



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAMERINO
SCUOLA DI BIOSCIENZE E MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea in
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE
(CLASSE L-13)

ELABORATO SCRITTO

**Confronto tra i test diagnostici di routine nella caratterizzazione della
permeabilità intestinale, disbiosi e SIBO**

Laureanda
Chiara Romani
Chiara Romani

Tutor Unicam
Prof.ssa Dezemona Petrelli
Dezemona Petrelli

Tutor Aziendale
Dott. Michele Spina
Michele Spina
Dott. Matteo Agostini
Matteo Agostini

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 IL MICROBIOTA INTESTINALE	4
1.1.1 COMPOSIZIONE	5
1.1.2 FUNZIONI.....	8
1.2 PERMEABILITÀ INTESTINALE	13
1.2.1 STRUTTURA DELLA BARRIERA INTESTINALE	13
1.2.2 FATTORI CHE ALTERANO LA BARRIERA INTESTINALE	15
1.2.3 IMPLICAZIONI CLINICHE.....	16
1.3 DISBIOSI INTESTINALE.....	19
1.3.1 DEFINIZIONE.....	19
1.3.2 TIPOLOGIE.....	19
1.3.3 CAUSE PRINCIPALI DELLA DISBIOSI.....	20
1.3.4 SINTOMI	22
1.4 SIBO (SMALL INTESTINAL BACTERIAL OVERGROWTH)	23
1.4.1 DEFINIZIONE.....	23
1.4.2 CAUSE.....	23
1.4.3 SINTOMI	24
1.4.4 CONDIZIONI SIMILI: IMO, SIFO E LIBO.....	29
1.5 TEST DIAGNOSTICI	31
1.5.1 DISBIOSI TEST (INDICANO URINARIO)	31
1.5.2 ZONULINA: UN MARKER DI PERMEABILITÀ INTESTINALE.....	33
1.5.3 BREATH TEST AL GLUCOSIO PER DIAGNOSI DI SIBO.....	33
2. ESPERIENZA DI STAGE	36
3. MATERIALI E METODI.....	37
3.1 ESECUZIONE DEL DISBIOSI TEST (INDICANO URINARIO).....	37
3.2 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST ED ALTRE ANALISI DI LABORATORIO	38
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	39
4.1 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST-INDICANO E BREATH TEST AL GLUCOSIO	39
4.2 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST-INDICANO E ZONULINA SIERICA	41

4.3 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST-INDICANO E ZONULINA FECALE.....	43
4.4 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST-INDICANO E CANDIDA NELLE FECI.....	45
5. CONCLUSIONI.....	47
6. BIBLIOGRAFIA.....	48

1. INTRODUZIONE

1.1 IL MICROBIOTA INTESTINALE

Il microbiota intestinale è un ecosistema complesso e dinamico costituito da batteri, funghi e virus che colonizzano il tratto intestinale, in particolare il colon.

Questa comunità eterogenea di microrganismi svolge svariate funzioni per l'organismo, motivo per cui il microbiota funge da vero e proprio organo. La composizione del microbiota intestinale è influenzata dal genotipo dell'ospite, dall'ambiente e dalla dieta. L'equilibrio dell'ecosistema microbico intestinale è chiamato eubiosi, mentre un sistema in cui i microrganismi non coesistono più in reciproca armonia è descritto come disbiosi. Oltre alla presenza dei microrganismi, negli ultimi anni numerosi studi hanno approfondito l'analisi del microbioma, ovvero l'insieme del materiale genetico contenuto nel microbiota. In particolare, il progetto europeo MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) ha stimato che il microbioma intestinale umano codifica per circa 3 milioni di geni, un numero che supera di oltre 150 volte quello dei geni del genoma umano (1).

1.1.1 COMPOSIZIONE

La colonizzazione dell'intestino inizia immediatamente dopo la nascita ed è fondamentale per lo sviluppo del sistema immunitario e per l'omeostasi di un individuo. Lo sviluppo del microbiota è influenzato da diversi fattori, come ad esempio la tipologia di parto (vaginale o cesareo) e l'alimentazione iniziale. Il microbiota dei neonati allattati al seno mostra una prevalenza di batteri benefici, come i bifidobatteri, rispetto ai neonati allattati con latte artificiale. Con la fine dell'allattamento e l'introduzione di cibi solidi, si ha un aumento progressivo della diversità microbica fino al terzo anno d'età, in cui il microbiota del bambino assomiglia a quello di un adulto, anche se alcuni gruppi microbici raggiungono la loro concentrazione finale durante l'adolescenza.

Nel microbiota intestinale dell'adulto, il 90% dei batteri appartiene a 2 phylum: *Bacteroides* e *Firmicutes*. Il restante 10% comprende *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*. Sono presenti anche virus, in particolare batteriofagi (2).

Inoltre, troviamo funghi come *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*, che influenzano la salute dell'ospite grazie alle interazioni funghi-batteri, funghi-funghi e funghi-ospite (3).

Nella figura 1 è illustrata la componente batterica presente nell'intestino umano (4).

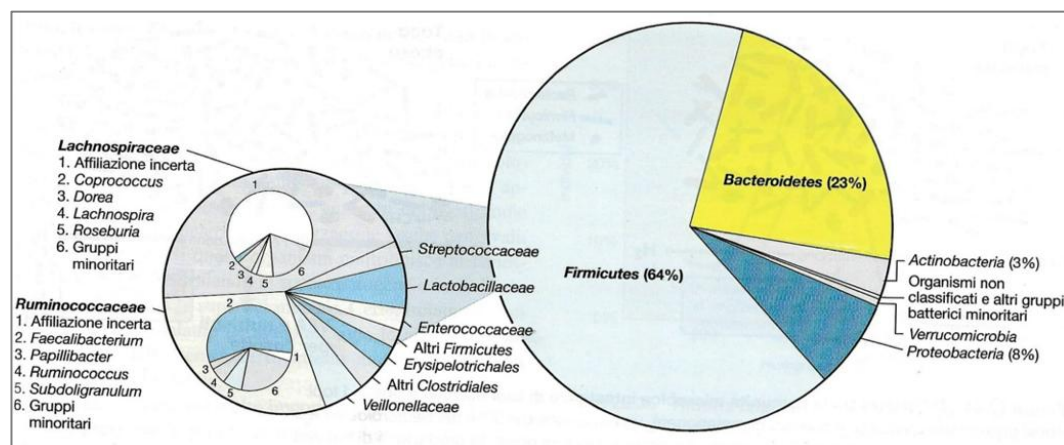


Figura 1 Componente batterica dell'intestino umano

La composizione del microbiota varia significativamente lungo il tratto gastrointestinale, la presenza di specifici microrganismi in un distretto piuttosto che in un altro riflette le caratteristiche fisiologiche di una data regione. (Figura 2)

Nell'intestino tenue c'è una ridotta presenza di microrganismi, poiché la crescita batterica è limitata da alte concentrazioni di acidi, ossigeno e antimicrobici, si ritiene che sopravvivano solo gli anaerobi facoltativi. Al contrario, le condizioni fisiologiche ed ambientali del colon permettono la presenza di una comunità densa e varia di batteri, principalmente anaerobi, che hanno la capacità di utilizzare le macromolecole non digerite nell'intestino tenue (5, 6).

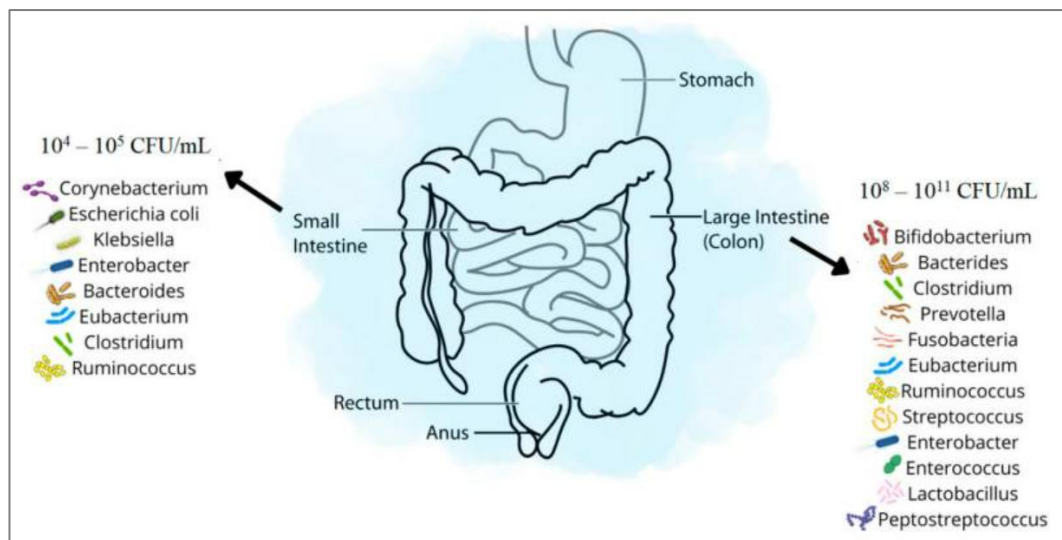


Figura 2 Distribuzione della comunità batterica lungo il tratto gastrointestinale

Il microbiota intestinale presenta delle variazioni anche lungo il suo diametro, con alcuni batteri che tendono a aderire sulla superficie mucosa, ed altri che sono più abbondanti nel lume. Ad esempio, i *Bacteroides* sembrano essere più abbondanti nei campioni fecali/luminali rispetto alla mucosa, mentre i *Firmicutes* sono maggiormente presenti nello strato di muco rispetto al lume. Questa diversità è influenzata dalla motilità intestinale che contribuisce a creare dei microambienti distinti (3, 5).

