD, naïve alla terapia biologica e sottoposti ad anti-TNF α (infliximab o adalimumab). Tutti i pazienti sono risultati essere responder alla terapia, con un abbassamento di CDAI e SES-CD. Sono stati analizzati un totale di 38 campioni (3 tempi per

12 pazienti e T0-T2 per un solo paziente). In totale sono state isolate 160 specie con un'importante variabilità interindividuale nella loro distribuzione. Il calcolo della beta diversità ha dimostrato che il microbiota intestinale ha subito variazioni per ogni paziente nel corso del follow up, senza tuttavia la possibilità di identificare cluster di campioni con caratteristiche simili. Sono state quantificate le specie più condivise in T0-T1-T2, inoltre è stata calcolata l'abbondanza di ogni specie e la percentuale di variazione tra T0 e T2, identificando quali specie sono aumentate e quali diminuite in seguito a terapia.

Discussione e conclusioni

I dati emersi dai sequenziamenti collocano il presente studio nell'ambito dell'analisi di "big data". La variabilità interindividuale e la numerosità di specie isolate in assenza di chiari pattern capaci di accumulare cluster di campioni rendono i dati ottenuti finora preliminari. La prosecuzione dell'analisi dei dati ottenuti e l'ampliamento del campione con il possibile arruolamento di una coorte di pazienti resistenti a terapia potrebbero consentire l'individuazione di pattern del microbiota capaci di predire e dimostrare la risposta alla terapia quali possibili marker da applicare alla pratica clinica.

INTRODUZIONE

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (conosciute con l'acronimo italiano "MICI" o con quello inglese "IBD"- *Inflammatory Bowel Disease*) sono un gruppo di patologie caratterizzate da un processo flogistico cronico che interessa il tratto gastrointestinale, contraddistinte dall'alternarsi di periodi di remissione e recidiva di attività. Si possono riconoscere due entità patologiche principali: Morbo di Crohn (CD- *Crohn Disease*) e Rettocolite Ulcerosa (UC- *Ulcerative Colitis*).

Epidemiologia

Dal punto di vista epidemiologico, tassi più elevati di incidenza e prevalenza sono stati storicamente associati a Nord Europa, Regno Unito e Nord America, ma recentemente è stato osservato un aumento di incidenza e prevalenza anche in Europa Centrale e Meridionale, Asia, Africa ed America latina, seppur con i limiti legati a scarsi dati epidemiologici provenienti dai Paesi in via di sviluppo [1]. Una Systematic Review, pubblicata nel 2012 da Molodecky et al., che ha raccolto dati da 167 studi relativi all'Europa (1930–2008), 27 studi relativi Nord America (1920–2004) e 52 studi relativi ad Asia e Medio Oriente (1950–2008), ha dimostrato un aumento statisticamente significativo dell'incidenza delle MICI nel tempo e nelle differenti aree del mondo [2].

Per quanto riguarda il Morbo di Crohn la più alta incidenza annuale è stata di 12.7 per 100.000 persone/anno in Europa, di 20.2 per 100.000 persone/anno in Nord-America ed è stata di 5.0 per 100.000 persone/anno in Asia e in Medio Oriente. I valori di prevalenza più alti riportati per le MICI sono stati in Europa (UC, 505 ogni 100.000 persone; CD, 322 ogni 100.000 persone) e in Nord America (UC, 249 ogni 100.000 persone; CD, 319 ogni 100.000 persone) [2].

La diffusione delle MICI sta pertanto diventando un'emergenza, poiché sta assumendo un profilo sempre più globale [1, 2].

Le MICI si associano classicamente ad una distribuzione bimodale nell'età di insorgenza della malattia, con un primo picco che si verifica tra la seconda e terza decade di vita e un secondo picco, di minore entità, che si verifica nelle decadi più avanzate di vita, sebbene questo non sia stato

confermato in modo uniforme dai diversi studi epidemiologici condotti. Non è chiaro se queste differenze di distribuzione in relazione all'età di insorgenza siano reali o siano dovute a differenze in termini di criteri diagnostici e/o classificativi [1].

Il progressivo aumento della diffusione di questo gruppo di malattie ha riguardato negli ultimi anni anche la popolazione in età pediatrica: attualmente, approssimativamente il 25% dei pazienti con MICI riceve la diagnosi prima dei 18 anni e circa un quarto di tutti i bambini e adolescenti affetti riceve la diagnosi prima dei 10 anni [3, 4].

La letteratura conferma che familiarità e fattori genetici hanno una forte influenza sull'insorgenza di queste forme: uno studio ha dimostrato che circa il 29% dei pazienti coinvolti, con MICI ad insorgenza in età pediatrica, presentava uno o più familiari affetti da MICI, mentre il sottogruppo di bambini con diagnosi di Rettocolite Ulcerosa, ricevuta sotto i 3 anni di età, aveva la più alta prevalenza di parenti di primo grado affetti da MICI (44%) [5].

Tra le altre ipotesi che possono spiegare questo crescente fenomeno è stato considerato anche l'uso di antibiotici: è stato documentato che i pazienti che hanno ricevuto diagnosi di MICI nell'infanzia hanno più probabilità di aver fatto uso di antibiotici nel primo anno di vita. Infatti lo sviluppo del microbioma commensale, la cui alterazione si pensa contribuisca all'eziologia delle MICI, nei bambini si è dimostrata essere sensibile all'uso di antibiotici: questo comporterebbe importanti cambiamenti a carico del microbiota intestinale in una fase precoce della vita, quando il microbiota gioca un ruolo fondamentale nel definire lo sviluppo immunitario [6, 7].

Studi murini hanno dimostrato come l'esposizione ad agenti biologici nella prima infanzia sia associata ad una protezione verso lo sviluppo di malattie immunomediate, come MICI e Asma: l'interazione con la flora commensale in questa fascia d'età sarebbe determinante nel realizzare una tolleranza da parte di alcune cellule immunitarie presenti a livello mucosale verso successive esposizioni ambientali [8]. Altri eventi come la modalità di parto, l'allattamento, l'esposizione agli animali e alle infezioni, soprattutto in relazione alla nota "Ipotesi dell'Igiene", sono stati associati

ad un aumento del rischio di sviluppo di MICI, prevalentemente in relazione all'influenza che questi possono avere sulla composizione del microbiota [6].

Eziopatogenesi

Nonostante i meccanismi alla base della patogenesi delle MICI non siano ancora stati completamente chiariti, si ritiene che l'eziologia sia multifattoriale, legata all'interazione di fattori genetici, ambientali e infettivi: in particolare la teoria più accreditata al momento ipotizza che la causa sia riconducibile ad una risposta immunitaria contro i microrganismi del microbiota intestinale, legata ad una predisposizione genetica, unitamente a fattori ambientali come dieta e terapia antibiotica. Tali fattori sarebbero in grado di influire su diversi passaggi della patogenesi attraverso un'azione sulla funzione di barriera intestinale e modificando la composizione del microbiota [3, 9].

Esistono numerose evidenze che dimostrano un ruolo del microbiota nella patogenesi delle MICI: la diversione fecale induce la remissione nel Morbo di Crohn; nei modelli animali relativi allo studio della colite la presenza di microbiota è richiesta per dare inizio al processo infiammatorio; a livello della mucosa dei pazienti affetti da MICI è osservabile una carica batterica aumentata, studi GWAS relativi a queste patologie hanno individuato polimorfismi nei geni coinvolti nel riconoscimento e nella rimozione dei batteri che compongono il microbiota ed infine l'utilizzo di antibiotici a largo spettro sembra influire positivamente sul trattamento delle MICI [10].

Nello specifico i polimorfismi associati al CD coinvolgono il recettore intracellulare NOD2, TLR2,4 e 5, il gene ATG 16L1, che regola a livello intracellulare la processazione e l'eliminazione microbica, e NCF4 che media l'uccisione NADPH dipendente di batteri da parte dei fagociti: si avvalora pertanto in questi pazienti la probabile presenza di una risposta immunitaria innata difettiva verso gli agenti microbici [11].

Diversi studi hanno dimostrato il ruolo di specifici microrganismi nel determinare la severità dell'infiammazione intestinale. È stata riportata ad esempio una riduzione dei batteri anaerobi che partecipano normalmente alla composizione del microbiota intestinale come *Bacteroides* (*Bacteroidetes phylum*), *Eubacterium*, *Lactobacillus species* (*Firmicutes phylum*): in particolare, in pazienti affetti da Morbo di Crohn ci sono meno batteri *Firmicutes* e allo stesso tempo si verifica un aumento simultaneo di *Proteobacteria*. Questi pazienti presentano anche una riduzione dei batteri appartenenti al gruppo *Clostridium leptum*, in particolare *Faecalibacterium prausnitzii* [10, 12-14]. Tutti questi studi evidenziano come la sostanziale perdita di diversità batterica sia probabilmente un fattore dominante nella patogenesi delle MICI: si determinerebbe così lo sviluppo di una disbiosi che potrebbe essere responsabile del viraggio di una sana flora batterica omeostatica verso specie microbiche dannose e proinfiammatorie, situazione che potrebbe successivamente predisporre ad infiammazione intestinale [10, 12, 15, 16].

Gli effetti combinati di fattori genetici e ambientali comportano probabilmente l'attivazione di una risposta immunitaria a livello della mucosa intestinale. Rimane da chiarire se questa attivazione dipenda da un difetto intrinseco di funzionamento (riconcucibile ad una attivazione costitutiva o al fallimento dei meccanismi di down-regulation) o sia conseguente ad una stimolazione continuativa nel tempo, che determina una variazione nelle proprietà di barriera dell'epitelio della mucosa intestinale [17, 18].

Il microbiota commensale dell'intestino è separato dai tessuti dell'ospite da un singolo strato di cellule epiteliali. Per mantenere una relazione omeostatica con il microbiota, l'ospite ha sviluppato diverse strategie finalizzate a minimizzare il contatto tra i microrganismi e la superficie epiteliale, e conseguentemente a ridurre una possibile penetrazione, che potrebbe scatenare una risposta infiammatoria indesiderata: tra queste la secrezione di muco e il rilascio di proteine ad azione antimicrobica e di immunoglobuline nel lume intestinale [19].

Le cellule epiteliali intestinali, che si trovano localizzate tra il sistema immunitario della mucosa intestinale e la flora commensale, costituiscono una fondamentale barriera di difesa contro numerosi batteri e potrebbero pertanto rivestire un ruolo centrale nella patogenesi delle MICI [20].

La perdita dell'integrità di questa barriera e il conseguente aumento della permeabilità della mucosa comportano l'accumulo e il passaggio di microrganismi potenzialmente patogeni attraverso la superficie epiteliale: si verrebbe così a creare una condizione di disbiosi e di alterazione delle risposte immunitarie, con l'attivazione di una sequela infiammatoria inappropriata, associata ad un rapido processo di apoptosi delle cellule epiteliali [20, 21].

I pathways molecolari alla base di questo processo infiammatorio aberrante sono stati via via negli anni chiariti, anche grazie ad alcuni studi su modelli murini: un importante ruolo sembra sia svolto dalla interleuchina 22 (IL-22), secreta dalle cellule linfoidi innate di tipo 3 (ILC3), che partecipa alla creazione del mutualismo esistente tra ospite e microbiota e al contenimento anatomico dei batteri commensali, al fine di mediare una funzione di barriera e di difesa dell'ospite verso i microrganismi. Questa interleuchina infatti è in grado di indurre l'espressione di peptidi ad azione antimicrobica che prevengono la disseminazione di alcuni batteri e limitano la colite mediata da linfociti T helper 17 (Th17). La deplezione di cellule linfoidi innate o l'interruzione del segnale della IL-22 porta di conseguenza ad una perdita del contenimento batterico e quindi ad una maggiore suscettibilità alle infezioni enteriche e a colite [19, 21, 22].

Inoltre, nonostante la lamina propria della mucosa sia pressoché priva di cellule infiammatorie, alcuni neutrofili possono trasmigrare sul versante luminale dell'intestino ed eliminare batteri presenti in prossimità della superficie epiteliale attraverso svariati meccanismi, tra cui l'oxidative burst [19].

Altri pathways coinvolti nella risposta infiammatoria originata dalla interazione tra microbiota ed epitelio intestinale sono quelli che determinano l'esocitosi di granuli con azione antimicrobica da parte di alcune popolazioni cellulari, come le cellule di Paneth e le cellule con funzione di

autofagia, che rappresenta una risposta stressoria correlata a diverse condizioni fisiologiche e patologiche, tra cui la difesa verso i microrganismi [21, 22].

Le molecole che presentano ruoli chiave in questi pathways sono spesso codificate da geni riconosciuti tra quelli suscettibili per sviluppo di MICI come il gene NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2, anche indicato con CARD15 o IBD1), che codifica per una proteina con funzione di recettore intracellulare, in grado di riconoscere componenti della parete batterica. Nel Morbo di Crohn alterazioni a carico di NOD2, come mutazioni “loss-of-function” presenti in fagociti come macrofagi e cellule dendritiche, compromettono il riconoscimento dei batteri ed unitamente ad alterazioni di altre proteine come ATG16L1, XBP1 e LRRK2, compromettono il funzionamento di alcuni pathways, portando ad un diminuito rilascio di granuli ad azione antimicrobica: NOD2 inoltre può influenzare anche i pathways responsabili dell’autofagia insieme ad altre proteine come ATG16L1 e IRGM, riducendo la capacità di clearance batterica [19, 21, 23]. Altri geni i cui polimorfismi determinano una suscettibilità per il Morbo di Crohn, sono TNFSF15 e IL-23R, il gene che codifica per il recettore per l’interleuchina 23: questi regolano l’attivazione delle cellule linfoidi innate di tipo 3 (ILC3) e delle cellule Th17, che hanno un ruolo cruciale nel contenimento dei microrganismi simbiotici attraverso la produzione di interleuchina 17(IL-17) e di interleuchina 22 (IL-22). Altri esempi sono forniti da geni coinvolti nella regolazione dei processi di autofagia e da un certo numero di geni coinvolti nei meccanismi di eliminazione batterica, le cui mutazioni ne alterano la funzione, impedendo i processi di oxidative burst e di produzione di specie reattive dell’ossigeno (per esempio CYBB, CYBA, NCF1, NCF2, NCF4, RAC1 and RAC2) [19, 21].

Focus sul microbiota intestinale

Il microbiota intestinale è l’insieme dei microrganismi simbiotici residente nel tratto enterico dell’uomo. L’ecosistema intestinale è costituito da più di 100 trilioni di microorganismi aventi

funzioni trofiche, immunitarie e metaboliche fondamentali per un corretto sviluppo, per lo stato di benessere e per il mantenimento dell'omeostasi dell'individuo.

La numerosità è tale che il rapporto tra il numero di cellule procariotiche, suddivise in circa 1000 tipi di batteri, e quello di cellule eucariotiche del corpo umano è di 10:1. Inoltre, mentre il nostro organismo possiede all'incirca 25000 geni, il microbiota ne possiede più di un milione. Questa quantità di microorganismi incrementa gradualmente dall'esofago al colon [24].

Nel colon sono presenti soprattutto 2 Phyla: Firmicutes (gram-positivi) e Bacteroidetes (gram-negativi); questi sono deputati a:

- difendere ed inibire la colonizzazione intestinale da parte di batteri patogeni; i microrganismi residenti rappresentano, infatti, una prima linea di resistenza contro l'invasione di microrganismi esogeni. Ciò avviene principalmente mediante la produzione di sostanze ad attività battericida ed antimicrobica, le batteriocine. I ceppi batterici che le producono, chiamati colicinogeni, sono resistenti agli effetti tossici delle stesse; inoltre, qualora la concentrazione endoluminale di questi composti peptidici risulti eccessiva e potenzialmente lesiva per l'epitelio, intervengono le proteasi intestinali. L'altro meccanismo fondamentale è la competizione per i siti recettoriali di adesione dell'orletto a spazzola delle cellule epiteliali intestinali e per le fonti nutrizionali. Questa "esclusione competitiva" è necessaria ai batteri per poter rimanere in questo habitat, consumando le risorse disponibili ed evitando così la colonizzazione degli stessi siti da parte di altri microrganismi, ingeriti o già presenti.
- Garantire una permeabilità selettiva ed un rinforzo della barriera mucosa grazie alla stimolazione della sintesi di IgA ed al rafforzamento delle tight junctions [25].
- Contribuire ai processi biochimici e digestivi dell'organismo comprendenti: la degradazione degli amidi a zuccheri semplici e delle proteine ad amminoacidi, amine ed ammoniacca; la fermentazione dei polisaccaridi ad acidi grassi; la coniugazione degli acidi biliari primari e del colesterolo in steroli; la riduzione dei nitrati, la detossificazione (ad esempio della bilirubina) e l'inattivazione di cancerogeni. Fondamentale risulta essere la metabolizzazione di composti indigeribili e

l'assorbimento di nutrienti con parziale recupero di energia dalle fibre alimentari. Il microbiota dell'intestino dei mammiferi, infatti, utilizza in gran parte come fonte di energia i polisaccaridi introdotti con la dieta. Non a caso molti batteri intestinali possiedono un elevato numero di enzimi che permette loro di utilizzare i carboidrati indigeriti degli alimenti, con differenze in base all'età e alla razza, che testimoniano un forte processo di adattamento dei commensali batterici al loro ospite. Quindi, mentre gli zuccheri semplici vengono assorbiti a livello dell'intestino tenue, i polisaccaridi non digeriti, come cellulosa, xilano, amido indigerito o glicani di origine endogena quali mucine e glicosfingolipidi, raggiungono l'ileo ed il colon e qui sono degradati dai microrganismi del microbiota intestinale. Il risultato di questa degradazione è la formazione di monosaccaridi che sono convertiti in prodotti di fermentazione batterica quali gli acidi grassi a corta catena (SCFA): acido acetico, lattico, butirrico, propionico [26]. Questi acidi contribuiscono al mantenimento del pH dell'ambiente intestinale e possono essere assorbiti ed utilizzati dall'ospite, regolando, a livello epatico, la produzione di colesterolo endogeno. Oltre alla fermentazione degli zuccheri, il microbiota ha funzione proteolitica, essendo adibito alla putrefazione di peptidi e proteine con la produzione di sostanze potenzialmente tossiche, come ammoniaca, fenoli (indolo e scatolo) ed acido solfidrico, ma anche di SCFA, aventi azione trofica ed energetica. Il microbiota intestinale si potrebbe dunque intendere come un organo metabolicamente attivo del corpo umano [27].