Uno studio condotto su topi privi di germi, colonizzati con un microbiota specifico, ha dimostrato che il muco esterno dell'intestino crasso rappresenta una nicchia microbica unica e che le specie batteriche presenti sul lume intestinale e sul muco presentano una diversa proliferazione ed un diverso utilizzo delle risorse.

Ciò dimostra quanto sia importante scegliere con cura il metodo di campionamento impiegato nell'analisi del microbiota, in quanto i campioni fecali/luminali potrebbero non evidenziare le comunità batteriche mucosali (5).

Ogni individuo presenta una composizione microbica unica, caratterizzata dalla presenza di ceppi specifici che non si trovano in altri individui. Nonostante ciò, nella struttura complessiva del microbiota, è possibile osservare dei modelli che si ripetono tra individui diversi, questi sono definiti enterotipi. Sono stati individuati 3 tipologie di enterotipi: enterotipo 1 caratterizzato dalla dominanza di *Bacteroides*, enterotipo 2 da *Prevotella* ed enterotipo 3 da *Ruminococcus*.

Durante la senilità, il microbiota intestinale inizia una fase di instabilità, infatti abbiamo la diminuzione dei livelli di alcuni microrganismi (ad esempio *Faecalibacterium prausnitzii*, che ha proprietà antinfiammatorie) e questo comporta una perdita della diversità microbica (2).

1.1.2 FUNZIONI

La popolazione dei microrganismi che compone il microbiota intestinale svolge funzioni metaboliche, strutturali e protettive per l'organismo.

Funzione Metabolica

Il microbiota intestinale è in grado di fermentare i residui di carboidrati e fibre alimentari che non vengono digeriti nel tratto digestivo superiore, che altrimenti non sarebbero digeriti ed assimilati dall'organismo.

Carboidrati

Oligosaccaridi, polisaccaridi non amidacei, zuccheri ed amido "resistente" vengono fermentati nell'intestino crasso attraverso diverse reazioni biochimiche, con la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), idrogeno, etanolo, succinato, anidride carbonica e metano.

I principali prodotti della fermentazione dei carboidrati sono gli acidi grassi a catena corta (SCFA), che sono delle molecole contenenti da 1 a 6 atomi di carbonio disposti in catene lineari o ramificate. Il 95% degli acidi grassi a catena corta è rappresentato da acetato, propionato e butirato, il cui rapporto molare è 60:25:15 ed è costante nelle varie regioni del colon (3).

Gli SCFA hanno diversi effetti benefici sulla salute dell'uomo. Una delle tante funzioni è quella di promuovere l'integrità e la permeabilità della barriera intestinale: il butirato è in grado di aumentare l'espressione di giunzioni strette come claudina-1, zonula occludens-1 e l'occludina, inoltre, è in grado di aumentare l'espressione della mucina 2 in modo da rafforzare lo strato di muco dell'epitelio intestinale e di prevenire lo sviluppo del cancro del colon attraverso l'induzione della differenziazione e dell'apoptosi dei colonciti (7).

Inoltre, gli SCFA hanno un ruolo nella regolazione del metabolismo del glucosio e dei lipidi, ad esempio il propionato inibisce la gluconeogenesi epatica promuovendo l'omeostasi energetica, mentre l'acetato riduce la lipogenesi ed aumenta la secrezione di leptina (7). Gli SCFA sono in grado di influenzare altre componenti della salute cardiometabolica: l'aumento di butirato e propionato sono associati ad

una riduzione della pressione sanguigna e dei livelli del plasminogeno-1 (PAI-1), riducendo così il rischio di trombosi (7).

Gli SCFA sono implicati anche nella regolazione del sistema immunitario e della risposta infiammatoria, essi stimolano la produzione di citochine come ad esempio l'IL-18, un'interleuchina coinvolta nel mantenimento e nella riparazione dell'integrità epiteliale (5).

Un ruolo importante è svolto anche nel sistema nervoso, infatti gli SCFA vanno ad inibire l'istone deacetilasi (HDAC) che genera un impatto su diverse malattie neuropsichiatriche come la depressione, la schizofrenia e l'Alzheimer, (7) oltre a ciò modula la secrezione enteroendocrina di serotonina (5-HT) e del peptide YY (PYY), un neuropeptide dell'asse intestino-cervello (8).

La concentrazione di SCFA cambia nel corso della vita, poiché è influenzata dalla composizione del microbiota intestinale, che varia in relazione all'età e alla tipologia di alimentazione (7).

Dalla fermentazione microbica abbiamo inevitabilmente la produzione di gas come idrogeno, anidride carbonica e metano, che vengono escreti attraverso la respirazione ed i flati. In particolare, si calcola che dalla fermentazione dei carboidrati venga prodotto un litro di idrogeno, il quale non viene escreto del tutto in quanto alcuni batteri sono in grado di riciclare l'idrogeno e trasformarlo in altri composti come metano, idrogeno solfato ed acetato (9).

Proteine

Il microbiota intestinale è in grado di convertire le proteine non digerite in peptidi più corti ed amminoacidi, attraverso proteinasi e peptidasi microbiche. Gli amminoacidi subiscono ulteriore fermentazione batterica, con formazione di metaboliti che possono avere effetti benefici per la salute. Ad esempio, dal metabolismo di amminoacidi aromatici come il triptofano si ha la produzione di indolo e derivati indolici che agiscono come modulatori della funzionalità gastrointestinale (10). L'indolo rafforza la barriera intestinale epiteliale attraverso l'aumento dell'espressione dei geni implicati nel mantenimento della struttura, mentre alcuni derivati indolici come l'aldeide-3-indolo (IAld) legano il recettore AHR (recettore degli idrocarburi arilici presente nelle cellule immunitarie

intestinali) promuovendo la produzione di IL-22, una citochina implicata nella limitazione dell'infiammazione e nel mantenimento dell'integrità della mucosa (11). Dal metabolismo delle proteine ad opera del microbiota intestinale possono svilupparsi composti potenzialmente tossici come la trimetilammina, generata a partire dalla carnitina e dalla colina introdotte con l'alimentazione; questa nel fegato viene convertita in ossido di trimetilammina (TMAO) la cui elevata presenza è un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari (2).

Acidi Biliari

Il microbiota intestinale è in grado di modificare la struttura e le proprietà della piccola percentuale di acidi biliari, sfuggita alla circolazione enteroepatica, che si trova nel colon. Alcune specie batteriche, come quelle appartenenti ai generi *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium*, attraverso l'utilizzo di enzimi BSH (bile salt hydrolases), idrolizzano il legame ammidico tra l'acido biliare ed il suo amminoacido coniugato (glicina o taurina). Questo processo va a ridurre la tossicità degli acidi biliari e produce atomi di azoto, zolfo e carbonio, indispensabili per i batteri (9). Gli acidi biliari che sono stati deconiugati possono subire ulteriori modifiche da parte di batteri come *Eubacterium* e *Clostridium*, attraverso la rimozione del gruppo ossidrilico in C7, trasformano l'acido chenodesossicolico (CDCA) e l'acido colico (CA) rispettivamente negli acidi biliari secondari, acido litocolico (LCA) e acido desossicolico (DCA). Questi acidi biliari secondari sono tossici ed associati al cancro del colon retto e alla formazione di calcoli biliari da colesterolo (9) e vengono detossificati da altri batteri che, ad esempio, convertono il CDCA in UCDA (acido ursodesossicolico) cambiando l'orientamento del gruppo ossidrilico 7 α in 7 β (9). Gli acidi biliari sono anche molecole di segnalazione: legandosi ai recettori FXR (Farnesoid X receptor) e TGR5 (G protein-coupled bile acid receptor 1) regolano il metabolismo dei lipidi, del glucosio e l'omeostasi energetica (9).