- Sintetizzare vitamine, cofattori enzimatici (acido folico, vitamina K, vitamine del gruppo B, biotina, acido pantotenico, vitamina C), e neurotrasmettitori; modulazione nell'assorbimento di calcio, ferro e magnesio.
- Guidare la maturazione e indirizzare dal punto di vista funzionale il sistema immunitario dell'ospite. Il microbiota intestinale contribuisce, infatti, allo sviluppo ed alla reattività del tessuto linfoide intestinale (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT), formato dalle placche di Peyer e da follicoli linfoidei isolati. Considerando che la mucosa intestinale rappresenta la più grande superficie di contatto con gli antigeni dell'ambiente esterno, il GALT deve evitare la traslocazione batterica

dal lume alla mucosa con la possibile disseminazione sistemica e, al contempo, tollerare il microbiota luminale, impedendo una risposta immunitaria esuberante ma controllandone l'eventuale crescita eccessiva. Le MICI sono caratterizzate da una anomala risposta immunitaria nei confronti di antigeni endoluminali e del microbiota stesso, che determina ed automantiene un quadro di flogosi tissutale cronica [28-32].

La colonizzazione batterica del tratto gastrointestinale inizia nelle prime ore di vita. Da studi condotti indagando il profilo batterico di campioni fecali su sequenze di DNA ribosomiale a piccole subunità, è emerso che vi è una notevole differenza nel processo di colonizzazione a livello individuale. Questo dipende da vari fattori: il tipo di parto, l'allattamento, la dieta, l'età gestazionale, l'ospedalizzazione, eventuali infezioni ed antibioticoterapia; il microbiota è, infatti, capace di rispondere rapidamente agli stimoli ed alle modificazioni ambientali.

Alla nascita il tratto digerente dei neonati è sterile e viene colonizzato successivamente. A 4 giorni di vita il microbiota dei neonati da parto vaginale somiglia a quello vaginale materno, caratterizzato soprattutto da *Lactobacillus*, mentre, in caso di parto cesareo, il microbiota è dominato da *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, presenti sulla cute della madre [33].

I primi microorganismi che colonizzano il sistema digerente sono batteri anaerobi facoltativi: Enterococchi e Lactobacilli; questi tendono poi a decrescere progressivamente mentre aumentano Bifidobatteri, Bacteroides e Clostridium spp. Le modificazioni sono graduali e si completano intorno ai 3 anni di vita, età in cui il microbiota intestinale inizia a stabilizzarsi. Considerando le differenze intra- ed inter- individuali, in infanzia prevalgono: Actinobacteria (soprattutto *Bifidobacterium*), Proteobacteria (*Enterobacteriaceae*), Firmicutes (tra cui *Clostridium* e *Lactobacillus*) e Bacteroidetes (ad esempio *Bacteroides*). Nel colon degli adulti sono presenti soprattutto 2 phyla: Firmicutes e Bacteroidetes. Con l'invecchiamento si registrano ulteriori modificazioni. In uno studio condotto in Irlanda su 161 persone sane di almeno 65 anni, nella maggior parte dei soggetti il microbiota intestinale è diverso da quello dei giovani adulti e dominato dai phyla Bacteroidetes, il principale, seguito da Actinobacteria e Proteobacteria.

Anche la dieta influenza la composizione e lo sviluppo del microbiota intestinale umano, superando le differenze individuali, già a partire dal primo alimento assunto, il latte materno, che rappresenta una fonte importante per la colonizzazione dell'intestino. Inoltre, grazie alla presenza di oligosaccaridi con attività prebiotica, il latte agisce anche indirettamente stimolando la crescita di batteri come Stafilococchi e Bifidobatteri. Quindi, in caso di allattamento al seno, avremo una prevalenza di Actinobacteria; in caso di allattamento artificiale le percentuali cambiano e ai Bifidobatteri si aggiungono Enterobatteri, Bacteroides e Streptococchi [34, 35].

Con lo svezzamento si ha poi una progressiva diversificazione del microbiota; l'industrializzazione ha portato a modifiche significative nella dieta e, di conseguenza, nella composizione dell'ecosistema intestinale.

Tra i fattori che influenzano il microbiota sono annoverati anche il pH, i sali biliari e gli enzimi digestivi. A livello gastrico, infatti, a causa del pH acido ostile ai batteri, questi risiedono in numero non elevato, circa 10^2 - 10^3 cellule batteriche/grammo di tessuto. Oltre ad *Helicobacter pylori*, sono in grado di sopravvivere anche batteri del genere *Lactobacillus*. Nel duodeno, nel digiuno e nell'ileo prossimale, i Lattobacilli raggiungono un numero di unità pari a 10^4 - 10^5 . L'attività meno intensa di sali biliari ed enzimi pancreatici, nonché i minori movimenti peristaltici, fanno sì che nella porzione distale dell'ileo e soprattutto nel colon la conta batterica raggiunga valori di 10^{12} cellule batteriche/grammo di tessuto [36].

Biodiversità

Si definisce Biodiversità uno stato o attributo di un sito o area, che indica specificatamente la varietà all'interno e tra organismi viventi, tra assemblaggi di organismi viventi, tra comunità biotiche e processi biotici, naturali o modificati dall'uomo. La biodiversità può essere misurata in termini di diversità o di identità genetica, di numero di specie, di assemblaggio di specie, comunità e processi biotici, di quantità (abbondanza, biomassa, tasso, ecc.) e di struttura di ciascuno di essi; può essere osservata e misurata a qualsiasi scala spaziale, dai micrositi e habitat di piccole

dimensioni all'intera biosfera. La biodiversità si può suddividere principalmente in tipologia alfa e beta. L' **α -diversità** comprende tre componenti: la varietà (o ricchezza specifica), cioè il numero di specie presenti, nel nostro caso, in un campione; l'abbondanza assoluta della specie e l'equipartizione tra le specie all'interno del campione. La **β -diversità**, invece, si riferisce al turn over spaziale, al grado di cambiamento della diversità specifica tra unità spaziali e comunità presenti in un ecosistema [37, 38].

Manifestazioni cliniche delle MICI

Le MICI si manifestano con una ampia varietà di sintomi, sia gastrointestinali, sia extraintestinali. Sintomi tipici includono dolore addominale, diarrea, perdita di peso, febbre e sanguinamento gastrointestinale. Generalmente, alla diagnosi, la classica presentazione del Morbo di Crohn è rappresentata da una costellazione di sintomi come dolore addominale, diarrea, perdita di appetito, perdita di peso, astenia e malessere con o senza manifestazioni extraintestinali di malattia [39].

Il grado di attività della malattia all'esordio e nelle fasi successive di remissione e riacutizzazione viene valutato calcolando l'indice CDAI per l'adulto (Crohn Disease Activity Index) [40]. L'uso sistematico del CDAI è importante nel guidare le scelte terapeutiche nelle diverse fasi della malattia. L'uso più appropriato dell'indice CDAI consiste nell'effettuare valutazioni periodiche, verificando l'andamento del punteggio nel tempo. Negli studi clinici sulla malattia di Crohn che utilizzano l'indice CDAI, la risposta clinica viene definita come una diminuzione del punteggio di almeno 70 punti o di almeno il 25% nei soggetti con valore basale di CDAI maggiore o uguale a 220.

Parametro	Input e punteggio
P1. Numero di evacuazioni liquide (valutate nell'arco di una settimana)	Numero intero, massimo due cifre
P2. Dolore addominale quotidiano (valutato nell'arco di una settimana)	0 = assente 1 = lieve 2 = moderato 3 = severo
P3. Benessere del paziente (valutato nell'arco di una settimana)	0 = buono 1 = leggermente inferiore alla norma 2 = scarso 3 = molto scarso 4 = pessimo
P4. Presenza di complicanze	No (0 punti) Si (1 punto per ognuna delle seguenti) <ul style="list-style-type: none"> ▪ artralgia o artrite ▪ irite o uveite ▪ eritema nodoso, pioderma gangrenoso o ulcera aftoide ▪ fissurazioni, fistole o ascessi anali ▪ altre fistole ▪ febbre nel corso della settimana precedente
P5. Assunzione di difenossalato o oppiacei come anti-diarroici	No = 0 Si = 1
P6. Massa addominale	0 = nessuna 0,4 = dubbia 1 = presente
P7. Ematocrito	a. Uomo/Donna (per l'uomo il valore standard è 47, per la donna 42) b. inserire valore attuale % (numero intero, massimo due cifre) il calcolatore riporta la differenza (standard-attuale), espressa in numero di punti percentuali
P8. Peso corporeo	a. Altezza (cm) Una volta inserita l'altezza, il calcolatore visualizza il peso standard in Kg, sulla base della formula di Keys: Peso standard Uomini = (altezza in m) ² x 22,1 Peso standard Donne = (altezza in m) ² x 20,8 b. Peso attuale (numero intero) Il calcolatore riporta la variazione % vs. il peso standard. Formula di calcolo: = 100 x ((Standard-Attuale)/Standard) In caso di eccessi di variazione negativa, il calcolatore riporta per questo parametro un punteggio massimo di -10 punti

Tabella 1: CDAI Crohn Disease Activity Index [40]

Score	Decodifica
≤ 150	Remissione
151-219	attività lieve
220-450	attività moderata
> 450	attività grave o molto grave

Tabella 2: Decodifica del CDAI [40]

Manifestazioni e complicanze extraintestinali

Le MICI sono patologie sistemiche e come tali ogni organo e sistema potrebbe potenzialmente essere interessato da esse. Possono essere identificate due tipologie di coinvolgimento extra-intestinale: le manifestazioni extra-intestinali, ovvero affezioni sistemiche primarie determinate dalla patologia stessa e le complicanze extra-intestinali [41, 42].

Le manifestazioni extraintestinali, che risultano essere più frequenti nel CD rispetto alla UC, possono rappresentare la manifestazione iniziale delle MICI o presentarsi in seguito, dopo la diagnosi: esse possono impattare in modo significativo sulla qualità della vita dei pazienti con MICI e richiedono un trattamento specifico in relazione all'organo o agli organi affetti. Le più frequenti sono localizzate a livello del sistema osteoarticolare (artropatie periferiche e assiali), a livello mucocutaneo (eritema nodoso, pioderma gangrenoso, Sweet's Syndrome, stomatite aftosa) a livello del tratto epatobiliare (colangite sclerosante primitiva) e a livello oculare (uveite ed episclerite). Altre manifestazioni extraintestinali possono raramente colpire i polmoni, il cuore, il pancreas e il sistema vascolare [3, 41, 43].

Alcune manifestazioni extraintestinali, come le artriti periferiche, le ulcere aftose orali, l'episclerite o l'eritema nodoso sono frequentemente associate ad una infiammazione intestinale in fase attiva e

solitamente migliorano dopo il trattamento della patologia intestinale. Altre manifestazioni extraintestinali, come l'uveite o la spondilite anchilosante, normalmente possono insorgere indipendentemente dalla fase di attività della patologia a livello intestinale. Ancora, nel caso di altre manifestazioni, come il pioderma gangrenoso o la colangite sclerosante primitiva, non è chiara l'associazione con l'attività della malattia a livello intestinale. Il controllo terapeutico di queste manifestazioni è fondamentale per migliorare la qualità della vita di questi pazienti [43].

Le complicanze extraintestinali sono invece causate dagli stessi meccanismi immunologici che caratterizzano le MICI e sono rappresentate da malassorbimento, deficit di micronutrienti, osteoporosi, calcoli renali, neuropatie periferiche e calcoli biliari [41, 43].

Diagnosi delle MICI

La diagnosi delle MICI è istologica, pertanto l'endoscopia con campionamento biptico rappresenta il gold standard per la diagnosi. Le caratteristiche tipiche del CD sono state descritte nella Classificazione di Parigi. Queste includono ulcere aftose discontinue o lineari primariamente nell'ileo o nel colon, nonostante il CD possa coinvolgere qualsiasi area del tratto gastrointestinale; inoltre la malattia può essere confluenta. Istologicamente la malattia è normalmente caratterizzata da infiammazione focale cronica, con o senza granulomi: la rilevazione di infiammazione granulomatosa è fondamentale per la diagnosi di CD [39].

La colonscopia con esplorazione dell'ileo terminale e le biopsie multiple per l'esame istologico, ottenute da tutti i segmenti del tratto intestinale inferiore (ileo, ceco, colon ascendente, colon trasverso, colon trasverso, colon discendente, sigma e retto), risultano essere indagini essenziali e indispensabili per poter differenziare il CD dalla UC e per individuare la localizzazione e l'estensione della patologia infiammatoria.

La esofagogastroduodenoscopia è inoltre raccomandata a prescindere dalla presenza o dall'assenza di sintomi riferibili al tratto gastrointestinale superiore. Inoltre, in questo modo, è possibile

identificare eventuali patologie gastriche e duodenali (come la presenza di ulcere) e ottenere biopsie utili all'indagine istologica: quest'ultima infatti riscontrando lesioni specifiche, come granulomi a cellule giganti o ulcere aftoidi, potrebbe confermare una diagnosi di CD che non potrebbe altrimenti avvenire nell'11-29% dei casi [39].

L'enteroscopia con videocapsula, infine, rappresenta uno strumento utile sia per la diagnosi, sia per il monitoraggio del CD specie se localizzato all'ileo, dando il vantaggio di evitare radiazioni ionizzanti e una sedazione profonda/anestesia generale. Tuttavia, essa rimane uno strumento diagnostico complementare, dal momento che non permette di ottenere biopsie [3].

A livello internazionale sono riconosciuti due principali score endoscopici per la valutazione della Malattia di Crohn: il CDEIS (Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity) e il SES-CD (Simple Endoscopic Score per la malattia di Crohn).

L'indice CDEIS (Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity) è un indice per la determinazione del grado di severità endoscopica della malattia di Crohn con localizzazione all'ileo e al colon. è stato sviluppato dal gruppo di studio GETAID (Groupe d'Étude Thérapeutique des Affections Inflammatoires du tube Digestif) con l'obiettivo di indagare la correlazione fra i risultati clinici, biologici ed endoscopici e per valutare l'efficacia del trattamento. Le variabili vengono collegate e valutate sulla base delle visualizzazioni endoscopiche [44].

Lo score CDEIS applica 4 parametri, valutati in 5 segmenti predefiniti del colon (ileo, colon ascendente, colon trasverso, colon discendente e ansa sigmoidea, e retto). Il punteggio può essere calcolato anche in caso di indagini incomplete, in quanto i risultati dei singoli segmenti vengono divisi per il numero dei segmenti indagati.

La presenza di stenosi, a seguito di ulcera o no, aumenta il punteggio al termine del computo.

	Ileo	Colon destro	Colon trasverso	Colon sinistro e sigma	Retto	Totale
Ulcere profonde (12 se presenti, 0 se assenti)	___+	___+	___+	___+	___+	Totale 1
Ulcere superficiali (6 se presenti, 0 se assenti)	___+	___+	___+	___+	___+	Totale 2
Superficie di malattia(VAS)	___+	___+	___+	___+	___+	Totale 3
Superficie coinvolta da ulcere (VAS)	___+	___+	___+	___+	___+	Totale 4
	Somma dei Totali 1+2+3+4 =					Totale A
	Numero di segmenti visualizzati in parte o del tutto (da 1 a 5) N					
	Totale A/n =					Totale B
	Se stenosi ulcerata in qualsiasi segmento aggiungere 3					Totale C
	Se stenosi non-ulcerata in qualsiasi segmento aggiungere 3					Totale D
	Totale B + C + D =					Score CDEIS

Tabella 3: CDEIS [44]

Score	Decodifica
< 3	remissione
3 - 8	attività endoscopica lieve
9 - 12	attività endoscopica moderata
> 12	attività endoscopica grave

Tabella 4: decodifica CDEIS.

Per lo score CDEIS, è stato recentemente proposto come prognosticamente rilevante un calo del 50% del punteggio.

Il **Simple Endoscopic Score per la malattia di Crohn (SES-CD)** valuta la dimensione delle ulcere mucose, la superficie ulcerata, l'estensione endoscopica e la presenza di stenosi. È stato sviluppato come alternativa più semplice, e quindi più adatta ad un utilizzo di routine, rispetto all'indice CDEIS. Nel processo di validazione dello score è stata dimostrata una solida correlazione tra SES-CD e CDEIS ($r = 0,920$). Inoltre, il SES-CD è correlato ai parametri clinici e al livello sierico di proteina C-reattiva [45].

	Ileo	Colon destro	Colon trasverso	Colon sinistro e sigma	Retto	Totale
Ulcere?	___+	___+	___+	___+	___	___+
0: no						
1: aftoidi (0.1-0.5 cm)						
2: grandi (0.5-2 cm)						
3: vaste (>2 cm)						
Superficie coinvolta da malattia	___+	___+	___+	___+	___	___+
0: 0%						
1: <50%						
2: 50-75%						
3: >75%						
Superficie ulcerata	___+	___+	___+	___+	___	___+
0: 0%						
1: <10%						
2: 10-30%						
3: >30%						
Restringimento del lume?	___+	___+	___+	___+	___	___+
0: No						
1: Singolo, superabile						
2: Multipli, superabili						
3: Non valicabile						
Totale complessivo = Score SES-CD						

Tabella 5: Calcolo del SES-CD [45]

Score	Decodifica
0 - 2	remissione
3 - 6	attività endoscopica lieve
7 - 15	attività endoscopica moderata
> 15	attività endoscopica grave

Tabella 6: Tabella di decodifica del SES-CD.

Per lo score SES-CD, è stato proposto come rilevante un calo del 50% del punteggio.

Terapia

Considerata l'eziologia multifattoriale delle MICI e la loro patogenesi autoimmune, i trattamenti di vecchia e nuova generazione sono stati sviluppati con lo scopo di bloccare il processo infiammatorio a vari livelli e in modo più o meno specifico, a seconda del tipo di farmaco utilizzato. Il trattamento per le MICI ha come primo intento quello di indurre la remissione della patologia e secondariamente di mantenere tale remissione raggiunta: nello specifico gli studi attualmente sono concordi nell'associare il concetto di remissione a quello di Mucosal Healing (MH), ovvero una guarigione mucosale osservabile endoscopicamente, per alcuni da intendersi nella più specifica accezione di Histological Remission, ovvero una remissione di tipo istologico [46-48].