Vitamine

Il microbiota intestinale ha la capacità di sintetizzare la vitamina K e le vitamine del gruppo B, come la biotina (B7), cobalamina (B12), folati (B9), niacina (B3),

acido pantotenico (B5), piridossina (B6), riboflavina (B2) e tiamina (B1). Ci sono diversi studi che dimostrano come il microbiota intestinale abbia un ruolo fondamentale nella produzione di vitamina K. In uno studio condotto su topi privi di germi si è visto che quelli senza un integratore alimentare di vitamina K avevano bassi livelli di protrombina e sviluppano emorragie, mentre i topi con microbiota avevano livelli normali di protrombina e una normale attività di coagulazione. Inoltre, uomini che seguivano una dieta con basso contenuto di vitamina K non sviluppavano carenza vitaminica, mentre quelli trattati con antibiotici ad ampio spettro avevano una diminuzione dei livelli di protrombina. È stato osservato che la capacità del microbiota intestinale di produrre vitamine dipende dallo stato di salute dell'ospite, ad esempio persone affette da IBD (inflammatory bowel disease), malnutrizione e diabete mellito di tipo 2 presentano una riduzione della produzione endogena di vitamine (12).

Funzione Strutturale

Dal punto di vista strutturale il microbiota partecipa attivamente al modellamento e al mantenimento della mucosa intestinale. Alcuni batteri commensali, come *Bacteroides thetaiotaomicron*, inducono l'espressione della sprrA (small proline-rich protein 2), una proteina coinvolta nel mantenimento della stabilità dei desmosomi dei villi intestinali, mentre *Lactobacillus rhamnosus* GG secerne due proteine, p40 e p75, che prevengono l'apoptosi delle cellule epiteliali. Il microbiota intestinale contribuisce anche allo sviluppo della microvascolatura intestinale, inducendo la trascrizione dell'angiogenina-3, inoltre il microbiota è coinvolto nella glicosilazione del muco creando dei siti di adesione per i microbi. Oltre a garantire l'integrità strutturale dell'epitelio intestinale, il microbiota svolge anche un ruolo nella regolazione del sistema immunitario: studi condotti su animali privi di germi, hanno dimostrato che l'assenza di microbi determina una minore densità delle cellule linfoidi associate alle mucose ed una ridotta produzione di immunoglobuline. Al contrario, l'interazione continua con microbi commensali promuove l'aumento del numero dei linfociti delle mucose ed un significativo aumento delle immunoglobuline nel siero (3).

Funzione Protettiva

Il microbiota intestinale presenta anche un'attività di protezione nei confronti dei batteri potenzialmente patogeni; infatti, è in grado di alterare il pH dell'intestino rendendolo inospitale per molti patogeni, inoltre attraverso la produzione di sostanze antimicrobiche e la sottrazione di nutrienti ne inibiscono la loro crescita. Il microbiota intestinale contribuisce al mantenimento dell'integrità della barriera mucosa, che serve a proteggere l'organismo dai residui dell'alimentazione e da secrezioni organiche come saliva, bile, succo gastrico e pancreatico. La mucosa intestinale è la seconda superficie più ampia nell'organismo umano, dopo quella respiratoria, presenta una superficie di 250-400 m² ed ha un ruolo di difesa nei confronti di antigeni e patogeni che arrivano a contattarla o ad attraversarla. Il suo principale meccanismo di difesa è il MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue), cioè il tessuto linfoide associato alle mucose, in particolare il GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue), ovvero la componente intestinale del MALT, è responsabile dell'attivazione del sistema immunitario specifico, che attua una risposta contro patogeni ed antigeni estranei. Per mantenere una convivenza equilibrata con il microbiota, l'intestino deve sorvegliarlo costantemente, controllando il numero e la composizione attraverso i meccanismi dell'immunità innata e adattativa. Le cellule intestinali usano recettori specializzati, chiamati PRR (Pattern Recognition Receptors), per riconoscere e legare i componenti tipici dei microrganismi MAMP (Microbial Associated Molecular Patterns), come lipopolisaccaridi, flagellina, peptidoglicani e peptidi formilati. I PRR comprendono i Toll-like receptors (TLR), situati sulla membrana cellulare, che monitorano l'ambiente extracellulare ed i NOD-like receptors (NLR) che agiscono nel citoplasma, dove rilevano segnali di pericolo provenienti dall'interno della cellula. Altri PRR includono le RIG-like elicasi, che rilevano materiale genetico virale, e i recettori lectinici di tipo C, coinvolti nel riconoscimento di componenti fungini. I recettori peptidici formilati, espressi principalmente nei neutrofili, sono recettori transmembrana che identificano i prodotti derivati dalla parete cellulare dei batteri come i peptidi formilati (3).

1.2 PERMEABILITÀ INTESTINALE

1.2.1 STRUTTURA DELLA BARRIERA INTESTINALE

La barriera intestinale rappresenta l'interfaccia tra l'ambiente interno ed esterno, è essenziale per regolare lo scambio di sostanze, mantenere l'equilibrio immunologico e proteggere l'organismo da agenti patogeni. La barriera intestinale è composta da quattro componenti:

1. **BARRIERA MICROBICA:** situata nel lume intestinale è composta da batteri commensali, che competono con i patogeni e modulano la funzione della barriera
2. **BARRIERA BIOCHIMICA:** è costituita dal muco, la cui funzione è rivestire le cellule epiteliali e proteggerle dagli effetti dannosi dei microrganismi patogeni e dalle sostanze tossiche; è composto per il 98% di acqua, mucine, glicoproteine, IgA e sostanze antimicrobiche. Il muco varia lungo il tratto intestinale, ad esempio nell'intestino tenue forma uno strato sottile e discontinuo, che facilita l'assorbimento dei nutrienti, mentre nell'intestino crasso ha due strati, uno strato interno in cui non sono presenti batteri ed uno strato di muco esterno che separa fisicamente il lume intestinale dall'epitelio; questi strati limitano l'ingresso del microbiota al lato apicale dell'epitelio e forniscono protezione
3. **BARRIERA FISICA:** è costituita da un singolo strato di cellule specializzate e polarizzate come enterociti, cellule caliciformi mucipare, cellule di Paneth, cellule M, che si rinnovano ogni 3-5 giorni. Queste cellule contengono i pattern dei recettori di riconoscimento (PRR), come i recettori Toll-like (TRL), che identificano i cosiddetti PAMP (Pattern Molecolari Associati ai Patogeni) dei segnali tipici di batteri o virus. Quando questi recettori vengono attivati le cellule producono citochine, chemochine ed antimicrobici.
4. **BARRIERA IMMUNITARIA:** è caratterizzata dalla presenza di tessuto linfoide associato all'intestino (GALT), che si trova direttamente sotto le cellule epiteliali, nella lamina propria ed è costituito da linfociti T, linfociti B, macrofagi, mastociti e granulociti (13, 14).

Affinché le cellule formino l'epitelio intestinale, devono aderire alla membrana per mezzo di giunzioni intercellulari. Queste giunzioni vengono classificate in tre gruppi: giunzioni serranti (Tight Junctions), giunzioni aderenti (Adherens Junctions) e giunzioni comunicanti (Gap Junctions). Le giunzioni serranti sono formate dall'assemblaggio di più proteine situate nella parte apicale dell'epitelio tra cellule vicine, come occludina, tricellulina e zonula occludens, la loro funzione è quella di mantenere la polarità cellulare e limitare il passaggio di ioni e soluti. La regolazione delle giunzioni serranti è complessa ed è svolta da alcune proteine, come le protein chinasi C, A e G. Le giunzioni aderenti regolano l'adesione tra le cellule adiacenti attraverso molecole di adesione transmembrana delle catenine e dei complessi proteici associati al citoscheletro di actina, mentre le giunzioni comunicanti (composte da sei proteine transmembrana dette connesine) consentono la comunicazione tra le cellule (13).

Esistono quattro vie principali secondo cui le sostanze presenti nel lume possono passare attraverso l'epitelio intestinale, la scelta di una di queste vie dipende dalle dimensioni, dall'idrofobicità e dalle proprietà chimico-fisiche delle molecole che attraversano l'epitelio. Nella via transcellulare passiva si ha il passaggio per diffusione di molecole idrofiliche di piccole dimensioni e di composti idrofobici, secondo gradiente di concentrazione e senza dispendio di energia, mentre per il passaggio di nutrienti come zuccheri, amminoacidi e vitamine c'è bisogno di un trasporto attivo modulato da trasportatori specifici, con dispendio di energia; invece i grandi peptidi, le componenti batteriche ed i batteri attraversano l'epitelio intestinale mediante l'endocitosi. Nella via paracellulare si ha il passaggio di ioni, acqua e composti idrofilici di dimensioni dai 400-600 Da fino ai 10-20 KDa, attraverso la presenza delle Tight Junctions, che ne modulano il passaggio tramite la formazione di due classi di pori: i pori selettivi ad alta capacità, permeabili a piccoli ioni e piccole molecole non cariche, regolati dalle molecole della famiglia delle Claudine, e pori molto più grandi a bassa capacità, permeabili a grandi ioni e molecole indipendentemente dalla carica, regolati dalle proteine appartenenti alle famiglie delle zonula occludens. Il ruolo delle Tight Junctions in questa via è quella di regolare la diffusione paracellulare di sostanze consentendo solo il passaggio di determinate molecole (15).

1.2.2 FATTORI CHE ALTERANO LA BARRIERA INTESTINALE

Esistono diversi fattori che possono compromettere in modo definitivo o transitorio l'integrità della barriera intestinale, provocando così un aumento della permeabilità, questi fattori possono essere la dieta, lo stile di vita e lo stress. Uno studio condotto su topi esposti ad una dieta ricca di grassi ha mostrato che, l'assunzione prolungata di grassi alimentari, compromette la barriera intestinale in quanto provoca stress del reticolo endoplasmatico nelle cellule epiteliali intestinali e una ridotta espressione di *claudina-1*, con conseguente aumento dei livelli sierici di endotossine e disbiosi intestinale (16, 17). Allo stesso modo, Devkota e colleghi hanno dimostrato che, l'aumentata disponibilità di acido biliare taurocolico, in seguito al consumo di grassi saturi, promuove la crescita del patobionte *Bilophila wadsworthia*, che è stato in grado di destabilizzare l'epitelio intestinale dei topi geneticamente suscettibili di *Il-10^{-/-}* (16, 18). Al contrario nutrienti come la vitamina D stimolano l'espressione delle proteine *zonula occludens-1* e *claudina-1* svolgendo così un ruolo di protezione nei confronti della barriera intestinale (19). La dieta povera di fibre è stata evidenziata, invece, come stimolo per l'espansione di cloni di batteri come *Akkermansia muciniphila* e *Bacteroides caccae*, i quali degradano il muco rendendo la barriera intestinale meno spessa, in quanto viene a mancare proprio lo strato di muco posto tra il lume e l'epitelio, con un rischio maggiore di contrarre coliti infettive (20). Abitudini come il consumo di alcool vanno ad alterare la permeabilità paracellulare a causa di alterazioni della localizzazione di *occludina* e *zonula occludens*, allo stesso modo anche l'uso di antibiotici va ad aumentare la permeabilità intestinale riducendo l'espressione di *zonula occludens*, *occludina* e *claudina-1* (16).

Lo stress è un fattore capace di influenzare negativamente l'integrità della barriera intestinale, attraverso l'asse intestino-cervello. La maggior parte degli studi sugli effetti meccanicistici dello stress sulla barriera intestinale sono stati condotti su modelli animali utilizzando fattori di stress fisici e psicologici ad esempio stress da rumore, stress da calore e privazione materna; in questi modelli la disfunzione della barriera intestinale è stata associata all'attivazione dell'asse fattore di rilascio corticotropo (CRF)-mastociti. Il rilascio dell'ormone CRF sia a livello sistemico che periferico altera la composizione del muco intestinale, influenza la secrezione

di acqua e ioni e aumenta la permeabilità paracellulare dell'epitelio. Sebbene più limitati rispetto ai modelli animali, anche alcuni studi sull'uomo supportano il ruolo dello stress nella disfunzione della barriera intestinale, in particolare in uno studio condotto su volontari sani, sottoposti ad un test pubblico del linguaggio, si è osservato un aumento della permeabilità intestinale in quei soggetti che presentavano un elevato livello di cortisolo salivare. Un'altra forma di stress particolarmente rilevante è lo stress da esercizio fisico intenso, che combina componenti fisiche e psicologiche. Gli atleti soffrono spesso di disturbi gastrointestinali che sono indotti dal rilascio degli ormoni dello stress, dall'aumento della temperatura corporea e dai cambiamenti microbici durante l'attività fisica intensa; questi fattori causano l'allentamento delle Tight Junctions (21).

Anche le infezioni batteriche rappresentano un ulteriore fattore di rischio, ad esempio *Salmonella typhimurium* sovraregola l'espressione di *claudina-2* aumentando la permeabilità intestinale e facilitando così l'invasione batterica; *Vibrio cholerae*, invece, produce la tossina zonula occludens (ZOT) che induce un'apertura transitoria delle Tight Junctions attraverso una riorganizzazione dell'actina C-dipendente della proteina chinasi (16).

1.2.3 IMPLICAZIONI CLINICHE

Dopo aver analizzato i principali fattori che compromettono la barriera intestinale, è fondamentale esplorare le conseguenze che tale disfunzione può avere a livello sistemico. Un'alterata permeabilità intestinale consente la traslocazione di batteri e prodotti microbici al di fuori del lume intestinale, determinando l'attivazione del sistema immunitario e l'innescare di processi infiammatori in sedi extra intestinali. I patogeni intestinali sono spesso sovrarappresentati nel microbiota dei pazienti con disturbi infiammatori, dove accelerano l'infiammazione sistemica traslocando attraverso la barriera epiteliale per raggiungere il tessuto extra intestinale. Un esempio di patogeni è l'*Enterococcus gallinarum*, il quale si trova frequentemente nel fegato di pazienti con lupus eritematoso sistemico. In uno studio condotto su topi affetti da lupus eritematoso, si è visto che la colonizzazione da parte di *Enterococcus gallinarum* ha provocato disfunzione della barriera intestinale e traslocazione batterica al fegato con incremento della produzione di autoanticorpi,

attraverso l'aumentata espressione di autoantigeni epatici (22). Un'ulteriore evidenza del legame tra microbiota e infiammazione sistemica deriva dal coinvolgimento di batteri orali nella disfunzione della barriera intestinale, in particolare, in caso di disbiosi orale e uso di inibitori della pompa protonica, si ha la traslocazione di batteri autoctoni orali nell'intestino. Tra questi troviamo *Porphyromonas gingivalis* che può predisporre gli ospiti all'infiammazione sistemica. È stato dimostrato che la sua somministrazione su topi altera la composizione del microbiota e sopprime l'espressione di proteine correlate a Tight Junctions, favorendo così la traslocazione batterica sistemica (22, 23).

Nella figura 3 si può osservare come la disbiosi e la sindrome dell'intestino permeabile (Leaky gut syndrome) influenzino la risposta autoimmune. Il microbiota intestinale in eubiosi ha il compito di rinforzare la barriera epiteliale e regolare la risposta immunitaria attraverso la mucosa intestinale, mantenendo una relazione simbiotica nell'intestino. Fattori come una dieta ricca di zuccheri e grassi saturi e terapie antibiotiche croniche causano disbiosi che compromette la funzione della barriera intestinale e suscita una risposta proinfiammatoria inadeguata con produzione di citochine che allentano le Tight junctions. La sindrome dell'intestino permeabile genera un movimento "inadeguato" di molecole biologicamente attive nel sistema circolatorio provocando una risposta immunitaria contro il self (22).

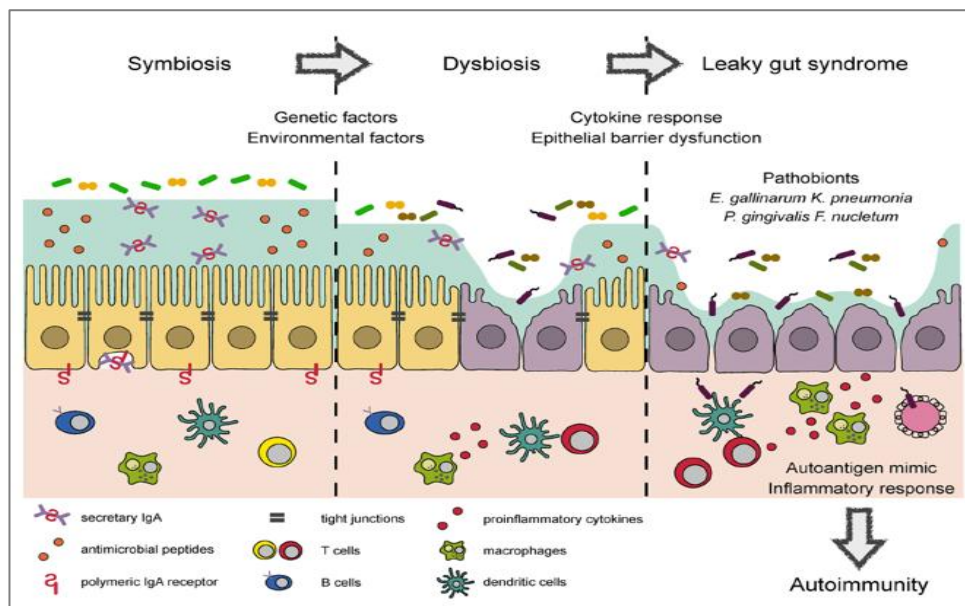


Figura 3 Traslocazione batterica causata dalla sindrome dell'intestino permeabile

La perdita dell'integrità della barriera intestinale ha effetti anche sul piano metabolico e cardiovascolare; infatti, in presenza di disbiosi e permeabilità intestinale il lipopolisaccaride (LPS) può attraversare la barriera intestinale e traslocare nel sistema circolatorio innescando una endotossiemia di basso grado (24). Il lipopolisaccaride (LPS) è un componente della membrana esterna dei batteri gram-negativi, comprende tre regioni covalentemente connesse: il lipide A, un nucleo oligosaccaridico e una catena laterale O. La sua tossicità risiede nello strato più interno, il lipide A, che è composto da catene aciliche grasse collegate a due residui di N-acetil glucosamina (25). Una disfunzione della barriera intestinale causa la traslocazione del LPS nel flusso sanguigno, dove viene trasportato legato alla proteina legante l'LPS (LBP) ed interagisce con i recettori di superficie delle cellule immunitarie TLR4 (Toll-like receptor 4) avviando una risposta infiammatoria. (Figura 4) L'attivazione dei recettori TLR4 porta al reclutamento del complesso MyD88 con attivazione di NF- κ B che si traduce in un aumento della trascrizione di citochine proinfiammatorie come TNF α , IL-1 β e IL-6. Tutto ciò causa un aumento dell'infiammazione; ad esempio nel fegato si ha un aumento della resistenza all'insulina e alla lipogenesi con conseguente steatosi epatica mentre a livello cardiovascolare si ha aterogenesi (26).