Il miglioramento nella comprensione della natura progressiva di queste patologie e l'introduzione di terapie efficaci ha modificato l'obiettivo primario di trattamento, spostandolo dal semplice controllo dei sintomi ad un più ambizioso scopo a lungo termine, ovvero quello della prevenzione della progressione di malattia e della disabilità correlata, al fine di massimizzare la qualità di vita del paziente [49]. Il controllo dei sintomi come target di terapia, infatti, si è dimostrato fallimentare nel prevenire la progressione di malattia. Questa evidenza può essere spiegata dal fatto che la presenza di sintomi non correla bene con la presenza di infiammazione a livello endoscopico, soprattutto nel

CD. La remissione clinica infatti può essere raggiunta come conseguenza di un effetto placebo, nonostante la persistenza di una significativa infiammazione endoscopica, oppure, al contrario, sintomi che persistono nonostante la risoluzione del processo infiammatorio possono essere riferibili a cause diverse dalle MICI (come la Sindrome del colon irritabile) [49].

Oggi il Mucosal Healing viene considerato il principale obiettivo del trattamento nei pazienti con MICI, sia nelle sperimentazioni, sia nella pratica clinica: infatti il MH è associato ad una remissione clinica duratura, senza trattamento steroideo e con tassi diminuiti di ospedalizzazione e di ricorso a chirurgia [46].

Inoltre recenti studi confermano l'utilità di marker infiammatori, come la calprotectina fecale e la proteina C reattiva, come marker surrogati e non invasivi dell'attività endoscopica e come guida nell'ottimizzazione del trattamento, al fine di raggiungere il traguardo del MH. Le linee guida della *International Organization For the Study of Inflammatory Bowel Disease* (IOIBD) hanno raccomandato invece la Deep Remission come traguardo terapeutico da raggiungere nella pratica clinica, nonostante non esista una definizione validata del concetto di Deep Remission nelle MICI [46, 49, 50]. Nello studio EXTEND la Deep Remission è stata definita come una remissione clinica (CDAI < 150) associata a completo MH, come definito secondo CDEIS [51].

Per quanto riguarda l'approccio adottato nel trattamento delle MICI, le due strategie terapeutiche sono state classicamente descritte come "step up" o come "top down". L'approccio step up consiste nell'uso di farmaci come aminosalicilati, antibiotici o nutrizione enterale e viene intensificato successivamente, attraverso l'utilizzo di immunomodulatori, farmaci biologici o attraverso il ricorso a intervento chirurgico, nel caso in cui la patologia peggiori. Nell'approccio top down invece, il trattamento comincia con farmaci biologici, in base alla severità del fenotipo di malattia, con la speranza che la terapia possa essere ridotta in seguito a farmaci "meno aggressivi" [3].

Nella pratica clinica i pazienti, tuttavia, non sempre seguono questo approccio terapeutico, verso l'alto o verso il basso, nello spettro di farmaci a disposizione per il trattamento delle MICI. Alcuni fenotipi, ad esempio, sono predittivi di una prognosi peggiore e pertanto giustificano un ricorso

precoce ad un trattamento più aggressivo. Va sottolineato come il tentare un approccio step up o il de-escalating nell'approccio top down, potrebbe potenzialmente prolungare il corso della fase attiva di malattia [3]. In ogni caso, pur tenendo presente quali sono gli obiettivi terapeutici, va ricordata la necessità di avere un approccio personalizzato per il trattamento. Le MICI sono patologie eterogenee e molti fattori individuali condizionano l'andamento della malattia e la risposta al trattamento. La stratificazione del rischio, l'adattamento degli algoritmi diagnostici al paziente in modo individuale e il monitoraggio delle terapie farmacologiche, sono tutti elementi che contribuiscono a massimizzare l'efficacia dei trattamenti [49].

Gli obiettivi della terapia nel Morbo di Crohn sono sempre stati quelli di alleviare i sintomi, ottimizzare la crescita e migliorare la qualità di vita, minimizzando la tossicità dei farmaci. L'evidenza che il raggiungimento di Mucosal Healing potrebbe potenzialmente cambiare la storia naturale della patologia, diminuendo il ricorso a chirurgia, ha posto quest'ultimo al centro dell'interesse rendendolo il target terapeutico auspicato [52].

Secondo le più recenti linee guida della ECCO, il cosiddetto approccio top-down, che consiste nell'utilizzo di farmaci antiTNF α come trattamento di prima linea, va adottato in caso di diagnosi di CD con attiva patologia perianale fistolizzante e, in base al consenso, in altre condizioni che includono un fenotipo severo di malattia (esteso, panenterico), una persistente forma severa di malattia nonostante una adeguata terapia di induzione, un significativo ritardo di crescita, profonde ulcerazioni coliche osservate all'endoscopia, una severa osteoporosi oppure una patologia stenotante o penetrante alla diagnosi [53].

La terapia biologica nel CD

Le conoscenze relative ai meccanismi fisiopatologici delle MICI, acquisite prevalentemente su modelli animali, hanno portato allo sviluppo di farmaci in grado di interferire con il processo infiammatorio mediante la modulazione selettiva del rilascio o dell'attività di mediatori solubili immunoregolatori, tra cui il sistema di citochine.

Sulla base di queste osservazioni sono state sviluppate strategie di trattamento che prevedono l'utilizzo sia di farmaci che agiscono attraverso l'inibizione della sintesi, sia del rilascio e dell'attività di mediatori a prevalente azione pro-infiammatoria, sia nella somministrazione diretta di citochine a prevalente attività anti-infiammatoria. La terapia biologica, ovvero biotecnologica si configura come una vera e propria "target therapy" basata sull'utilizzo di farmaci, i biologici appunto, che hanno come bersaglio specifiche molecole della cascata infiammatoria. I farmaci biotecnologici infatti sono un ampio gruppo di agenti terapeutici ottenuti mediante metodologie di ingegneria genetica. Agiscono attraverso l'inibizione di specifiche citochine/cellule coinvolte nella cascata di diversi processi patologici, portando alla modifica della risposta immunitaria dell'ospite. Lo sviluppo delle terapie biologiche ha sostanzialmente modificato la gestione dei pazienti con MICI nel corso degli ultimi anni. Le evidenze accumulate nell'ultimo ventennio sottolineano come questi farmaci sarebbero potenzialmente in grado di cambiare il corso naturale della malattia [54]. Inizialmente utilizzati nei soggetti refrattari alle terapie convenzionali, i farmaci biologici sono sempre più spesso impiegati nelle prime fasi della malattia (schema terapeutico TOP-DOWN) al fine di interrompere precocemente il processo infiammatorio. Questi farmaci comprendono anticorpi monoclonali anti-TNF, gli anticorpi anti-citochina e gli antagonisti delle integrine, ovvero dei fattori molecolari di adesione e migrazione delle cellule infiammatorie [55]. Al primo gruppo appartengono infliximab, adalimumab, golimumab e certolizumab, al secondo gruppo ustekinumab, al terzo gruppo natalizumab e vedolizumab che sono in grado di bloccare la migrazione dei linfociti T dal circolo sanguigno al comparto della parete enterica, impedendo di conseguenza il reclutamento di cellule immunitarie attivate a livello di tessuti intestinali infiammati. Lo sviluppo delle terapie biologiche ha sostanzialmente modificato la gestione dei pazienti con MICI nel corso degli ultimi anni [56].

Infliximab è stato il primo farmaco biologico approvato per il trattamento delle MICI ed è un anticorpo monoclonale chimerico antiTNF α (75% umano, 25% murino): è stato approvato inizialmente per il trattamento dei pazienti adulti e in seguito, nel 2006, il suo utilizzo è stato esteso da FDA anche al trattamento del Morbo di Crohn in pazienti in età pediatrica e adolescenziale: il farmaco è stato commercializzato con il nome di Remicade e ha avuto grande impatto nella pratica clinica della Gastroenterologia pediatrica. Oltre alla neutralizzazione di TNF α , Infliximab blocca anche la migrazione dei leucociti e induce l'apoptosi di linfociti T e monociti. Un terzo meccanismo d'azione include la fissazione del complemento, la citotossicità dipendente dal complemento e la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente [56].

È un farmaco che viene somministrato per via endovenosa che prevede un ciclo di induzione al tempo zero, dopo 2 e 6 settimane dalla prima somministrazione con successivo mantenimento ogni 8 settimane. La dose prevista è di 5 mg/kg. In caso di mancata e/o perdita di efficacia, la terapia può essere ottimizzata riducendogli intervalli di tempo delle somministrazioni a 4-6 settimane e/o aumentando la dose sino a 10 mg/kg.

Per quanto concerne gli **effetti collaterali**, questi possono essere suddivisi in due categorie effetti collaterali acuti ed effetti collaterali a medio-lungo termine. Essendo un anticorpo monoclonale chimerico è immunogeno e può dare reazioni anafilattiche a causa principalmente della formazione di anticorpi anti-Infliximab. Questa reazione di ipersensibilità si può manifestare con dispnea, arrossamento del volto (flushing), nausea, cefalea, obnubilamento del sensorio, ipossiemia, tachicardia. Lo sviluppo di una reazione acuta alla infusione di Infliximab è una controindicazione al proseguimento della terapia, la quale deve essere interrotta.

Numerosi studi hanno riportato la possibilità di insorgenza di una reazione anafilattica all'infliximab. Si parla di Anafilassi ritardata quando questa insorge dopo 12-24 ore dalla infusione di infliximab e si manifesta con flushing, artralgie associate o meno a febbre o rash cutanei.

La terapia combinata con azatioprina sembra ridurre l'insorgenza di ab anti-infliximab e quindi di reazione anafilattica.

Tra gli effetti collaterali del farmaco sono state descritte anche lesioni dermatologiche come eczema e psoriasi. seppur l'infliximab sia un farmaco utile nel trattamento della psoriasi stessa [57].

L'efficacia dell'Infliximab nell'induzione della remissione in pazienti con MC refrattari alla terapia standard è stata dimostrata in uno studio di fase 2 randomizzato, doppio cieco, controllato verso placebo in 108 pazienti, condotto da *Targan et al* [56] nel 1997. I soggetti ricevevano una singola dose di Infliximab per via endovenosa di 5 mg/kg, o 10 mg/kg, o 20 mg/kg o placebo. Dopo quattro settimane, l'81% di quelli che avevano avuto una singola infusione di Infliximab (5 mg/kg) otteneva una risposta clinica significativa, definita dalla riduzione di 70 punti del Crohn's Disease Activity Index (CDAI), rispetto al 17% di risposta ottenuta dai pazienti che avevano ricevuto il placebo. A tale ricerca sono seguiti altri studi randomizzati a lungo termine che hanno dimostrato l'efficacia dell'Infliximab nel mantenere la remissione.

Lo studio ACCENT I [58] ha dimostrato che i pazienti che avevano avuto alla somministrazione dell'Infliximab alla settimana 2 una risposta clinica (rappresentata dalla riduzione di 70 punti del CDAI) e gli individui che continuavano il trattamento con Infliximab ogni 8 settimane, riuscivano a ottenere un maggior beneficio nel mantenimento della risposta e della remissione clinica (CDAI <150) fino alla settimana 54. Alla settimana 54 il tasso di remissione era del 28% per i soggetti che avevano ricevuto 5 mg/kg, del 38% per quelli che avevano avuto 10 mg/kg e del 14% per il gruppo con placebo.

L'Infliximab si è dimostrato efficace nei soggetti steroideo-dipendenti e in quelli con malattia fistolizzante.

Nello studio ACCENT I, dei pazienti che avevano ottenuto una risposta clinica alla settimana 2 (e che erano stati trattati con steroidi al tempo zero), il 24% di quelli in terapia di mantenimento con Infliximab ogni 8 settimane alla dose di 5 mg/kg e il 32% di quelli che ricevevano 10 mg/kg risultava libero da steroidi e in remissione clinica alla settimana 54. Solo il 9% degli individui che riceveva il placebo manteneva la remissione senza l'utilizzo di corticosteroidi [58]. Tra i pazienti con fistole entero-cutanee (soprattutto con localizzazione perianale), *Present et al* hanno riportato

che Infliximab induceva una risoluzione della secrezione delle fistole nel 55% di chi aveva ricevuto 5 mg/kg di Infliximab di mantenimento, rispetto al 13% di chi era stato trattato con placebo [59]. Può tuttavia verificarsi un fallimento terapeutico con Infliximab in caso di basse concentrazioni di farmaco dovute ad un dosaggio inadeguato e/o alla formazione di anticorpi contro il farmaco, che ne accelerano la clearance. La raccomandazione è quella di monitorare la concentrazione del farmaco per permettere la rilevazione di eventuali bassi livelli di concentrazione del farmaco o la presenza di anticorpi, prima della comparsa dei sintomi [3].

L'Adalimumab è un anticorpo monoclonale ricombinante IgG1 totalmente umano che si lega con elevata affinità e specificità al TNF- α umano. Essendo umanizzato non dà rischio di reazioni anafilattiche collaterali pertanto può essere somministrato a casa. Il suo utilizzo in età pediatrica (6-17 anni) è stato approvato nel gennaio 2012 per il Morbo di Crohn da parte di FDA. È stato successivamente approvato per la Rettocolite Ulcerosa. Rispetto all'Infliximab ha una maggior latenza di azione [60].

Nello studio CLASSIC I in pazienti "naïve" al trattamento con anti-TNF- α , il regime di induzione 160/80 mg ha consentito di raggiungere la remissione clinica (definita come punteggio CDAI<150), alla settimana 4, pari al 36% vs. il 24% dei soggetti trattati con il regime 80/40 e al 12% del gruppo trattato con placebo. Inoltre, somministrato alla dose di mantenimento a settimane alterne, Adalimumab ha dimostrato di mantenere la remissione clinica a 56 settimane nel 36% dei pazienti e ha consentito l'interruzione del trattamento corticosteroidico per un periodo di almeno 90 giorni nel 29% dei pazienti. Nello stesso studio si è osservato che l'Adalimumab è in grado di indurre nel 30% degli individui con malattia fistolizzante la chiusura completa delle fistole alla settimana 26 e di mantenerla fino alla settimana 56 [61]. L'efficacia di Adalimumab è stata osservata anche in pazienti che avevano perso la risposta o si erano rivelati intolleranti alla terapia con Infliximab, come evidenziato dallo studio GAIN [62] in cui, alla settimana 4, il 21% dei soggetti che aveva ricevuto Adalimumab alla dose di 160/80 mg, aveva ottenuto la remissione clinica, rispetto al 7% dei soggetti ricevuti placebo. Adalimumab è risultato globalmente ben tollerato, con un profilo di

sicurezza buono in più di 150.000 pazienti trattati per Malattia di Crohn, artrite reumatoide, spondilite anchilosante e psoriasi. Adalimumab è inoltre caratterizzato da una ridotta immunogenicità: infatti la percentuale di anticorpi anti Adalimumab identificata nello studio CLASSIC II è stata del 2,6% [63].

Gli effetti indesiderati correlati alla somministrazione di Adalimumab comprendono reazioni nella sede di iniezione (eritema, dolore, edema, emorragia), infezioni delle vie respiratorie superiori, bronchite, infezioni urinarie, disturbi a carico del SNC (cefalea e vertigini), dell'apparato digerente (nausea, diarrea) e della cute (eritema, prurito, herpes simplex).

Questo farmaco, essendo totalmente umano, è caratterizzato da una scarsa immunogenicità [63]. Anticorpi anti-adalimumab e altre reazioni immunologiche sono stati riscontrati nel 5,5% dei pazienti trattati. La presenza di questi anticorpi è correlata ad una diminuzione dell'effetto terapeutico del farmaco. Solo in una bassissima percentuale di casi si sono manifestate reazioni allergiche (reazioni anafilattoidi, eruzioni cutanee di tipo orticarioide). Adalimumab è un farmaco globalmente ben tollerato, con un buon profilo di sicurezza.

Correlazione microbiota terapia nelle MICI

Vari studi hanno dimostrato che il microbiota dei pazienti affetti da IBD presenta caratteristiche differenti rispetto alla popolazione sana, con una ridotta biodiversità, una preponderanza di ceppi microbici pro-infiammatori come Enterobacteriaceae and Fusobacteriaceae ed una carenza di ceppi protettivi ed anti-infiammatori, come Firmicutes e *Bifidobacteriaceae* [64-67].

L'influenza del microbiota intestinale sull'andamento clinico delle IBD è inoltre dimostrata dall'utilizzo di probiotici specialmente nella rettocolite ulcerosa e dall'ancora sperimentale applicazione del trapianto fecale, che sembra promettente secondo i primi risultati riportati in letteratura [68].

Tuttavia, non è chiaro se la disbiosi evidenziabile nei pazienti con IBD rappresenti una causa o una conseguenza della malattia. Ciò nonostante, le conoscenze in questo campo sono in espansione, infatti gli studi incentrati sulla tipizzazione del microbiota nelle IBD stanno evidenziando ceppi microbici che in futuro potrebbero essere utilizzati come biomarcatori della malattia, siccome il microbiota presenta un'entità tanto maggiore di disbiosi, quanto più è attiva la malattia.

Dai primi anni 2000, quando gli anticorpi anti TNF-alfa furono introdotti sul mercato, le terapie biologiche sono diventate il cardine della terapia delle IBD, sia in età pediatrica che in età adulta, tuttavia, le conoscenze circa l'effetto delle terapie biologiche sul microbiota intestinale sono ancora molto scarse. Di fatto, siccome l'immunità ed il microbiota intestinale rappresentano un sistema in continua comunicazione, la terapia biologica ed il microbiota potrebbero influenzarsi vicendevolmente. In particolare, sporadici studi in letteratura dimostrano che la composizione tassonomica e funzionale del microbiota può avere un'influenza sulla risposta alla terapia immunomodulante [69, 70].

Non è tuttavia chiaro se il concetto è biunivoco, ovvero non esistono studi che dimostrino se la terapia biologica sia in grado di modulare il microbiota dell'ospite, ripristinando biodiversità e bilanciamento tra ceppi pro- ed anti-infiammatori.