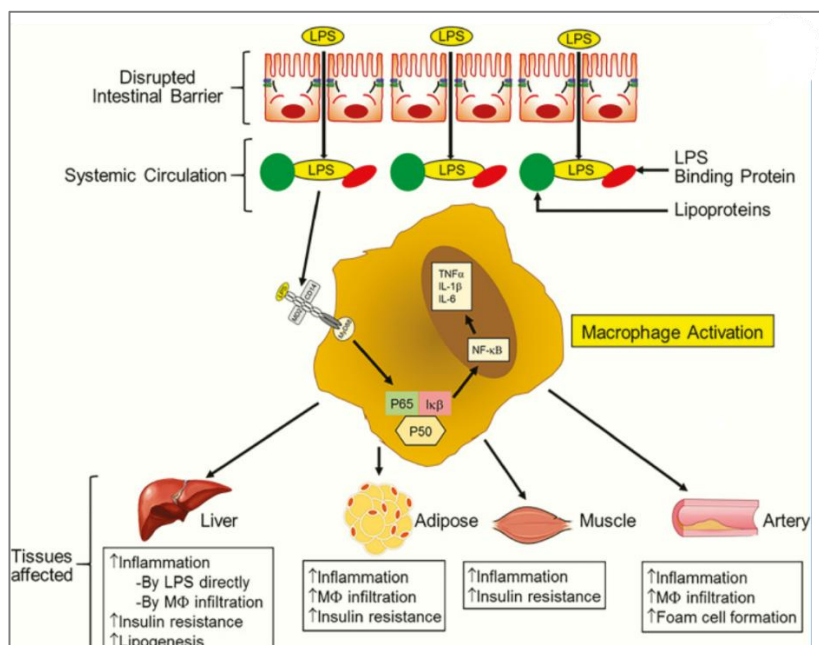


Figura 4 Meccanismo di traslocazione dell'LPS

1.3 DISBIOSI INTESTINALE

1.3.1 DEFINIZIONE

Con il termine disbiosi intestinale si intende uno squilibrio del microbiota che si verifica nel momento in cui viene persa la relazione mutualistica tra microbi, prodotti metabolici e sistema immunitario. Quando si verifica la disbiosi si può osservare una perdita della diversità del microbiota intestinale con una crescita eccessiva di patobionti, ovvero ceppi batterici normalmente innocui ma che, in condizioni alterate, possono diventare dannosi (27).

1.3.2 TIPOLOGIE

Nonostante il 40% dei geni del microbiota è comune alla metà della popolazione, la composizione specifica del microbiota varia sia tra individui diversi (variabilità inter-individuale), sia all'interno dello stesso individuo nel tempo (variabilità intra-individuale), rendendo difficile la definizione di un microbiota sano. Per questo motivo la disbiosi non è una condizione unica e può manifestarsi in diverse forme. È possibile individuare cinque diverse tipologie di disbiosi:

- **DISBIOSI DA DEFICIT:** caratterizzata da una riduzione di specie batteriche benefiche, come i *lattobacilli* ed i *bifidobatteri*, può verificarsi a causa di diete non salutari o terapie antibiotiche, può essere associata ad intolleranze alimentari conseguenti ad una carenza di enzimi digestivi (intolleranza al lattosio)
- **DISBIOSI PUTREFATTIVA:** caratterizzata da un aumento dei batteri putrefattivi (come i *Bacteroides*) la cui metabolizzazione può portare alla produzione di sostanze tossiche (ammoniaca, ammine e fenoli), può verificarsi a causa di diete ricche di grassi, carne e povera di fibre
- **DISBIOSI FERMENTATIVA:** caratterizzata da un'eccessiva fermentazione batterica nell'intestino tenue, può verificarsi a causa di diete ricche di zuccheri semplici e carboidrati

- DISBIOSI DA SUSCETTIBILITÀ: caratterizzata da una perdita di tolleranza da parte del sistema immunitario nei confronti del microbiota intestinale, è dovuta a cause genetiche
- DISBIOSI FUNGINA: caratterizzata dalla crescita eccessiva di *Candida* o di altri lieviti, è dovuta a diete ricche di zuccheri semplici, carboidrati raffinati e povera di fibre (27)

1.3.3 CAUSE PRINCIPALI DELLA DISBIOSI

Diversi fattori intrinseci ed estrinseci contribuiscono allo sviluppo di disbiosi intestinale, che può manifestarsi con alterazioni sia nella composizione che nella funzionalità del microbiota. Le alterazioni indotte possono essere transitorie e reversibili oppure persistenti ed irreversibili, questi cambiamenti dipendono sia dalla durata e dall'intensità del fattore scatenante, sia dalla composizione del microbiota intestinale dell'ospite (28).

FATTORI INTRINSECI

Tra i principali fattori intrinseci troviamo la genetica, l'età dell'ospite e la presenza di malattie intestinali. La genetica gioca un ruolo importante nella determinazione della composizione del microbiota: studi di associazione sull'intero genoma (29) suggeriscono che la genetica dell'ospite, in particolare le varianti associate al sistema immunitario, potrebbero avere un ruolo nel determinare la composizione del microbiota intestinale, favorendo la colonizzazione di determinati taxa microbici e ostacolando altri.

Un altro fattore intrinseco è l'invecchiamento in cui si ha una riduzione dei batteri associati alla salute, come i batteri produttori di SCFA, ed un aumento dei batteri opportunisti: questo squilibrio può portare ad un aumento della suscettibilità alle infezioni e ad uno stato di infiammazione cronica di basso grado (28).

Inoltre, alcune condizioni patologiche gastrointestinali come IBD (inflammatory bowel disease), IBS (irritable bowel syndrome) e celiachia possono aumentare la sensibilità di un individuo alla disbiosi; ad esempio, i pazienti con IBD presentano una riduzione dei livelli di specie associate alla salute come *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia intestinalis* ed un aumento dei livelli di batteri patogeni

come *Bacteroides fragilis* ed *E. coli*; allo stesso modo nei pazienti con IBS si nota una diminuzione di microbi benefici tra cui i generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* ed un aumento di batteri patogeni come *E. coli* ed *Enterobacter*. Nonostante ciò, non è ancora chiaro se la disbiosi sia una causa o una conseguenza di questi disturbi (28).

FATTORI ESTRINSECI

Oltre ai fattori intrinseci, è presente un'ampia gamma di fattori estrinseci come, ad esempio, la tipologia di dieta e l'utilizzo di antibiotici. Da un punto di vista clinico gli antibiotici ad ampio spettro alterano il microbiota intestinale, provocando un aumento di Gammaproteobatteri endogeni (ad esempio *Enterobacteriaceae*) o *Bacilli* (ad esempio *Enterococcus faecalis*). In uno studio condotto agli inizi degli anni 50, è stato osservato che, i topi che venivano trattati con streptomina (un antibiotico) seguita dalla somministrazione esogena di *Enterobacteriaceae* commensale o patogena, mostravano una perturbazione del microbiota con una diminuzione degli SCFA accompagnata da un aumento del potenziale redox del lume intestinale. La deplezione degli SCFA genera due distinti cambiamenti nella fisiologia dell'ospite: il primo cambiamento è dovuto alla perdita di segnalazione epiteliale attraverso il PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), un recettore nucleare che, in assenza di SCFA, non viene attivato causando così un aumento di ossigeno e nitrati nello strato di muco, mentre un secondo cambiamento è dovuto ad una riduzione delle cellule T regolatorie e ciò innesca un'inflammation a basso grado della mucosa. L'insieme di questi due cambiamenti nella fisiologia dell'ospite permette una maggiore diffusione di ossigeno nel lume del colon, creando così un ambiente favorevole alla dominanza di batteri anaerobi facoltativi come *E.coli* (30).

Un altro fattore estrinseco di fondamentale importanza è l'alimentazione: diete occidentali caratterizzate da un elevato apporto di grassi saturi e zuccheri semplici sono associate ad un'alterazione del microbiota, in particolare ad una diminuzione del rapporto *Bacteroidota/Bacillota* con aumenti delle popolazioni di enterobatteri, come *E.coli*, *Klebsiella spp.* e *Proteus spp.*, che sono spesso osservati nei casi di disbiosi intestinale. Al contrario la dieta mediterranea e vegetariana ha effetti

benefici sulla salute intestinale: l'assunzione di alimenti come frutta, verdura, legumi, olio extravergine d'oliva e pesce azzurro, oltre a favorire un aumento del rapporto *Bacteroidota/Bacillota*, contribuisce anche all'abbassamento del pH intestinale e ad una maggiore produzione di SCFA da parte del microbiota, impedendo così la crescita di batteri potenzialmente patogeni, come *E. coli*. Inoltre, anche il tipo di acidi grassi consumati ha un impatto rilevante: l'assunzione di acidi grassi polinsaturi omega-3, caratteristici di una dieta mediterranea, sono associati ad un aumento dell'abbondanza di *Lactobacillus*, mentre gli omega-6 sono correlati alla diminuzione di *Bifidobacterium*. Le alterazioni del microbiota dovute ad una dieta squilibrata possono avere delle conseguenze importanti sulla funzione della barriera intestinale, infatti, in presenza di disbiosi, si riduce l'espressione di proteine fondamentali nel mantenimento delle giunzioni strette intestinali, aumentando così la permeabilità intestinale. Di conseguenza, sostanze come i lipopolisaccaridi (LPS), componenti della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, possono attraversare la barriera ed entrare nel flusso sanguigno. Questo fenomeno può innescare una risposta infiammatoria sistemica cronica, nota come endotossemia metabolica, che rappresenta un importante fattore di rischio per lo sviluppo di patologie croniche e disturbi metabolici (31).

1.3.4 SINTOMI

La disbiosi può manifestarsi con sintomi diversi a seconda della gravità dello squilibrio microbico; pur avendo il tratto gastrointestinale come principale bersaglio oltre ai sintomi gastrointestinali possono manifestarsi anche sintomi sistemici che interessano altre parti del corpo. I disturbi gastrointestinali più comunemente associati alla disbiosi includono: dolore addominale, gonfiore addominale, flatulenza, diarrea o costipazione (27). Tra i sintomi sistemici troviamo fatica cronica, senso di malessere generale, dolori muscolari ed articolari, tra i sintomi neuro-psicologici rientrano ansia e depressione; ciò è dovuta al fatto che la disbiosi intestinale può influenzare la produzione di neurotrasmettitori e altre molecole che regolano l'umore, come la serotonina (32).

1.4 SIBO (SMALL INTESTINAL BACTERIAL OVERGROWTH)

1.4.1 DEFINIZIONE

Con il termine SIBO (small intestinal bacterial overgrowth) si intende una crescita di batteri aerobi ed anaerobi pari o superiore a 10^5 CFU/ml nell'intestino tenue, che di solito contiene poche popolazioni batteriche. I batteri tipicamente presenti sono colon-specifici, prevalentemente aerobi gram-negativi e specie anaerobiche, che fermentano i carboidrati producendo gas (come l'idrogeno), tra questi troviamo *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (33).

1.4.2 CAUSE

La SIBO si sviluppa quando i meccanismi omeostatici, che controllano le popolazioni batteriche dell'intestino tenue, vengono interrotti; i principali meccanismi che predispongono alla SIBO sono: ridotta secrezione di acido gastrico, alterazione della motilità dell'intestino tenue, anomalie strutturali del tratto gastrointestinale e disturbi della funzione immunitaria intestinale (34).

L'acido gastrico svolge un ruolo protettivo fondamentale sopprimendo la crescita dei batteri ingeriti, limitando così la colonizzazione dell'intestino tenue superiore. La ridotta secrezione di acido gastrico (ipocloridria) aumenta il rischio di SIBO, le cause che riducono la secrezione di acido gastrico sono ad esempio l'invecchiamento, la colonizzazione da parte di *Helicobacter pylori* ed anche l'utilizzo di farmaci inibitori di pompa protonica (PPI) o farmaci bloccanti il recettore dell'istamina di tipo 2 (H2RA). In uno studio su venti pazienti trattati per quattro settimane con omeprazolo (inibitore di pompa protonica) si è visto un aumento significativo della conta batterica duodenale mediante l'aspirato endoscopico (34, 35).

La motilità intestinale svolge un ruolo cruciale nella prevenzione della SIBO, grazie a meccanismi come il complesso motorio migrante (MMC) che, durante il digiuno, spazza via i detriti residui attraverso il tratto gastrointestinale. La peristalsi gastrica compromessa può portare a SIBO a causa della stasi del cibo e dei batteri nel tratto gastrointestinale superiore (34).

Le anomalie anatomiche del tratto gastrointestinale possono creare un ambiente favorevole per la colonizzazione batterica e la crescita eccessiva. Interventi chirurgici come bypass digiunoileali possono predisporre alla SIBO, anche la resezione della valvola ileocecale può predisporre a SIBO e in quanto dopo l'intervento chirurgico può verificarsi facilmente il movimento retrogrado dei batteri dal colon all'intestino tenue. Uno studio condotto su pazienti con morbo di Crohn ha riscontrato che la resezione della valvola ileocecale ha aumentato la prevalenza della SIBO dal 18% al 30% (34, 36).

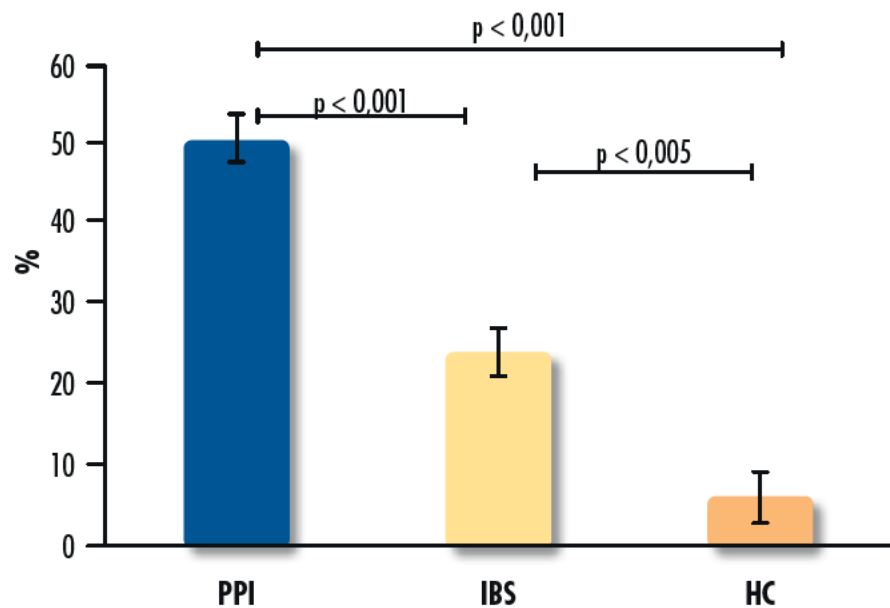
Nel campo della nutrizione diversi studi hanno analizzato il legame tra alimentazione e SIBO. In uno studio condotto su 60 persone con obesità e 60 persone normopeso è stato osservato che, nelle persone obese con dieta ricca di carboidrati e zuccheri, la prevalenza di SIBO era del 23,3% rispetto alle persone normopeso, con dieta ricche di fibre, la cui percentuale era del 6,6%; tuttavia questo studio non chiarisce se la SIBO sia una conseguenza della dieta o dell'obesità (37, 38).

Altri studi hanno cercato di correlare la composizione corporea e i parametri antropometrici con la produzione di gas specifici indicativi di SIBO, uno di questi studi ha scoperto che parametri come peso corporeo, IMC e grasso corporeo potrebbero essere inversamente correlati con la produzione di idrogeno nei pazienti con SIBO (37, 39).