Scopo dello studio

Obiettivo dello studio è la caratterizzazione delle modificazioni del microbiota intestinale di pazienti con IBD in terapia biologica, mediante l'utilizzo di un approccio di metagenomica (shotgun metagenomics).

L'identificazione delle modificazioni del microbiota intestinale dei pazienti in trattamento con terapia biologica potrebbe rappresentare un metodo utile e specifico per monitorare la risposta al farmaco ed eventualmente per l'identificazione precoce di ceppi associati a farmacoresistenza, con lo scopo di ottimizzare il management clinico ed evitare trattamenti inutili o potenzialmente dannosi.

Nello specifico, gli obiettivi intermedi della ricerca sono:

- Confrontare il microbiota intestinale di pazienti con IBD attiva prima e dopo l'inizio di terapia biologica, mediante l'utilizzo della tecnica di shotgun metagenomics.
- Comparare le eventuali modificazioni del microbiota dei pazienti che presentano risposta clinica e resistenza al farmaco.
- Caratterizzare il microbiota intestinale dei pazienti che presentano resistenza primaria o secondaria alla terapia biologica identificando eventuali ceppi microbici associati a resistenza.
- Comparare il microbiota intestinale di pazienti in terapia biologica dopo induzione che presentano remissione con pazienti che presentano resistenza al farmaco.

MATERIALI E METODI

Approvazione del protocollo

Il protocollo di ricerca è stato approvato con parere favorevole dal Comitato Etico AVEN in data 14/01/2020, codice di sperimentazione 1124/2019/SPER/AOUPR, Prot. 951 del 09/01/2020.

L'avvio della sperimentazione è stato autorizzato dalla Direzione Generale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma in data 30/09/2020, n° protocollo 0000894.

Lo studio è stato condotto secondo le normative della Dichiarazione di Helsinki e secondo le normative della Good Clinical Practice.

Disegno dello studio

Si tratta di uno studio clinico osservazionale comparativo senza farmaci, a carattere spontaneo, non sponsorizzato e no-profit. L'arruolamento si è rivolto a tutti i pazienti che hanno effettuato un accesso presso l'Unità Operativa Complessa di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva, Azienda Ospedaliera di Parma, Parma per follow up di IBD e per i quali è stata iniziata una terapia biologica con anti-TNF alfa dal 30/09/2020 al 01/06/2021.

Si riportano di seguito i criteri di inclusione ed esclusione utilizzati per l'arruolamento.

Criteri di inclusione dei pazienti: età tra 18 e 65 anni; IBD confermata istologicamente; possibilità di firmare un modulo di consenso informato da parte del paziente o di un tutore legale; terapia in atto convenzionale (mesalazina, azatioprina, metotrexate) o nessuna terapia in atto.

Criteri di esclusione: età < 18 anni o > 65 anni; impossibilità o rifiuto a firmare un modulo di consenso informato da parte del paziente o di un tutore legale; diagnosi di IBD indeterminata; trattamento in corso con antibiotici; terapia biologica in atto.

Per ogni paziente arruolato è stato raccolto un campione fecale per l'identificazione della composizione del microbiota intestinale prima dell'inizio della terapia biologica (T0); successivamente sono raccolti un secondo campione dopo induzione di terapia biologica (6 settimane, W6) ed un terzo campione a distanza di tre mesi dall'inizio della terapia (W12).

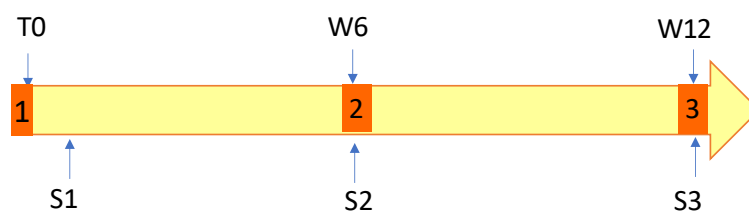


Fig. 1: Timeline della raccolta dei campioni fecali per la caratterizzazione del microbiota: 1° campione (1) immediatamente prima della somministrazione della prima dose di terapia biologica (S1), 2° campione (2) dopo induzione di terapia a 6 settimane (S2, W6-T1), 3° campione (3) dopo 3 mesi di terapia (S3, W12-T2).

Unità operative coinvolte:

- U.O.C. Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva, Azienda Ospedaliera di Parma, Università di Parma, Dipartimento di Medicina e Chirurgia (DiMeC); Via Gramsci, 14, 43126 Parma;
- Laboratorio di Probiogenomica, Dipartimento di Chimica, Scienza della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università di Parma; Parco Area delle Scienze 11°, 43124 Parma;

Raccolta dati

L'arruolamento è stato eseguito dalla Unità di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva di Parma da parte di personale medico specializzato al momento dell'accesso all'Unità per valutazione clinica o sottoporsi ad endoscopia o per seguire esami di routine o per visita gastroenterologica di controllo. Dopo la raccolta del consenso informato scritto, è stato raccolto un campione fecale per la tipizzazione del microbiota. La classificazione endoscopica di malattia è stata effettuata in occasione della colonscopia in seguito alla quale si decide di iniziare la terapia biologica. Sia la colonscopia che la valutazione clinica sono state effettuate unicamente da personale specializzato con expertise in IBD. Poiché i pazienti sono stati reclutati all'Unità di Gastroenterologia ed Endoscopia per abituale follow up di MICI (esecuzione di endoscopia, esecuzione di prelievi

ematici di controllo, visita gastroenterologica di controllo), si specifica che non sono state effettuate procedure invasive ulteriori per il paziente, pertanto questo studio non ha richiesto alcuna deviazione dalla pratica clinica standard.

Sono stati raccolti al momento dell'arruolamento per ciascun paziente dati di tipo:

- anagrafico: età, sesso
- amministrativo-gestionale: data di accesso in ospedale,
- clinico/laboratoristico: anamnesi patologica personale, parametri ematochimici, parametri antropometrici, esami strumentali ed istologici, esiti di esami endoscopici.
- farmacologico: anamnesi farmacologica personale
- informazioni generali: anamnesi patologica personale.
- composizione del microbiota intestinale dei campioni fecali mediante analisi di shotgun metagenomics

Per ogni paziente è stato calcolato lo score clinico di attività di malattia CDAI (Crohn's disease activity index) [40] al momento dell'arruolamento (T0), dopo induzione di terapia (W6) e nella fase di mantenimento (W12) e lo score endoscopico SES-CD (Simple endoscopic score for Crohn's disease) [45] al momento dell'arruolamento ed in fase di mantenimento (T0 – W12).

Ogni paziente è stato identificato con un codice che ha garantito l'anonimato nella fase di rielaborazione dei dati stessi.

Per ogni paziente arruolato sono state descritte le caratteristiche della malattia infiammatoria cronica intestinale:

- La localizzazione della patologia alla diagnosi, che è stata definita basandosi sui reperti macroscopici evidenziati tramite endoscopia, classificati facendo riferimento alla classificazione di Montreal [71].
- Il fenotipo e la severità attraverso l'utilizzo di score clinici ed endoscopici specifici.

Per quanto riguarda gli score endoscopici sono stati utilizzati:

- **SES-CD** (Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease) per il Morbo di Crohn, con la seguente decodifica in relazione al punteggio: 0-2 remissione; 3-6 attività endoscopica lieve; 7-15 attività endoscopica moderata; >15 attività endoscopica grave [45].

Impianto metodologico dello studio

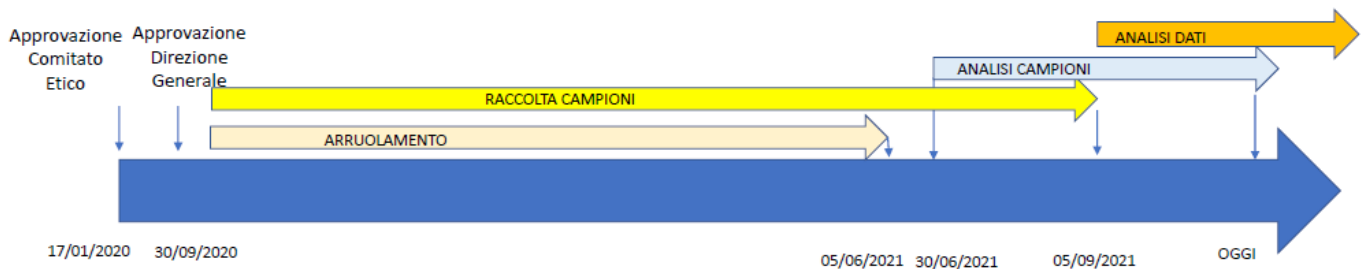


Fig.2: Timeline della conduzione dello studio, dall'approvazione all'inizio dell'analisi dei dati.

Trattamento dei campioni

I campioni fecali sono stati raccolti presso la U.O.C. di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva e conservati a 4 °C nel frigorifero dedicato presso il reparto fino al trasporto presso il Laboratorio di Probiogenomica. Ciascun campione è stato raccolto all'interno di un apposito contenitore pre-riempito con liquido stabilizzante il microbiota in grado di devitalizzare tutti i microorganismi (batteri, virus e funghi), DNA/RNA Shield (Zymo Research). Il trasporto è stato effettuato utilizzando un contenitore termico. I materiali per la raccolta sono stati forniti dal promotore della ricerca senza nessun costo per l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma. Presso il Laboratorio di Probiogenomica, Dipartimento di Chimica, Scienze della Vita e della Sostenibilità Ambientale,

Università degli Studi di Parma (Responsabile Prof. Marco Ventura), i campioni sono stati refrigerati a -22°C e successivamente sono stati preparati per le analisi metagenomiche.

Tutti i campioni fecali raccolti sono stati utilizzati per la tipizzazione del microbiota intestinale.

L'estrazione del DNA è stata eseguita attraverso l'impiego del QIAamp DNA Stool Mini kit secondo le istruzioni del produttore (Qiagen Ltd., Strasse, Germany).

I campioni fecali raccolti sono stati utilizzati per effettuare delle analisi di shotgun metagenomics, al fine di determinare rispettivamente il profilo tassonomico a livello di specie. Non è stato analizzato in alcun modo il genoma dell'ospite.

Analisi metagenomiche shotgun sono state eseguite partendo dal DNA estratto dai campioni. La libreria di sequenziamento Illumina è stata preparata seguendo l'"Illumina Nextera XT DNA Library Preparation Kit". Nel dettaglio, il DNA è stato frammentato enzimaticamente, successivamente sono stati aggiunti i barcodes ed eseguita purificazione con beads magnetiche. I campioni sono stati quantificati usando il sistema fluorimetrico Qubit quantification system (Life Technologies, USA), caricato su una Tape Station 2200 (Agilent Technologies, USA) e normalizzato a 4nM. Il sequenziamento della library è stato eseguito usando un sequenziatore Illumina Miseq con reagenti MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles. L'analisi dei dati metagenomici è stata effettuata mediante il software dedicato [72].

Al fine di ricostruire i profili tassonomici della popolazione batterica presente nei campioni, i file fastq ottenuti dal sequenziamento sono stati processati utilizzando il software bioinformatico METAnnotatorX2 (PMID: 34184911). In particolare, la classificazione tassonomica della reads è stata ottenuta tramite MegaBLAST (PMID: 26250111), utilizzando il database di sequenze genomiche non ridondanti recuperato dal National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Per ogni campione metagenomico, il parametro "species-richness" (alpha-diversity) è stato calcolato come numero di specie batteriche per le quali il numero di reads associate era maggiore di 0.5%. Le somiglianze tra i campioni (beta-diversità) sono state valutate tramite il calcolo della dissomiglianza di Bray-Curtis, basata sull'abbondanza delle specie. L'intervallo di somiglianze è

calcolato tra i valori 0 e 1. La rappresentazione PCoA della beta-diversità è stata eseguita utilizzando ORIGIN 2021 (<https://www.originlab.com/2021>).”

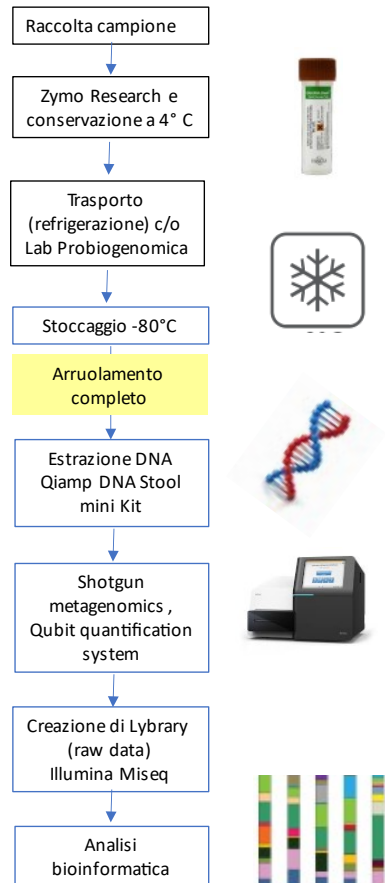


Fig 3: Metodi di processazione dei campioni fecali.

Metodo di analisi bioinformatica

L'estrazione del DNA dai campioni consente di ottenere un numero di sequenze che comprendono primers, DNA umano e DNA microbico, di conseguenza il primo dato ottenuto è stato analizzato come segue (Tab 8):

- Rimozione delle sequenze primer
- Filtro qualitativo

- Rimozione delle sequenze di DNA umano

Il numero di sequenze ottenute da tale filtro è stato analizzato per ottenere la suddivisione in taxa per ogni campione.

Una volta ottenuti i taxa per ogni campione, con espressione del tipo di taxa e percentuale relativa allo specifico campione, l'analisi dei dati è stata così condotta:

- Quantificazione del numero di taxa per ogni campione e loro andamento nei 3 campioni consecutivi per ogni paziente (analisi dell'aumento o calo dell'abbondanza di taxa nel follow up) (Tab. 9).
- Caratterizzazione qualitativa dei pazienti al T0-T1-T2 (Fig. 6-7-8).
- Calcolo della beta diversità comparando campione al T0 e campione al termine del follow up, PCoA (Fig. 15).
- Andamento di ciascun taxa nel follow up: calcolo del Δ tra T2 e T0 espresso in percentuale media (Tab. 10).

Analisi statistica

Tramite una Principal Coordinate Analysis (PCoA) basata su matrici Bray Curtis, la composizione del microbiota fecale di ciascun partecipante è stata rappresentata graficamente su assi tridimensionali, al fine di identificare eventuali cluster di individui con microbiota dalle caratteristiche comuni.

L'analisi statistica è prevalentemente descrittiva, ed è stata finalizzata all'identificazione di correlazioni tra i principali parametri microbiologici (alfa diversità, abbondanza relativa di singoli taxa) e fattori clinici o legati allo stile di vita, al fine di identificare i fattori associati alla composizione del microbiota nella sua globalità o limitatamente a singoli taxa.

RISULTATI

Dati demografici e clinici dei pazienti arruolati

A partire dall'approvazione del protocollo, sono stati reclutati 13 pazienti, tutti affetti da Morbo di Crohn e sottoposti a terapia con anti-TNF alfa (adalimumab oppure infliximab), naïve a terapia biologica. Tutti i pazienti arruolati hanno completato la raccolta dei campioni previsti dal protocollo di studio. Le caratteristiche cliniche e demografiche registrate al momento dell'arruolamento sono descritte nella tabella 7.

	Total (n=13)
Age [mean (range)]	34,4 (18-61)
Sex [n (%)]	
- M	4 (30.8)
- F	9 (69.2)
BMI [mean (range)]	21.2 (16.6-27.3)
Ethnicity	
- Caucasian	13 (100)
Diet	
- Mediterranean	13 (100)
- Vegetarian	0
- Lactose-free	0
- Gluten-free	0
Comorbidities [n (%)]	
- psoriasis	1 (7.7)
- hypertension	1 (7.7)
Ongoing therapy [n (%)]	
- IFX	8 (61.5)
- ADA	5 (38.5)
Smoke [n (%)]	
- Yes	0
- No	13 (100)
CD location (Montreal classification) [n (%)]	
- Ileal	8 (61.5)
- Colonic	2 (15.4)
- Ileo-colonic	2 (15.4)
- Ileo-colonic+upperGI	1 (7.7)
CD phenotype	
- Inflammatory	10 (76.9)
- Penetrating+stricturing	1 (7.7)
- Stricturing	2 (15.4)
SES-CD T0 [n (%)]	
- Remission	0
- Mild activity	8 (61.5)
- Moderate activity	2 (15.4)
- Severe activity	3 (23.1)
CDAI T0 [n (%)]	
- Asymptomatic remission	5 (38.5)
- Mildly to moderately active	3 (23)
- Moderately to severely active	5 (38.5)
- Severely active to fulminant	0

Tabella 7: *Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati, al momento dell'arruolamento. BMI, body mass index; IFX, infliximab; ADA, adalimumab; CD, Crohn's disease; SES-CD, Simplified Endoscopic Score for Crohn's disease; CDAI, Crohn's disease activity index.*

Il sequenziamento dei 39 campioni fecali è stato completato in data 30 settembre 2021.

La coorte arruolata presenta caratteristiche omogenee dal punto di vista clinico.

Tutti i pazienti sono affetti da Morbo di Crohn, prevalentemente con localizzazione ileale, severità clinica lieve nel 38,5% dei casi, moderata nel 23% dei casi, severa nel 38,5% dei casi secondo CDAI [40]. La severità endoscopica è risultata essere al momento dell'arruolamento lieve nel 61,5% dei casi, moderata nel 15,4% dei casi, severa nel 23,1% dei casi. Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche che secondo i dati di letteratura potrebbero maggiormente influenzare le caratteristiche del microbiota fecale, nessuno dei pazienti arruolati è obeso, nessun paziente è fumatore, tutti i pazienti sono di razza caucasica e provengono dalla stessa regione geografica (pazienti italiani residenti a Parma) [73], tutti i pazienti seguono una dieta di tipo mediterraneo, senza alcuna specifica restrizione dietetica (priva di glutine, di lattosio, vegetariani, vegani, etc.).

Ogni paziente arruolato ha mantenuto stabili le proprie abitudini alimentari nel corso dello studio.

Dal punto di vista terapeutico, tutti i pazienti arruolati sono sottoposti a terapia biologica con anti-TNF alfa: la maggior parte di essi è stata sottoposta ad infliximab (8 pazienti, 61.5%), i restanti 5 pazienti assumono adalimumab (38.5%).

Tutti i pazienti arruolati risultano essere "responders" alla terapia, ovvero i loro scores clinici ed endoscopici risultano inferiori dopo l'assunzione della terapia rispetto al baseline (T0). In particolare, tutti i pazienti hanno ottenuto uno score clinico (CDAI) indicativo di remissione al termine dello studio (Fig 4) Tuttavia non tutti i pazienti hanno raggiunto la completa remissione di malattia (clinica ed endoscopica). Lo score endoscopico SES-CD ha dimostrato un calo in 12 pazienti su 13, considerando tuttavia che lo score al termine del follow up ha mostrato valori

compatibili con una malattia endoscopicamente moderata in un solo caso, mentre i restanti casi si hanno mostrato valori compatibili con malattia lieve o remissione (Fig 5).

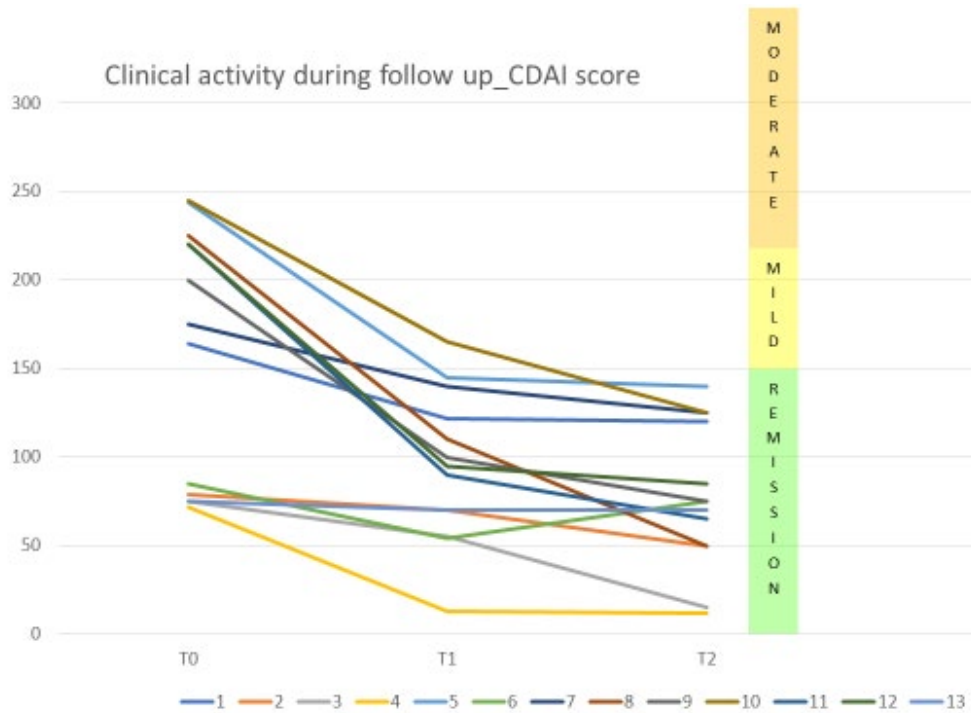


Fig 4: Andamento dello score clinico CDAI dei pazienti arruolati da T0 a T2.

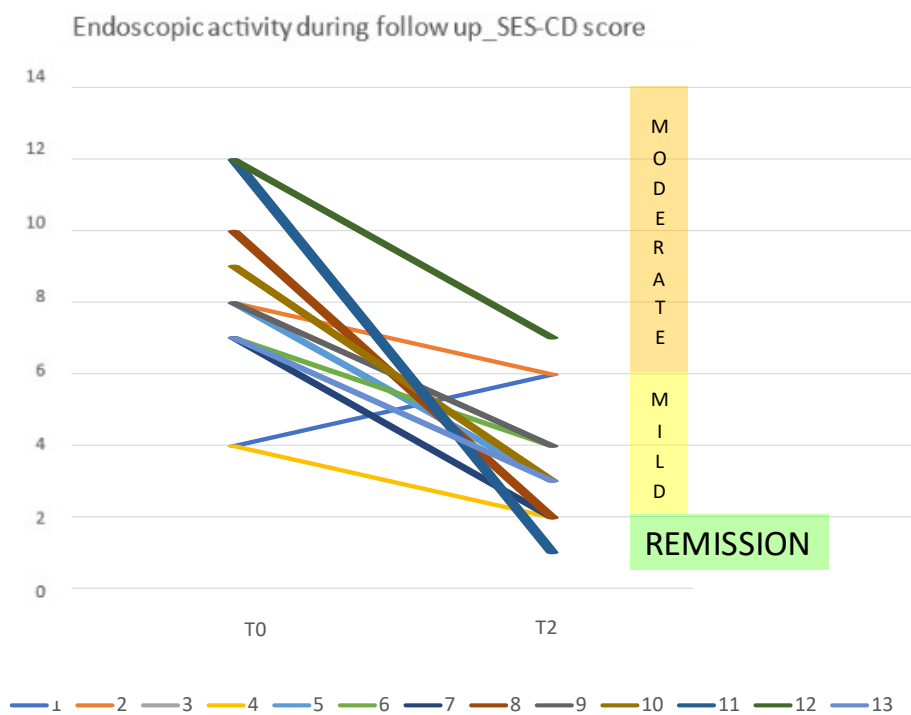


Fig 5: Andamento dello score endoscopico SES-CD dei pazienti arruolati da T0 a T2.

Microbial profiling

	Number of sequenced reads	Number of reads after primers removal	Number of reads after quality filtering	Number of reads after Homo sapiens filtering	Number of classified reads	Δ classified reads T3-T1
A1	27038	25177	26949	25187	16891	23702
A2	42835	39904	42699	39913	23824	
A3	69182	66816	69026	66830	40593	
B1	109374	100290	109029	100453	57085	-28317
B2	46171	44085	46076	44094	25440	
B3	54975	51273	54853	51296	28768	
C1	63826	931	63639	59641	840	55890
C2	47037	44789	46895	44806	24469	
C3	88068	84213	87633	84318	56730	
D1	26514	25138	26426	25149	17040	31760
D2	90639	86545	90286	86601	56703	
D3	75048	71619	74696	71660	48800	
F1	18515	17680	18465	17695	11673	14721
F2	16554	16125	16505	16144	11677	
F3	47597	47281	43931	43905	26394	
G1	50685	49744	50611	49774	41884	18693
G2	83278	79675	82899	79754	59504	
G3	84590	81328	84074	81412	60577	
H1	47674	43724	47474	43744	30741	1014
H2	119198	113603	118761	113626	61374	
H3	56460	56204	51630	51604	31755	
M1	47331	42986	47116	43012	33260	-14621
M2	41862	40101	41687	40131	19266	
M3	35411	35241	30928	30894	18639	
N1	48358	48064	44305	44262	21317	29680
N2	73134	70067	72741	70309	46043	
N3	83532	80828	83150	80855	52881	
P1	42798	42549	40090	40014	23201	6857
P2	67794	65512	67458	65573	36556	
P3	55375	55179	52198	52182	30058	
Q1	46097	43834	45950	44034	28496	3569
Q2	42119	39429	41992	39447	27770	
Q3	59545	59319	57616	57330	32065	
R1	46097	45950	44034	43834	28496	-10931
R3	37177	37011	34077	33937	17565	
S1	42119	41992	39447	39429	27770	
S2	39149	38861	33361	33347	20835	-12911
S3	25988	25855	23836	23818	14859	

Tab 8: numero di sequenze ottenute per l'analisi bioinformatica in seguito a filtro qualitativo (rimozione primers e sequenze di DNA umano).

Il numero di sequenze incluse microbial profiling è risultato dell'ordine di grandezza delle decine di migliaia, dato che consente di affermare che l'analisi del microbiota intestinale dei pazienti arruolati

rientra nell'ambito dei "big data". In seguito all'analisi delle sequenze estratte, è emersa una difformità nel campione C1 che ha mostrato un numero di sequenze volte al microbial profiling di due ordini di grandezza differente rispetto ai restanti campioni, elemento da considerare come possibile bias. L'analisi del numero di sequenze ha inoltre evidenziato una differenza del numero di sequenze da analizzare nel corso del follow up, con un delta positivo nella maggioranza dei casi (9/13 casi). I dettagli sono descritti nella Tab 8.

Le analisi metagenomiche hanno caratterizzato ciascun campione a livello di specie. Le specie isolate sono state denominate taxa, ovvero gruppi concreto di organismi sufficientemente caratterizzato dal punto di vista tassonomico da poter essere assegnato a una categoria sistematica (specie, genere, famiglia ecc.).

La prima analisi condotta ha quantificato il numero di taxa rappresentato in ciascun campione, i dati sono stati raggruppati per ciascun paziente e rappresentati in base al tempo di raccolta del campione (T0-T1-T2). Sono state inoltre considerate le differenze del numero di taxa considerando quali taxa fossero rappresentati per una quantità >1% del campione. I dettagli sono rappresentati nella tabella 9.

	A	B	C	D	F	G	H	M	N	P	Q	R	S	Mean (range)
n°taxa T0	25	15	3	24	20	9	24	14	35	22	25	25	28	20.7 (3-35)
>1%t0	17	13	1	17	16	6	17	12	27	20	21	13	16	15.1 (1-27)
n°taxa T1	20	17	32	27	25	13	26	12	39	20	33	n/a	28	24.3 (12-39)
>1%t2	15	16	25	19	14	9	16	9	26	15	24	n/a	19	17.3 (9-25)
n°taxa T2	22	19	34	20	28	14	19	18	30	20	33	20	33	23.8 (14-34)
>1%t3	19	15	24	13	22	10	15	14	23	17	25	19	20	18.2 (13-25)
Trend	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	

Tab 9: Quantificazione del numero di taxa per ogni paziente nel corso del follow up

Dall'analisi emerge che il trend del numero di taxa nel corso del follow up non è univoco, ovvero l'andamento della "species richness" in 6 pazienti è in diminuzione, mentre nei restanti 7 è in aumento, confrontando il campione al T0 ed il campione al T2.

L'analisi qualitativa dei campioni, ovvero la caratterizzazione quali-quantitativa delle specie rappresentate, ha evidenziato un'importante variabilità interindividuale tra i pazienti arruolati, nonostante le caratteristiche cliniche uniformi. Considerando i 39 campioni (3 campioni per ciascuno dei 13 pazienti arruolati) totale sono state isolate 160 specie distribuite in maniera disomogenea sia per paziente che per tempo di raccolta del campione.

L'analisi quali-quantitativa dei campioni a T0-T1-T2 è rappresentata nelle figure 6-7-8.

descrizione T0 deicampioni

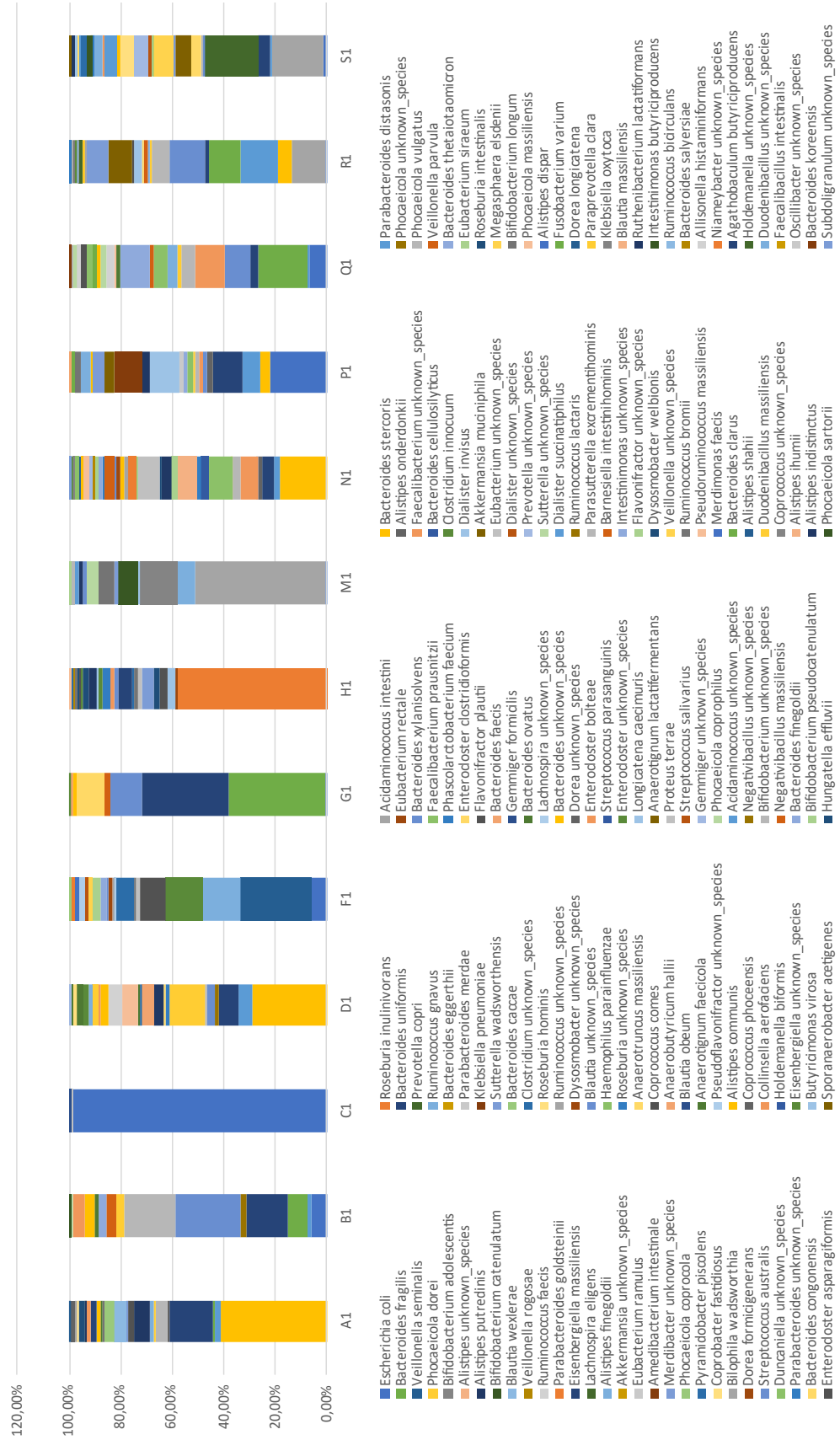


Fig 6: Analisi quali-quantitativa dei campioni al T0.

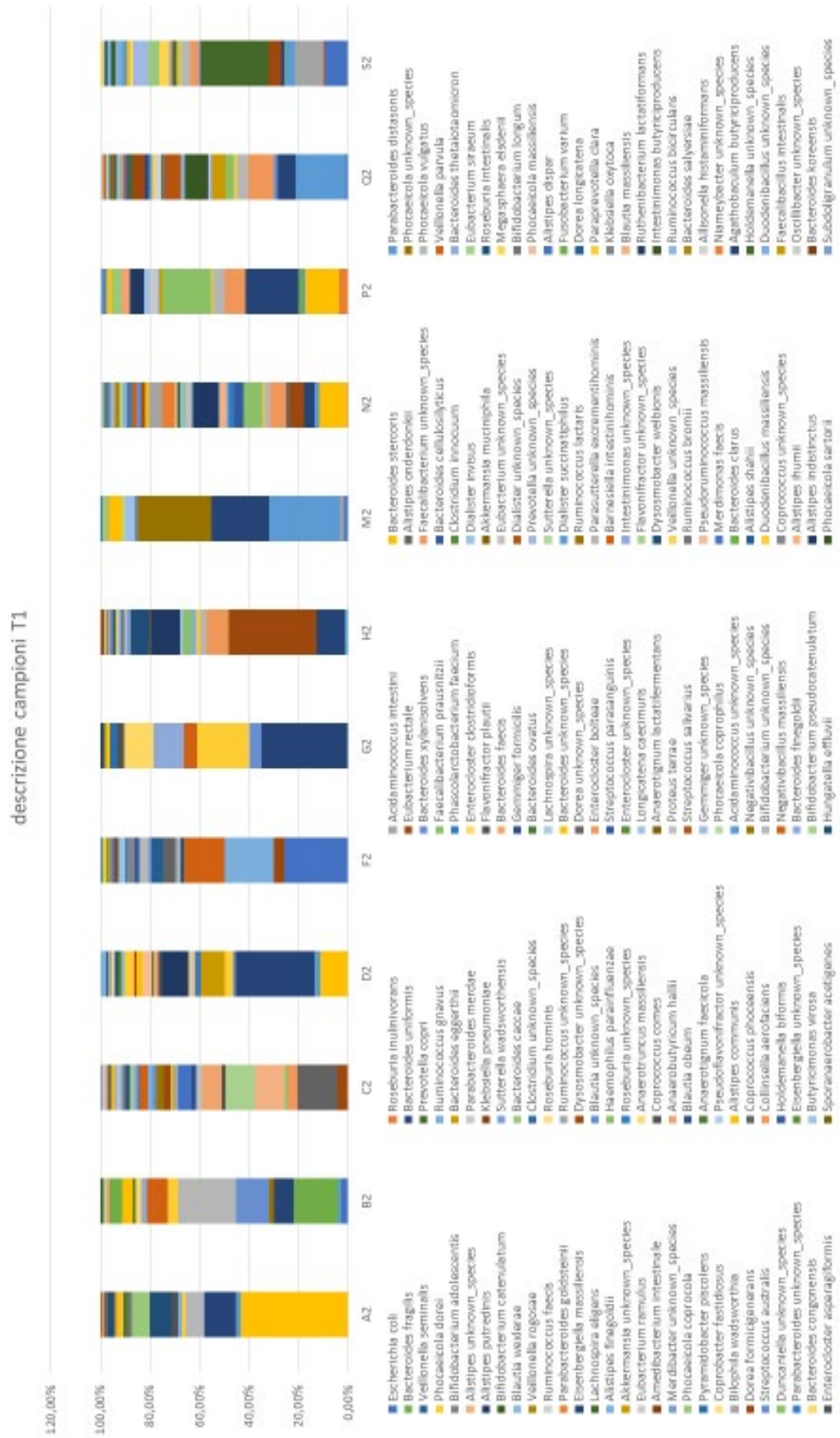


Fig 7: Analisi quali-quantitativa dei campioni al T1.