1.4.3 SINTOMI

I sintomi della SIBO possono variare notevolmente in base alla gravità dell'alterazione intestinale e alla presenza di malattie primarie. In alcuni casi la SIBO può essere asintomatica o può manifestarsi con dei sintomi aspecifici e sovrapponibili alla sindrome dell'intestino irritabile (IBS) come gonfiore, flatulenza, dolore addominale e diarrea. Nei casi più gravi si possono manifestare segni di malassorbimento (perdita di peso, malnutrizione), lesione epatica, manifestazioni cutanee (rosacea) e sindromi da carenza (polineuropatia da carenza di vitamina B12, tetania nell'ipocalcemia indotta da carenza di vitamina D). I livelli sierici di folato sono generalmente normali, la concentrazione di vitamina K sierica

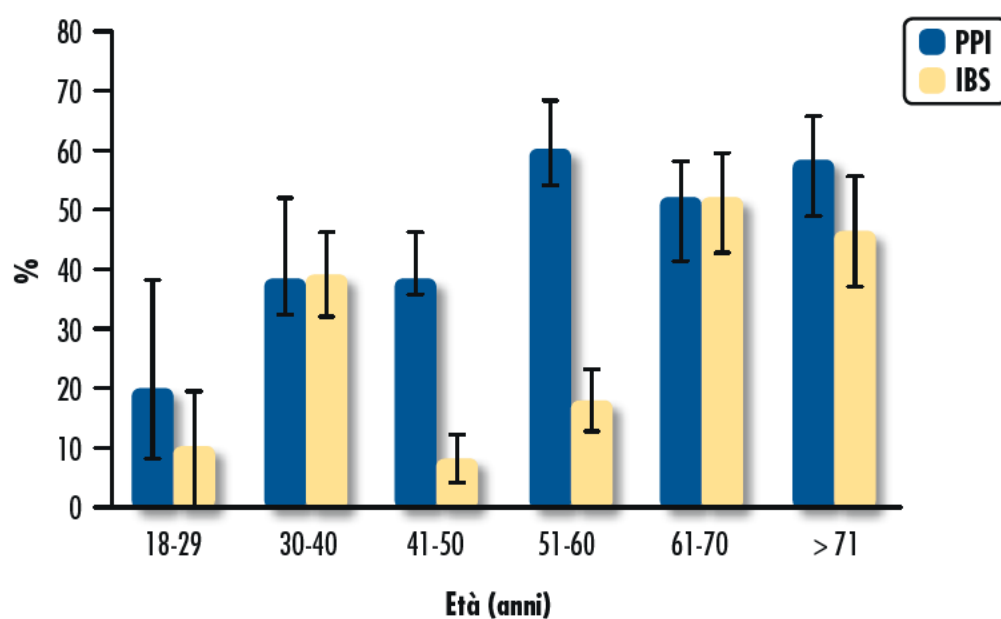
invece può anche essere aumentata a causa della sua sovrapproduzione batterica (40).



PPI: Inibitori della pompa protonica; IBS: Sindrome dell'intestino irritabile; HC: Controlli sani.

FIGURA 1.

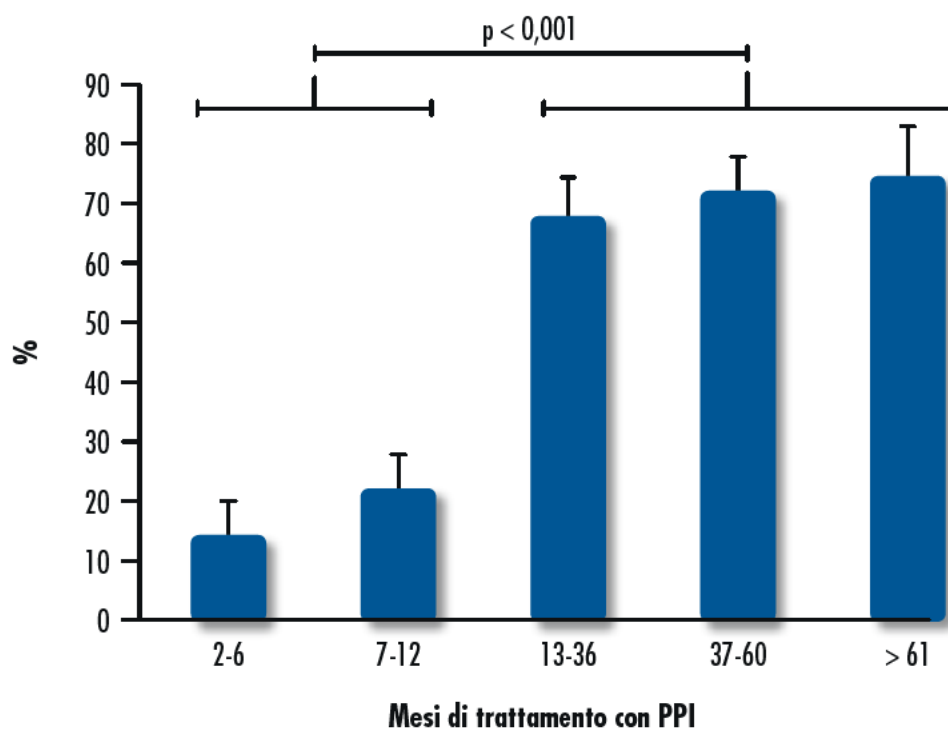
Percentuale di pazienti affetti da SIBO dopo 1 anno di terapia con PPI a dosaggio pieno.



PPI: Inibitori della pompa protonica; IBS: Sindrome dell'intestino irritabile.

FIGURA 2.

Distribuzione dell'incidenza della SIBO nelle diverse fasce di età (anni).



PPI: Inibitori della pompa protonica.

FIGURA 3.

Percentuale di pazienti affetti da SIBO dopo 1-5 anni di terapia con PPI a dosaggio pieno.

È altrettanto vero che sia i pazienti che i medici spesso trascurano il fatto che tali farmaci hanno un'attività potente sulla inibizione della secrezione gastrica e non li considerano neppure “farmaci”, ma soltanto “sostanze che proteggono lo stomaco”. L'uso diffuso e la possibilità di accesso a tali farmaci anche senza ricetta medica, con modalità *over the counter* (OCT), spiegano, ma non giustificano, tale atteggiamento. È interessante notare che la severità dei sintomi legati alla SIBO PPI-indotta aumenta con la durata della terapia con PPI (Fig. 4) e che tutte le età da 18 a > 70 possono essere colpite, pur registrandosi un picco nella fascia di età tra i 50 i 60 anni (Fig. 2).

L'associazione causale tra uso prolungato di inibitori di pompa protonica PPI e SIBO è tanto comune quanto infida da svelare, in quanto si presenta con sintomi atipici, facilmente confondibili con quelli della sindrome dell'intestino irritabile, e il paziente spesso “dimentica” che sta assumendo quel farmaco, che ritiene essere soltanto “a protezione dello stomaco”. Essa colpisce in media il 50% dei pazienti

che assumono PPI a dosaggio pieno per 1 anno (Fig. 1) e può interessare tutte le fasce di età (Fig. 2) ma può raggiungere la percentuale del 70-75% dopo 5 anni di terapia continuativa 4 (Fig. 3).

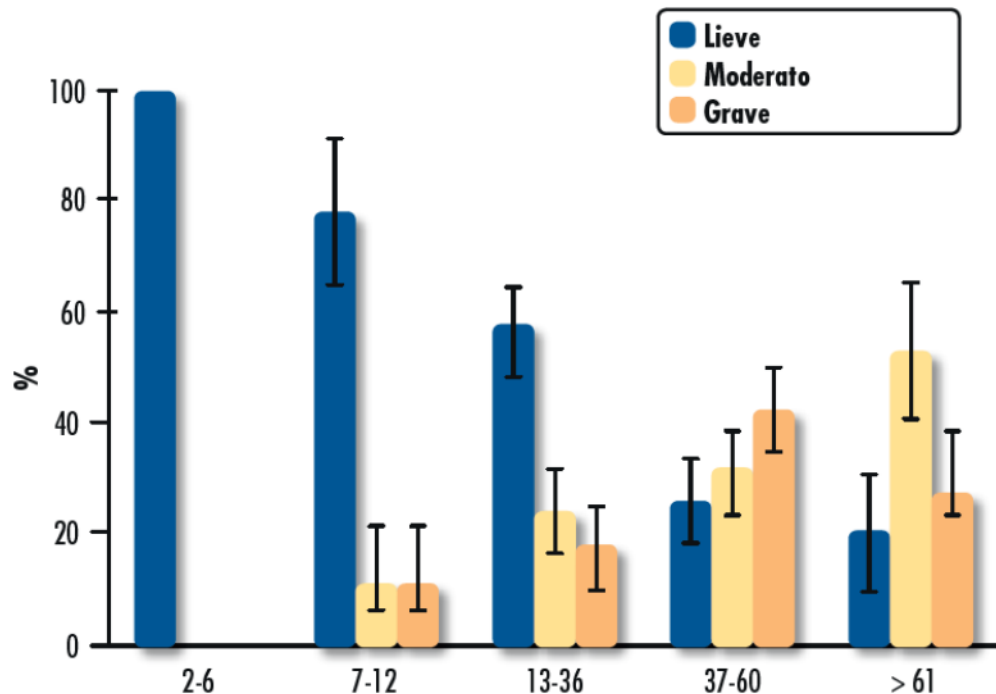


FIGURA 4.

Severità dei sintomi legati alla SIBO in relazione alla durata in anni della terapia con PPI a dosaggio pieno.