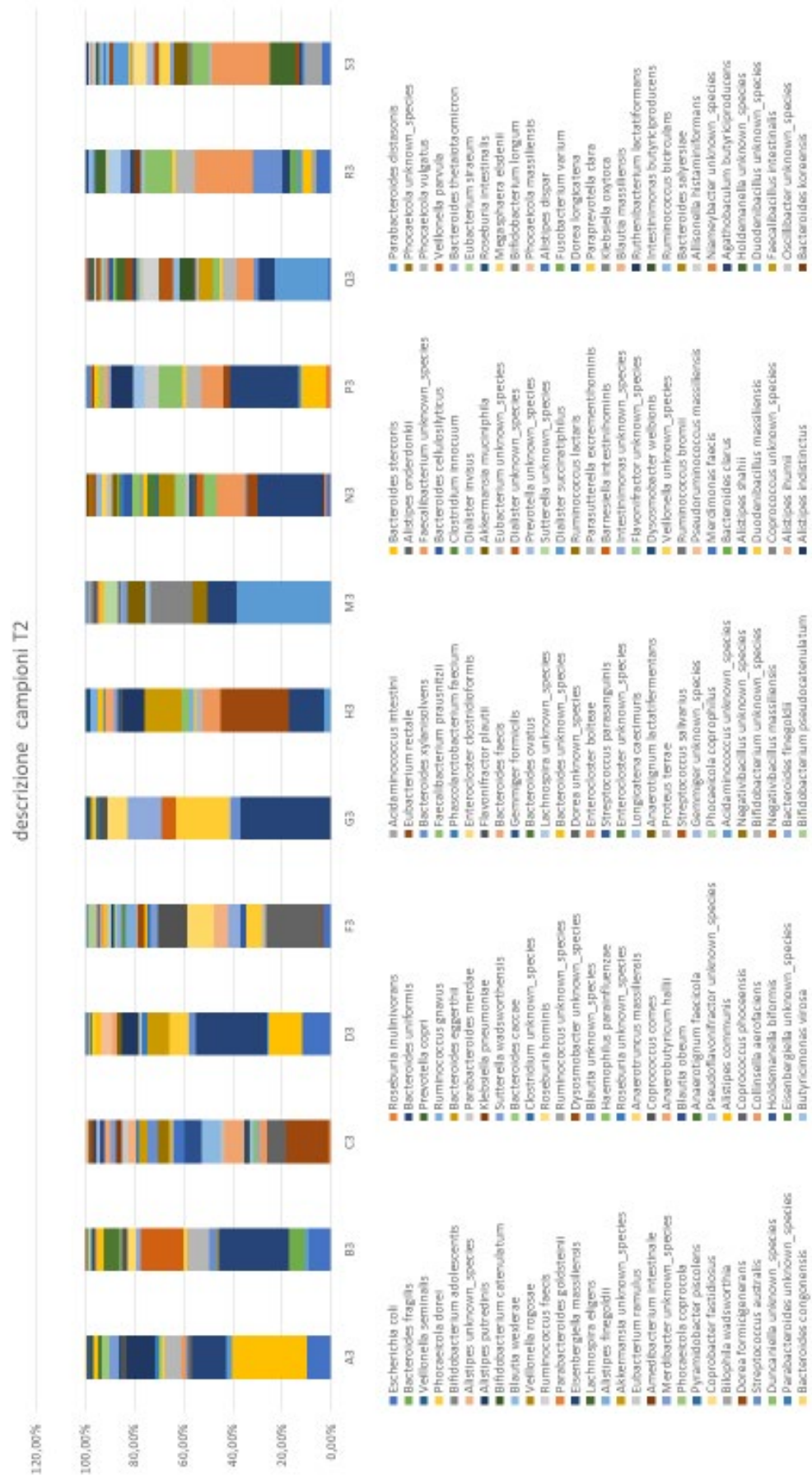


Fig 8: Analisi quali-quantitativa dei campioni al T2.

Dalla rappresentazione grafica della distribuzione dei taxa è evidente una disomogeneità dei campioni, che non consente l'immediata individuazione di pattern comuni tra i pazienti arruolati. La variabilità dei campioni è anche dimostrata dalla rappresentazione di diversi taxa nei momenti considerati del follow up. Quantificando al T0 la condivisione dei taxa tra campioni, emerge che: 44 taxa isolati al T1 o al T2 non sono rappresentati; 65 taxa, tutti espressi con quantità <1% sono rappresentati una sola volta; 17 taxa sono rappresentati 2 volte; 13 taxa sono rappresentati 3 volte; 9 taxa sono rappresentati 4 volte; 3 taxa sono rappresentati 5 volte; 2 taxa sono rappresentati 6 volte; 1 taxa è rappresentato 7 volte e 5 taxa sono rappresentati 8 volte; 2 taxa sono rappresentati 9 volte. I taxa condivisi da almeno 2 campioni sono rappresentati nelle figure 9, 10, 11, 12.

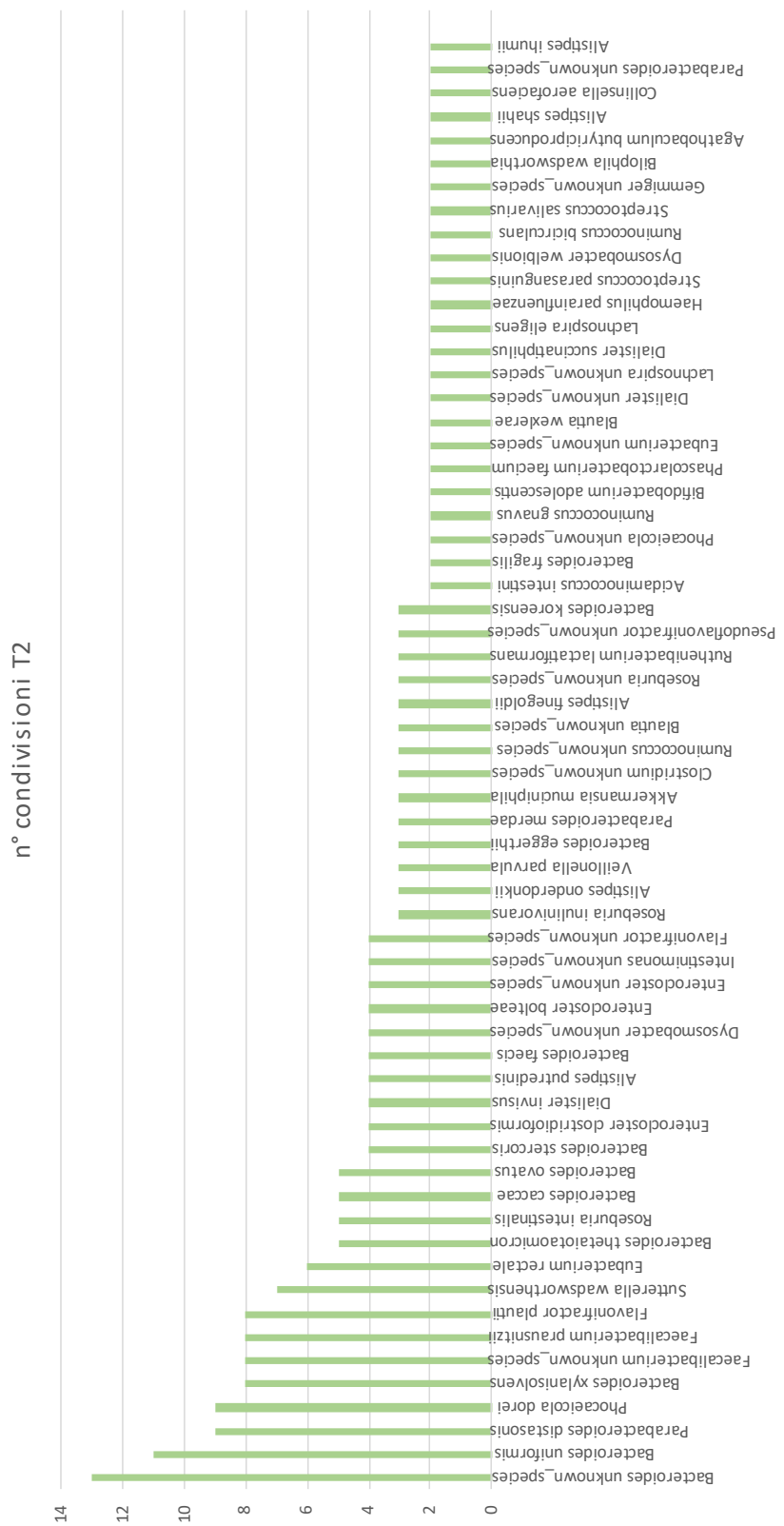


Fig 11: Condivisione dei taxa al T2. L'ordinata esprime il numero di campioni che esprimono un determinato taxa.

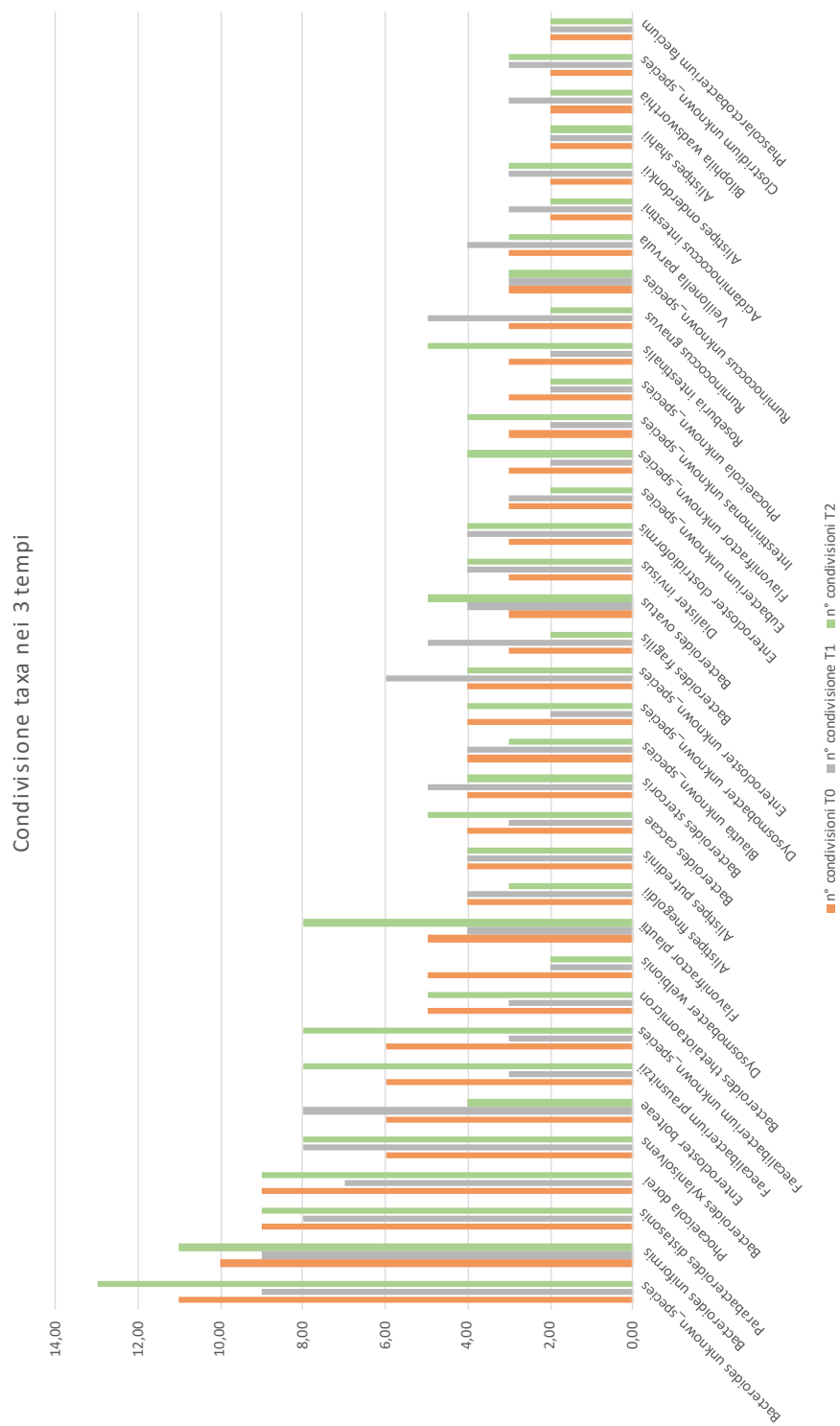


Fig 12: Condivisione dei taxa nei 3 tempi di raccolta dei campioni. L'ordinata esprime il numero di campioni che esprimono un determinato taxa

L'analisi qualitativa dei campioni è stata inoltre condotta comparando i 3 campioni consecutivi per ciascun paziente, si riportano per brevità in figura 13 e 14 la composizione dei pazienti A e B rispettivamente.

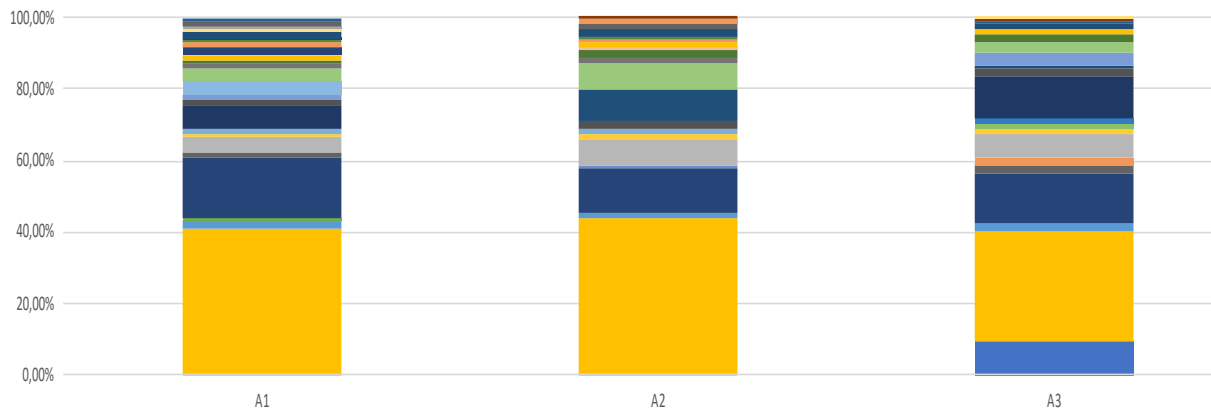


Fig 13: Analisi quali-quantitativa della composizione dei 3campioni consecutivi del paziente A. Si rimanda alle figure 6-7-8 per la decodifica colore-taxa.

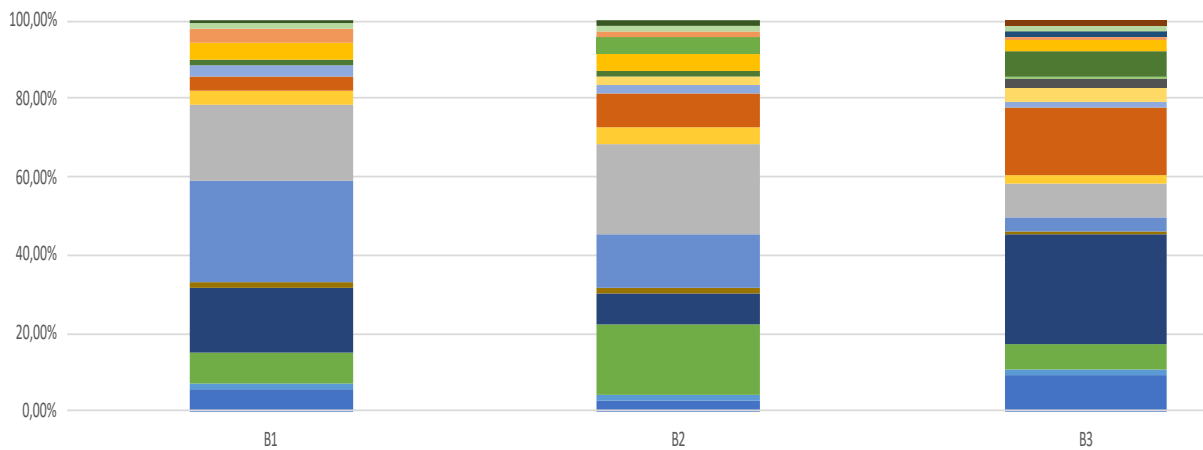


Fig 14: Analisi quali-quantitativa della composizione dei 3campioni consecutivi del paziente A. Si rimanda alle figure 6-7-8 per la decodifica colore-taxa

Considerando il singolo paziente è possibile identificare una condivisione di taxa nei 3 campioni, sebbene ancora una volta emerge una variabilità di taxa, con comparsa di nuove specie nel tempo e modifica quantitativa delle specie condivise, come evidenziato dalle figure 13 e 14.

Le differenze tra campioni (beta diversità) sono state calcolate mediante Principal Coordinate Analysis (PCoA) basata su matrici Bray Curtis (Figura 15).

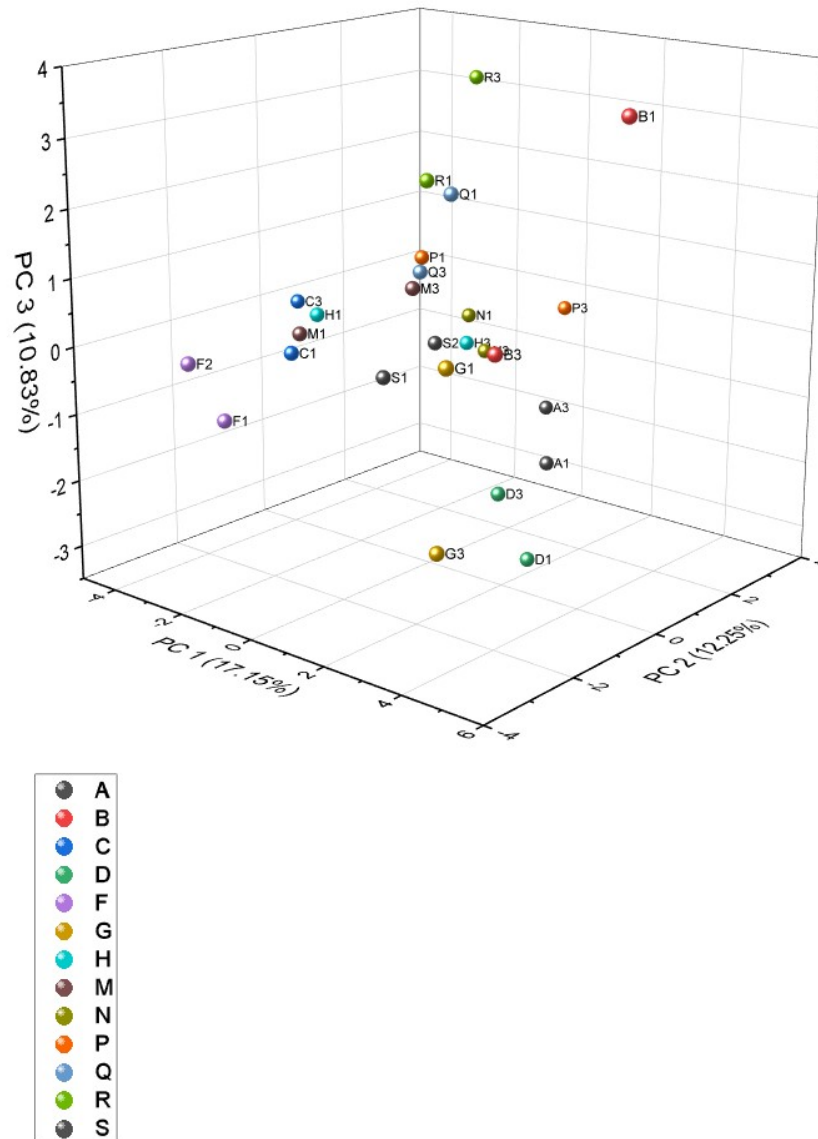


Fig 15: Risultato di Principal Coordinate Analysis (PCoA) basata su matrici Bray Curtis. Analisi delle differenze tra campione al T0 ed al T2 per ogni paziente

Dall'analisi si è evidenziato che ogni coppia di campioni ha espresso una variazione nella composizione quali-quantitativa, tuttavia dal grafico non è possibile evidenziare raggruppamenti di campioni nello spazio tridimensionale (es. raggruppamenti di campioni 1 differenti), elemento che

evidenzia ancora una volta la variabilità interindividuale che impedisce una comparazione diretta tra gruppi. Tuttavia, l'evidenza di una variazione dimostra come nel corso del follow up la terapia abbia modificato l'assetto del microbiota del paziente rispetto al T0.

L'analisi dell'andamento del microbiota dei pazienti arruolati è stata quindi condotta calcolando il trend in aumento o in diminuzione di ogni specie isolata, comparando T0 e T2. Mediante questo calcolo è stato possibile identificare quali specie sono aumentate in seguito alla terapia e quali invece sono diminuite, con rispettivi valori quantitativi minimi e massimi espressi nei campioni. Non è ancora possibile attribuire un significato clinico a tali variazioni, sia perché in letteratura non è ancora noto né l'esatto ruolo del microbiota nella patologia infiammatoria intestinale, né se esso o sue variazioni possano avere un ruolo quali marcatori di andamento della patologia stessa. Inoltre, l'evidenza dell'importante variabilità dei campioni stessi impone una progressiva comprensione della distribuzione delle specie nel tempo, con un'analisi relativa non solo all'eventuale significatività dei trend delle specie, ma anche del ruolo della loro abbondanza relativa nei campioni. Infatti, come si può evincere dalle figure 6-7-8 e dalla tabella 10, molte specie sono rappresentate in quantità < 1% del campione considerato, percentuali che da un lato possono essere considerate affidabili essendo stato utilizzato un metodo di analisi metagenomica shotgun che non prevede falsi positivi, dall'altro potrebbero non essere clinicamente influenti sul campione stesso, per scarsità di rappresentazione dal punto di vista quantitativo.

Species	Mean	Min	Max
Escherichia coli	-.075063	-.9781753	.1195297
Roseburia inulinivorans	-.0447167	-.5762321	.0210061
Acidaminococcus intestini	-.0402315	-.5019707	.0191926
Bacteroides stercoris	-.0283247	-.181395	.0596523
Parabacteroides distasonis	.025383	-.1860144	.3766131
Bacteroides fragilis	-.0304031	-.3732953	.2206106
Bacteroides uniformis	.0841639	-.033374	.2250149
Eubacterium rectale	.0430003	0	.2663348
Alistipes onderdonkii	.0228337	-.0247203	.2246394

Phocaeicola unknown_species	.0031315	-.0108034	.0582617
Veillonella seminalis	-.0231988	-.2783852	0
Prevotella copri	0	0	0
Bacteroides xyloxylophilus	-.0153723	-.2221064	.1982115
Faecalibacterium unknown_species	.0393032	-.0464764	.2812289
Phocaeicola vulgatus	.0056922	-.107051	.0746342
Phocaeicola dorei	.0191155	-.0626666	.2151668
Ruminococcus gnavus	-.0167508	-.1464653	.0408318
Faecalibacterium prausnitzii	.0173044	-.0349217	.1357302
Bacteroides cellulosilyticus	-.0010152	-.0339306	.0217477
Veillonella parvula	.0165531	-.0198442	.139442
Bifidobacterium adolescentis	.0020622	0	.0247458
Bacteroides eggerthii	.0198399	-.0564648	.1506319
Phascolarctobacterium faecium	.0005729	-.0153363	.0148214
Clostridium innocuum	-.0120777	-.1449318	0
Bacteroides thetaiotaomicron	.0137387	-.1036659	.138352
Alistipes unknown_species	-.0017599	-.0775307	.0564115
Parabacteroides merdae	.0044508	-.0076938	.0441938
Enterocloster clostridioformis	.0097768	-.0237137	.1077061
Dialister invisus	-.0053342	-.0707909	.0175543
Eubacterium siraeum	-.0015167	-.0182001	0
Alistipes putredinis	.0154736	-.0421485	.0908797
Klebsiella pneumoniae	-.0068635	-.1092001	.0268381
Flavonifractor plautii	.0072868	-.015433	.0297102
Akkermansia muciniphila	.004829	-.0336323	.071046
Roseburia intestinalis	.0018257	-.0218055	.0182238
Bifidobacterium catenulatum	-.0061808	-.07417	.0551134
Sutterella wadsworthensis	.0031036	-.0386215	.0400152
Bacteroides faecis	.0085229	-.0278832	.0791235
Eubacterium unknown_species	-.0055977	-.0616528	.0179539
Megasphaera elsdenii	0	0	0
Blautia wexlerae	.0030772	-.042508	.0738069
Bacteroides caccae	.004253	-.0051043	.0297631
Gemmiger formicilis	.0058401	0	.0700815
Dialister unknown_species	0	-.0552729	.0552729
Bifidobacterium longum	-.0074073	-.052425	0
Veillonella rogosae	.0052882	0	.0634586
Clostridium unknown_species	-.004249	-.0522263	.0158418
Bacteroides ovatus	.0077114	-.0085063	.0433678
Prevotella unknown_species	0	0	0
Phocaeicola massiliensis	-.0011871	-.014245	.0077862
Ruminococcus faecis	-.0046568	-.0558812	.0238822
Roseburia hominis	0	0	0
Lachnospira unknown_species	.0037465	-.0121493	.0464267
Sutterella unknown_species	.0008348	-.0207558	.0207558

Alistipes dispar	.0035189	0	.042227
Parabacteroides goldsteinii	-.0021679	-.0260143	0
Ruminococcus unknown_species	-.0006133	-.0167896	.0116572
Bacteroides unknown_species	.0043488	-.0108318	.0214712
Dialister succinatiphilus	0	-.0110431	.0110431
Fusobacterium varium	0	-.0119785	.0119785
Eisenbergiella massiliensis	-.0055186	-.0492227	.011431
Dysosmobacter unknown_species	.0012888	-.0316021	.0316021
Dorea unknown_species	0	0	0
Ruminococcus lactaris	.0038604	0	.0463253
Dorea longicatena	0	0	0
Lachnospira eligens	.003627	0	.0378385
Blautia unknown_species	.0006008	-.0193729	.0427101
Enterocloster bolteae	-.0046065	-.0325585	.0120202
Parasutterella excrementihominis	0	0	0
Paraprevotella clara	-.001151	-.0138114	0
Alistipes finegoldii	.0022186	-.0361279	.0466625
Haemophilus parainfluenzae	.0029267	-.0042764	.0351205
Streptococcus parasanguinis	.0029263	-.0150089	.0351157
Barnesiella intestinihominis	-.0026817	-.0321807	.0091015
Klebsiella oxytoca	0	0	0
Akkermansia unknown_species	.0027605	0	.0331257
Roseburia unknown_species	-.0013608	-.0298092	.0140704
Enterocloster unknown_species	-.0017709	-.0186728	.0142245
Intestinimonas unknown_species	-.0013819	-.0151904	.0139389
Blautia massiliensis	.0023312	0	.0279741
Eubacterium ramulus	.0022997	0	.027596
Anaerotruncus massiliensis	0	0	0
Longicatena caecimuris	-.0006938	-.0083261	0
Flavonifractor unknown_species	-.0012695	-.0128125	.009467
Ruthenibacterium lactatiformans	-.0018584	-.0246905	.0084824
Amedibacterium intestinale	.0020019	0	.0240225
Coprococcus comes	0	-.0234613	.0234613
Anaerotignum lactatifermentans	.0019404	0	.0232846
Dysosmobacter welbionis	.0009704	-.005209	.016749
Intestinimonas butyriciproducens	0	0	0
Merdibacter unknown_species	.0018689	0	.0224265
Anaerobutyricum hallii	.0018636	0	.0223638
Proteus terrae	.001801	0	.0216123
Veillonella unknown_species	-.0000141	-.0211642	.0209946
Ruminococcus bicirculans	.0031213	0	.0211177
Phocaeicola coprocola	0	0	0
Blautia obeum	.0017139	0	.020567
Streptococcus salivarius	.0002682	-.0204915	.0204915
Ruminococcus bromii	-.0004946	-.0200986	.0141628

<i>Bacteroides salyersiae</i>	-0.0007876	-0.009451	0
<i>Pyramidobacter piscolens</i>	0	0	0
<i>Anaerotignum faecicola</i>	-0.0015966	-0.0191589	0
<i>Gemmiger unknown_species</i>	-0.0008317	-0.0189182	.0089382
<i>Pseudoruminococcus massiliensis</i>	-0.0014944	-0.0179328	0
<i>Allisonella histaminiformans</i>	0	-0.0177839	.0177839
<i>Coprobacter fastidiosus</i>	-0.002347	-0.0176555	0
<i>Pseudoflavonifractor unknown_species</i>	-0.0001202	-0.008517	.008517
<i>Phocaeicola coprophilus</i>	.0004791	-0.011586	.011586
<i>Merdimonas faecis</i>	-0.0014222	-0.0170669	0
<i>Niameybacter unknown_species</i>	-0.0013901	-0.0166812	0
<i>Bilophila wadsworthia</i>	.0022355	-0.0126522	.0155103
<i>Alistipes communis</i>	.0005711	-0.0081482	.015001
<i>Acidaminococcus unknown_species</i>	-0.0013053	-0.0156635	0
<i>Bacteroides clarus</i>	-0.0012712	-0.015254	0
<i>Agathobaculum butyriciproducens</i>	.0022385	0	.0151845
<i>Dorea formicigenerans</i>	.0012539	0	.0150469
<i>Coprococcus phoceensis</i>	-0.0012271	-0.0147248	0
<i>Negativibacillus unknown_species</i>	.0011474	0	.0137692
<i>Alistipes shahii</i>	.000923	-0.0106343	.009797
<i>Holdemanella unknown_species</i>	0	-0.0126059	.0126059
<i>Streptococcus australis</i>	0	0	0
<i>Collinsella aerofaciens</i>	.0015594	0	.0187123
<i>Bifidobacterium unknown_species</i>	-0.0010226	-0.0122707	0
<i>Duodenibacillus massiliensis</i>	0	0	0
<i>Duodenibacillus unknown_species</i>	0	0	0
<i>Duncaniella unknown_species</i>	-0.0009971	-0.0119654	0
<i>Holdemanella biformis</i>	0	-0.0118118	.0118118
<i>Negativibacillus massiliensis</i>	0	-0.0117241	.0117241
<i>Coprococcus unknown_species</i>	-0.0009365	-0.0112382	0
<i>Faecalibacillus intestinalis</i>	0	0	0
<i>Parabacteroides unknown_species</i>	.0016194	0	.0106721
<i>Eisenbergiella unknown_species</i>	-0.000993	-0.010637	.0032392
<i>Bacteroides finegoldii</i>	.0008189	0	.0098269
<i>Alistipes ihumii</i>	.001737	0	.0109503
<i>Oscillibacter unknown_species</i>	0	0	0
<i>Bacteroides congonensis</i>	0	0	0
<i>Butyricimonas virosa</i>	0	0	0
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	.0013942	-0.0094283	.026159
<i>Alistipes indistinctus</i>	0	0	0
<i>Bacteroides koreensis</i>	.0018333	-0.004159	.0094026
<i>Enterocloster asparagiformis</i>	-0.0004148	-0.009355	.0043772
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	0	0	0
<i>Hungatella effluvii</i>	.0000245	-0.0090276	.0093214
<i>Phocaeicola sartorii</i>	-0.0007317	-0.0087807	0

Subdoligranulum unknown_species	-0.0007663	-0.0091962	0
Butyricimonas unknown_species	-0.0007508	-0.0090096	0
Escherichia albertii	-0.0007443	-0.0089314	0
Clostridium perfringens	0	0	0
Paraprevotella xylaniphila	0	0	0
Blautia hansenii	-0.00064	-0.0076799	0
Escherichia unknown_species	-0.0007048	-0.0084572	0
Alistipes provencensis	0	0	0
Hungatella unknown_species	-0.0006511	-0.0078134	0
Anaerotruncus colihominis	-0.0006397	-0.007677	0
Lachnoclostridium unknown_species	-0.0005868	-0.0070421	0
Culturomica unknown_species	-0.0005284	-0.006341	0
Bacteroides fluxus	-0.0005199	-0.0062387	0
Eisenbergiella tayi	-0.0000194	-0.0051129	.0048797
Enterobacter hormaechei	.0004141	0	.0049695
Klebsiella michiganensis	.0003921	0	.0047052
Pseudoflavonifractor capillosus	.0006499	0	.007799

Tab 10: *Variazione di ogni specie confrontando T2-T0 di tutti i pazienti arruolati. Calcolo delle specie che aumentano e diminuiscono quantitativamente dal T0 al termine del follow up con rispettivi valori di minimo e massimo.*

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Il presente studio nasce dalla necessità clinica di esplorare un campo in progressiva via di definizione, ma ancora largamente sconosciuto e quindi ad oggi poco applicabile alla pratica clinica, il microbiota intestinale. Il ruolo del microbiota intestinale quale fattore capace di influenzare lo stato di infiammazione dell'intestino è noto da anni ed è stato studiato anche nel campo delle MICI. La iniziale perdita di biodiversità e la comparsa di disbiosi appaiono in numerosi studi in letteratura quali fattori ambientali determinanti la comparsa e la perpetuazione della flogosi intestinale [10, 12, 15, 16]. Sono state riportate inoltre variazioni quantitative di specie protettive e con azione anti-infiammatoria nei pazienti affetti rispetto ai sani. In particolare si sono evidenziate significative riduzioni di *Bacteroides* (*Bacteroidetes phylum*), *Eubacterium*, *Lactobacillus species* (*Firmicutes phylum*), *Firmicutes* e *Faecalibacterium prausnitzii* [10, 12-14]. Inoltre, l'effetto pro-infiammatorio del dismicrobismo intestinale è testimoniato dal beneficio clinico ottenuto in seguito all'utilizzo della terapia antibiotica nelle MICI in fase acuta e nelle pouchiti [53].

L'applicazione delle tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) negli ultimi anni ha ampliato enormemente la possibilità di studio di questa branca della microbiologia, e, grazie alle analisi metagenomiche, stiamo assistendo all'emergere di molteplici studi di ricerca traslazionale che evidenziano come la caratterizzazione del microbiota intestinale nelle MICI sia un potenziale strumento di monitoraggio dell'infiammazione, un fattore di influenza alla risposta terapeutica ed un potenziale strumento prognostico di severità di malattia [64, 70].

Nonostante le numerose ricerche sul microbiota intestinale nelle MICI, ad oggi non si conoscono studi che abbiano l'obiettivo di caratterizzare longitudinalmente il microbiota di pazienti affetti da CD sottoposti a terapia biologica quale primo intervento terapeutico dopo la diagnosi, per verificare gli eventuali cambiamenti del microbiota stesso in corso di terapia. Uno studio di Ananthkrishnan et al [70] ha indagato longitudinalmente il ruolo predittivo del microbiota intestinale di una coorte di pazienti affetti da CD e UC nei confronti della risposta alla terapia con vedolizumab, evidenziando modificazioni precoci del microbiota quali potenziali marcatori di risposta alla

terapia. Tuttavia tale studio può essere considerato solo parzialmente comparabile al presente, essendo la nostra popolazione unicamente costituita da pazienti affetti da CD, mai sottoposti in precedenza a terapia biologica, uniformemente trattati con anti-TNF α . In base all'evoluzione clinica dei nostri pazienti, tutti responsivi alla terapia, l'impostazione metodologica e l'obiettivo del nostro studio si sono basati sulla ricerca di eventuali modificazioni qualitative del microbiota intestinale iniziale in seguito alla somministrazione di terapia biologica. Questo per verificare, se in fase di remissione clinica di malattia (T2) si possa dimostrare una modifica sostanziale delle caratteristiche del microbiota. Tale ipotesi potrebbe supportare l'idea che uno dei meccanismi con cui la terapia biologica agisce nei confronti della malattia attiva sia quello di determinare o contribuire a modificazioni del microbiota con un incremento di specie anti-infiammatorie ed un calo di specie pro-infiammatorie e dannose nei confronti della mucosa intestinale.

Il metodo di analisi del microbiota intestinale dei pazienti arruolati, shotgun metagenomics, garantisce un'elevata sensibilità nell'identificazione delle specie microbiche, confermando la sua affidabilità nel raggiungimento degli obiettivi del protocollo di studio.

I risultati finora ottenuti e il grado della loro elaborazione sono dipesi in gran parte dalle tempistiche imposte dall'applicazione del protocollo:

- l'ottenimento delle autorizzazioni necessarie ha comportato che l'arruolamento sia iniziato a fine settembre 2020;
- l'arruolamento è terminato a giugno 2021,
- il sequenziamento dei campioni, calcolando la necessità di attendere 12 settimane per la raccolta del terzo campione dell'ultimo paziente arruolato, è terminato a fine settembre 2021.

L'output di dati ottenuti dal sequenziamento, ovvero il numero di sequenze ottenute in seguito al filtro qualitativo dei "raw data", dimostra che l'analisi del microbiota intestinale umano si colloca nell'ambito della gestione di "big data". Inoltre, le scarse conoscenze in letteratura in questo specifico contesto impongono un'interpretazione dei dati progressiva. L'analisi iniziale è stata di

tipo quantitativo per verificare la numerosità di specie (species richness) di ogni campione. Successivamente è stata definita l'analisi qualitativa dei campioni, che globalmente ha consentito di identificare ben 160 specie considerando 38 campioni (3 campioni per ogni paziente, eccetto un paziente che ha consegnato solo il campione iniziale e quello finale). Questo dato numerico dimostra un'importante variabilità interindividuale, indipendente dalle caratteristiche cliniche dei pazienti, che si sono dimostrate omogenee per patologia, terapia, dieta e BMI. Tale variabilità sottolinea la complessità della ricerca di specie quali possibili indicatori dell'andamento del microbiota nel corso del follow up dello studio. Tale complessità è ancor più evidente considerando che nel singolo paziente, nei tre tempi si assiste alla comparsa di nuove specie da un campione all'altro ed alla scomparsa di altre (fig. 13-14). Osservando il risultato dell'analisi della beta diversity basata su matrici Bray-Curtis (fig. 15), è chiaro che il microbiota di ogni paziente subisce modificazioni quali-quantitative sostanziali in corso di terapia. Tuttavia nel grafico non è possibile distinguere dei cluster di campioni che condividano caratteristiche simili in base al tempo considerato ad esempio, sottolineando ancora una volta predominanza della variabilità interindividuale.

Al fine di identificare eventuali caratteristiche comuni ai campioni, si sono quantificate le specie più condivise tra i campioni nei tre tempi dello studio, sebbene non sia possibile evidenziare un pattern condiviso (fig. 9-10-11-12).

L'altro dato che è emerso dall'analisi metagenomica è l'abbondanza relativa delle specie, ovvero la quantità in percentuale di una determinata specie in ogni campione. Sebbene l'abbondanza relativa di ogni specie vari da un campione all'altro a parità di tempistica considerata, è stato possibile quantificare un andamento globale di ogni specie, riconoscendo quali specie sono diminuite quantitativamente da T0 a T2 e quali invece sono aumentate (tab 10). L'abbondanza relativa delle specie isolate varia da percentuali <1% a percentuali >50%, tuttavia ad oggi non è possibile definire un cut-off per il quale una specie ha un'influenza funzionale su un campione in base a quanto è rappresentata percentualmente. Per tale motivo, in questa analisi iniziale si sono considerate tutte le

specie isolate, indipendentemente dalla loro quantità relativa, anche alla luce del metodo NGS utilizzato, che non dovrebbe produrre falsi positivi.

Complessivamente, alla luce di:

- Numerosità delle sequenze da analizzare, che consentono di identificare il presente studio nell'ambito dell'analisi di "big data";
- Variabilità interindividuale sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo del microbiota intestinale;
- Numerosità dei taxa (specie) individuati dalle analisi metagenomiche per un ammontare di 160 taxa;
- Complessità delle modificazioni qualitative nel tempo dei taxa rappresentati nello stesso paziente, con individuazione di nuovi taxa da un tempo al successivo e scomparsa di altri
- Variabilità del trend della numerosità di specie nei 3 tempi consecutivi senza univocità tra pazienti;
- Omogeneità clinica dei pazienti arruolati e del loro outcome clinico che vede tutti i pazienti come "responder" alla terapia;
- Mancanza di dati relativi al ruolo delle singole specie nel campo clinico, quali eventuali ceppi patogeni e ceppi protettivi;
- Impossibilità di individuare un microbiota "sano" standard, da poter comparare con un microbiota patologico, essendo il microbiota una caratteristica soggettiva dell'individuo,

i risultati del presente studio sono da considerarsi esplorativi e preliminari, ma possono fare intuire ulteriori e future elaborazioni.

La mancanza di dati di letteratura ai quali poter comparare il presente studio corrobora l'obiettivo iniziale di colmare lacune conoscitive nel campo del microbiota intestinale nelle MICI e supporta la conduzione progressiva delle analisi, che sono tuttora in corso.

Tra i limiti del presente studio si annoverano:

- numerosità dei pazienti arruolati, numero comunque da mettere in relazione alla provenienza dei pazienti da un unico centro e l'omogeneità clinica con cui i pazienti sono stati arruolati, impedendo la dispersione dei dati in seguito ad un'eventuale divisione in sottogruppi;
- elevata variabilità interindividuale emersa dalla prima analisi quali-quantitativa dei campioni;
- tempo disponibile per l'analisi bioinformatica di "big data".

Tra i punti di forza invece si riconoscono:

- rigore metodologico con cui l'arruolamento e la processazione dei campioni sono stati effettuati;
- l'omogeneità clinica dei pazienti arruolati,
- l'assenza di pazienti "drop out" in seguito all'arruolamento.

A fronte di questi limiti chiaramente ben delimitati, i risultati ottenuti pongono alcuni interrogativi e suggeriscono alcune direttive lungo le quali lo studio potrà continuare:

- Possibilità di misura della variabilità: 160 taxa compaiono almeno in un campione. L'applicazione del "test dei ranghi con segno" potrà rispondere quantificando la significatività di variazione delle specie nei 3 tempi.
- Individuazione di eventuali pattern: numero di taxa condivisi e andamento del pattern, quantificazione della condivisione di taxa al T0-T1-T2 (quanti campioni condividono la stessa specie nei 3 momenti del follow up). L'individuazione di eventuali pattern consentirà la creazione di "hitmap" rappresentative dell'andamento del microbiota nel tempo, inoltre potrà essere esplorata l'eventuale covariazione di specie, elemento ad oggi non noto in letteratura.
- Eventuale individuazione di pattern indicativi di andamento della patologia. L'applicazione di analisi CART consentirà di comprendere l'eventuale significatività delle variazioni quantitative delle specie.

- Confronto tra taxa condivisi nei 3 momenti del follow up: quantitativo e tra i taxa più abbondanti.

In conclusione, questo studio, partito con l'idea di comprendere se la terapia biologica primariamente o secondariamente possa condizionare delle variazioni del microbiota correlabili al miglioramento/remissione della malattia, ha confermato la grande distanza tra conoscenze del microbiota ed applicazioni cliniche, come del resto avviene per la maggior parte delle patologie in cui si ipotizza il microbiota quale fattore ambientale determinante. Parallelamente, può servire, specie dal punto di vista dell'analisi metodologica, a validare le basi di studi di coorte più ampi che possano chiarire i rapporti tra microbiota e sue eventuali variazioni nel Morbo di Crohn in terapia biologica.

Bibliografia

1. Loftus EV, Jr.: **Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences.** *Gastroenterology* 2004, **126**:1504-1517.
2. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG: **Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review.** *Gastroenterology* 2012, **142**:46-54 e42; quiz e30.
3. Oliveira SB, Monteiro IM: **Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children.** *BMJ* 2017, **357**:j2083.
4. Corica D, Romano C: **Biological Therapy in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review.** *J Clin Gastroenterol* 2017, **51**:100-110.
5. Moon JS: **Clinical Aspects and Treatments for Pediatric Inflammatory Bowel Diseases.** *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 2019, **22**:50-56.
6. Ramos GP, Papadakis KA: **Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases.** *Mayo Clin Proc* 2019, **94**:155-165.
7. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN: **Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease.** *Am J Gastroenterol* 2010, **105**:2687-2692.
8. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS: **Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function.** *Science* 2012, **336**:489-493.
9. Carriere J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT: **Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**:12102-12117.
10. Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, Brostoff J, Parkhill J, Dougan G, Petrovska L: **High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease.** *BMC Microbiol* 2011, **11**:7.
11. Sartor RB: **Microbial influences in inflammatory bowel diseases.** *Gastroenterology* 2008, **134**:577-594.
12. Basso PJ, Fonseca MT, Bonfa G, Alves VB, Sales-Campos H, Nardini V, Cardoso CR: **Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease.** *Braz J Med Biol Res* 2014, **47**:727-737.
13. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S: **Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease.** *Gut* 2004, **53**:685-693.

14. Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK: **Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2009, **15**:653-660.
15. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF: **Dysbiosis in inflammatory bowel disease.** *Gut* 2004, **53**:1-4.
16. Rooks MG, Veiga P, Wardwell-Scott LH, Tickle T, Segata N, Michaud M, Gallini CA, Beal C, van Hylckama-Vlieg JE, Ballal SA, et al: **Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission.** *ISME J* 2014, **8**:1403-1417.
17. Podolsky DK: **Inflammatory bowel disease.** *N Engl J Med* 2002, **347**:417-429.
18. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD: **Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 1999, **116**:301-309.
19. Caruso R, Lo BC, Nunez G: **Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease.** *Nat Rev Immunol* 2020, **20**:411-426.
20. Zhou M, He J, Shen Y, Zhang C, Wang J, Chen Y: **New Frontiers in Genetics, Gut Microbiota, and Immunity: A Rosetta Stone for the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease.** *Biomed Res Int* 2017, **2017**:8201672.
21. Cococcioni L, Panelli S, Varotto-Boccazzi I, Carlo DD, Pistone D, Leccese G, Zuccotti GV, Comandatore F: **IBDs and the pediatric age: Their peculiarities and the involvement of the microbiota.** *Dig Liver Dis* 2021, **53**:17-25.
22. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, Shibata N, Grunberg S, Sinha R, Zahm AM, et al: **Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria.** *Science* 2012, **336**:1321-1325.
23. Negroni A, Colantoni E, Vitali R, Palone F, Pierdomenico M, Costanzo M, Cesi V, Cucchiara S, Stronati L: **NOD2 induces autophagy to control AIEC bacteria infectiveness in intestinal epithelial cells.** *Inflamm Res* 2016, **65**:803-813.
24. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM: **Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:3401-3407.
25. Rescigno M: **The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity.** *Trends Immunol* 2011, **32**:256-264.
26. Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A: **Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases.** *World J Gastroenterol* 2011, **17**:1519-1528.
27. Wong JM, Jenkins DJ: **Carbohydrate digestibility and metabolic effects.** *J Nutr* 2007, **137**:2539S-2546S.

28. Lee YK, Mazmanian SK: **Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?** *Science* 2010, **330**:1768-1773.
29. Hawrelak JA, Myers SP: **The causes of intestinal dysbiosis: a review.** *Altern Med Rev* 2004, **9**:180-197.
30. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF: **Dysbiosis as a prerequisite for IBD.** *Gut* 2004, **53**:1057.
31. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, et al: **Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment.** *Genome Biol* 2012, **13**:R79.
32. Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB: **Impacts of gut bacteria on human health and diseases.** *Int J Mol Sci* 2015, **16**:7493-7519.
33. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R: **Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:11971-11975.
34. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI: **The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice.** *Sci Transl Med* 2009, **1**:6ra14.
35. Chapman-Kiddell CA, Davies PS, Gillen L, Radford-Smith GL: **Role of diet in the development of inflammatory bowel disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2010, **16**:137-151.
36. Simren M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BM, Spiller RC, Vanner S, Verdu EF, Whorwell PJ, Zoetendal EG, Rome Foundation C: **Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report.** *Gut* 2013, **62**:159-176.
37. Lepage P, Seksik P, Sutren M, de la Cochetiere MF, Jian R, Marteau P, Dore J: **Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD.** *Inflamm Bowel Dis* 2005, **11**:473-480.
38. Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furrer E, Fite A, Macfarlane S: **Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses.** *FEMS Microbiol Ecol* 2005, **54**:77-85.
39. Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese V, Calabrese E, Baumgart DC, Bettenworth D, Borralho Nunes P, et al: **ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications.** *J Crohns Colitis* 2019, **13**:144-164.
40. Sostegni R, Daperno M, Scaglione N, Lavagna A, Rocca R, Pera A: **Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity.** *Aliment Pharmacol Ther* 2003, **17 Suppl 2**:11-17.
41. Amaro F, Chiarelli F: **Growth and Puberty in Children with Inflammatory Bowel Diseases.** *Biomedicines* 2020, **8**.

42. Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR: **Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases.** *World J Gastroenterol* 2006, **12**:4819-4831.
43. Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G: **Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2015, **21**:1982-1992.
44. Mary JY, Modigliani R: **Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID).** *Gut* 1989, **30**:983-989.
45. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, Sostegni R, Rocca R, Pera A, Gevers A, et al: **Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD.** *Gastrointest Endosc* 2004, **60**:505-512.
46. Rogler G, Vavricka S, Schoepfer A, Lakatos PL: **Mucosal healing and deep remission: what does it mean?** *World J Gastroenterol* 2013, **19**:7552-7560.
47. Dal Buono A, Roda G, Argollo M, Peyrin-Biroulet L, Danese S: **Histological healing: should it be considered as a new outcome for ulcerative colitis?** *Expert Opin Biol Ther* 2020, **20**:407-412.
48. Lega S, Dubinsky MC: **What Are the Targets of Inflammatory Bowel Disease Management.** *Inflamm Bowel Dis* 2018, **24**:1670-1675.
49. Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lemann M, Colombel JF: **Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, **7**:15-29.
50. Peyrin-Biroulet L, Ferrante M, Magro F, Campbell S, Franchimont D, Fidder H, Strid H, Ardizzone S, Veereman-Wauters G, Chevaux JB, et al: **Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease.** *J Crohns Colitis* 2011, **5**:477-483.
51. Rutgeerts P, Van Assche G, Sandborn WJ, Wolf DC, Geboes K, Colombel JF, Reinisch W, Investigators E, Kumar A, Lazar A, et al: **Adalimumab induces and maintains mucosal healing in patients with Crohn's disease: data from the EXTEND trial.** *Gastroenterology* 2012, **142**:1102-1111 e1102.
52. Klenske E, Bojarski C, Waldner M, Rath T, Neurath MF, Atreya R: **Targeting mucosal healing in Crohn's disease: what the clinician needs to know.** *Therap Adv Gastroenterol* 2019, **12**:1756284819856865.
53. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, Adamina M, Armuzzi A, Bachmann O, Bager P, et al: **ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment.** *J Crohns Colitis* 2020, **14**:4-22.
54. Hommes D, Baert F, van Assche G, Caenepeel F, Vergauwe P, Tuynman H, De Vos M, van Deventer S, Stitt L, Rutgeerts P, et al: **Management of Recent Onset Crohn's Disease: A Controlled, Randomized Trial Comparing Step-up and Top-down Therapy.** *Gastroenterology* 2005, **129**:371.

55. Neurath MF, Travis SP: **Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review.** *Gut* 2012, **61**:1619-1635.
56. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ: **A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group.** *N Engl J Med* 1997, **337**:1029-1035.
57. Hiremath G, Duffy L, Leibowitz I: **Infliximab-induced psoriasis in children with inflammatory bowel disease.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011, **52**:230-232.
58. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P: **Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial.** *Lancet* 2002, **359**:1541-1549.
59. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, et al: **Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease.** *N Engl J Med* 1999, **340**:1398-1405.
60. Hyams JS, Lerer T, Griffiths A, Pfefferkorn M, Kugathasan S, Evans J, Otley A, Carvalho R, Mack D, Bousvaros A, et al: **Long-term outcome of maintenance infliximab therapy in children with Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2009, **15**:816-822.
61. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD, Pollack PF: **Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial.** *Gastroenterology* 2007, **132**:52-65.
62. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel JF, Panaccione R, D'Haens G, Li J, Rosenfeld MR, Kent JD, Pollack PF: **Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial.** *Ann Intern Med* 2007, **146**:829-838.
63. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh DG, Panaccione R, Wolf D, Kent JD, Bittle B, et al: **Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial.** *Gut* 2007, **56**:1232-1239.
64. Duranti S, Gaiani F, Mancabelli L, Milani C, Grandi A, Bolchi A, Santoni A, Lugli GA, Ferrario C, Mangifesta M, et al: **Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers.** *FEMS Microbiol Ecol* 2016, **92**.
65. Becker C, Neurath MF, Wirtz S: **The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease.** *ILAR J* 2015, **56**:192-204.
66. Knights D, Lassen KG, Xavier RJ: **Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome.** *Gut* 2013, **62**:1505-1510.
67. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D: **The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead.** *Gastroenterology* 2014, **146**:1489-1499.
68. Moutinho BD, Baima JP, Rigo FF, Saad-Hossne R, Rodrigues J, Romeiro FG, Sasaki LY: **Fecal microbiota transplantation in refractory ulcerative colitis - a case report.** *J Int Med Res* 2019, **47**:1072-1079.

69. Haiser HJ, Gootenberg DB, Chatman K, Sirasani G, Balskus EP, Turnbaugh PJ: **Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *eggerthella lenta***. *Science* 2013, **341**:295-298.
70. Ananthakrishnan AN, Luo C, Yajnik V, Khalili H, Garber JJ, Stevens BW, Cleland T, Xavier RJ: **Gut Microbiome Function Predicts Response to Anti-integrin Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Diseases**. *Cell Host Microbe* 2017, **21**:603-610 e603.
71. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF: **The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications**. *Gut* 2006, **55**:749-753.
72. Milani C, Casey E, Lugli GA, Moore R, Kaczorowska J, Feehily C, Mangifesta M, Mancabelli L, Duranti S, Turrone F, et al: **Tracing mother-infant transmission of bacteriophages by means of a novel analytical tool for shotgun metagenomic datasets: METAnnotatorX**. *Microbiome* 2018, **6**:145.
73. Yu T, Guo F, Yu Y, Sun T, Ma D, Han J, Qian Y, Kryczek I, Sun D, Nagarsheth N, et al: ***Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy**. *Cell* 2017, **170**:548-563 e516.