L'associazione tra l'uso prolungato degli inibitori di pompa protonica (PPI) e lo sviluppo della SIBO è tanto diffusa quanto difficile da identificare con precisione. Questo legame è infatti reso insidioso dalla natura dei sintomi, spesso aspecifici e facilmente confondibili con quelli della sindrome dell'intestino irritabile (IBS). Inoltre, molti pazienti tendono a sottovalutare l'assunzione dei PPI, percependoli semplicemente come una "protezione per lo stomaco". La SIBO colpisce in media il 50% dei pazienti che assumono PPI a dosaggio pieno per un anno e può interessare tutte le fasce di età ma può raggiungere la percentuale del 70-75% dopo cinque anni di terapia continuativa. È stato osservato che la gravità dei sintomi correlati alla SIBO indotta da PPI aumenta proporzionalmente alla durata della terapia, sebbene la condizione possa manifestarsi in tutte le fasce di età (dai 18 anni fino oltre i 70) si registra un picco di incidenza nella popolazione compresa tra i 50 e i 60 anni (41).

1.4.4 CONDIZIONI SIMILI: IMO, SIFO E LIBO

Dopo aver analizzato le cause ed i sintomi della SIBO, è importante fare chiarezza su alcune condizioni che possono presentare manifestazioni cliniche simili alla SIBO, ma che hanno caratteristiche diverse.

IMO (INTESTINAL METHANOGEN OVERGROWTH)

La proliferazione eccessiva di metanogeni intestinali appartenenti al dominio degli Archea è una condizione relativamente nuova e distinta dalla SIBO che prende il nome di IMO. Il principale responsabile dell'IMO è *Methanobrevibacter smithii* che utilizza l'idrogeno prodotto dalla fermentazione dei carboidrati per la produzione di metano. Questa sovracrescita di archea non avviene solo nell'intestino tenue, ma anche nel colon ed in altre parti dell'organismo e si verifica in circa il 30% dei pazienti con SIBO. I sintomi dell'IMO includono gonfiore, dolore addominale e diminuzione della motilità intestinale. Secondo uno studio di Madigan et al., i pazienti IMO hanno sintomi e condizioni cliniche diversi rispetto ai pazienti SIBO e hanno meno probabilità di mostrare carenza di vitamina B12 (6, 42).

SIFO (SMALL INTESTINAL FUNGAL OVERGROWTH)

La SIFO è caratterizzata dalla crescita eccessiva di funghi nell'intestino tenue, i sintomi sono sovrapponibili a quelli della SIBO: dolore addominale, flatulenza e diarrea. In passato la SIFO veniva diagnosticata quasi esclusivamente in soggetti immunocompromessi, ad esempio persone affette da HIV, diabete e soggetti sottoposti a terapia antibiotica o chemioterapica, i quali avevano una riduzione dell'immunità che facilitava la proliferazione fungina intestinale; tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che la SIFO può colpire individui sani e immunocompetenti e causare disturbi gastrointestinali.

Uno studio condotto su individui sani ha dimostrato che circa il 70% degli individui presentava *Candida albicans* nello stomaco e nell'intestino tenue a basse concentrazioni fino a 10^2 CFU/ml, non è chiaro se la presenza di *Candida albicans* sia clinicamente rilevante in pazienti con sintomi gastroenterologici (6).

LIBO (LARGE INTESTINAL BACTERIAL OVERGROWTH)

Per LIBO si intende una sovracrescita di batteri nell'intestino crasso, tuttavia, questo termine non è ufficialmente riconosciuto dalla comunità scientifica, ma è emerso in conferenze scientifiche recenti. Uno studio ha valutato la composizione microbica del colon di persone prima e dopo essere state sottoposte a colonscopia (dove hanno assunto una soluzione a base di polietilene glicole per prepararsi all'esame). I campioni fecali analizzati dopo colonscopia hanno mostrato una diminuzione di batteri benefici come *Clostridia*, *Firmicutes* e *Lactobacillus* ed un aumento di batteri potenzialmente patogeni come *Proteobatteri* ed *Enterobacteriaceae* rispetto ai campioni pre-esame. Inoltre, a 30 giorni dall'esame si è notato un aumento delle *Streptococcaceae*, il che può indicare un aumento della permeabilità intestinale. (6, 43).

1.5 TEST DIAGNOSTICI

1.5.1 DISBIOSI TEST (INDICANO URINARIO)

È possibile valutare la disbiosi intestinale attraverso un esame sulle urine di prima minzione, che consente di evidenziare l'eccesso o l'assenza di metaboliti derivati dalle attività metaboliche della flora batterica intestinale, il test rileva la presenza nelle urine di due metaboliti del triptofano: l'indicano e lo scatolo. La flora batterica presente nell'intestino tenue produce enzimi che catalizzano la conversione del triptofano, mediante decarbossilazione, in indolo. L'indolo, così prodotto, viene assorbito a livello della mucosa intestinale e attraverso il circolo entero-epatico giunge al fegato dove è trasformato in indicano per essere poi escreto dai reni con le urine. Poiché l'intestino tenue è scarsamente popolato dalla flora batterica, l'indicano è presente nelle urine a livelli bassi in individui clinicamente sani; elevati livelli di indicano urinario sono indice di Disbiosi fermentativa a livello dell'intestino tenue. Il 3-metil-indolo, meglio conosciuto come scatolo, è un composto organico che deriva dalla decarbossilazione del triptofano a livello intestinale (soprattutto a livello del colon). Se la flora intestinale non è equilibrata, gli aminoacidi derivati da una non completa digestione delle proteine subiscono il processo di decarbossilazione che produce scatolo in elevati quantitativi che sono poi riscontrabili anche a livello urinario; elevati livelli di scatolo sono indice di disbiosi putrefattiva a livello del colon. L'alterazione di entrambi i parametri è indice di disbiosi a carico sia dell'intestino tenue che del colon (44).

Nella figura 5 sono rappresentati gli intervalli di riferimento dei valori di indicano e scatolo, questi valori hanno un significato clinico solo se rapportati alla creatinuria.

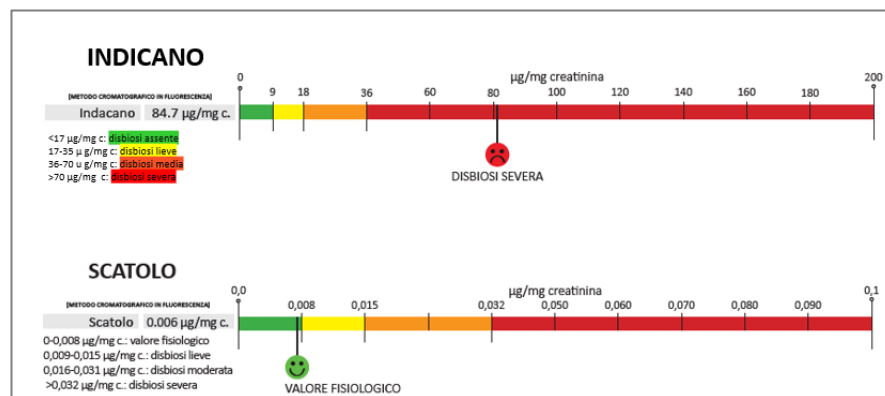


Figura 5 Intervalli di riferimento indicano-scatolo nelle urine

In un precedente elaborato presentato all'Università degli studi di Camerino, corso di laurea in Biologia della Nutrizione, (45) sono stati raccolti presso il Laboratorio Dr Fioroni di San Benedetto del Tronto, i dati relativi ad numeri di pazienti (n=1056) che hanno effettuato il test di disbiosi fermentativa (indicano), in una fascia di età compresa tra 18 e 80 anni. Questo studio statistico ha cercato di confermare i limiti di riferimento indicati per la prima volta da uno studio condotto dall'Università di Firenze (46). Lo studio ha considerato soltanto l'indicano quale marker robusto in grado di definire diversi "stadi" di disbiosi intestinale, utilizzando una metodologia avanzata come la cromatografia con detector fluorimetrico (HPLC-FL), la stessa utilizzata presso il laboratorio di analisi Dr Fioroni. L'analisi statistica condotta presso il Laboratorio ha confermato sia l'intervallo di riferimento proposto dall'Università di Firenze utilizzando una popolazione omogenea (non patologica), ma un numero molto più basso di campioni, sia la capacità del marker indicano di individuare diverse popolazioni a diverse fasce di età.

Da questi dati statistici si possono riassumere tre punti decisivi che in parte rafforzano le considerazioni presenti in letteratura, dall'altra parte ci pongono davanti dei quesiti interessanti:

1. È consolidato in letteratura come l'età influenzi in modo significativo il microbiota intestinale. Tra i 40-60 anni e tra i 60-80 anni il 75° percentile passa da 30 a 40 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinuria.
2. In letteratura è ampiamente riportato come il genere femminile abbia una prevalenza maggiore di disbiosi, permeabilità e IBS, soprattutto nella fascia di età 40-60 anni. In questa fascia il 75° percentile della popolazione maschile è pari a 15.6 contro i 23.5 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinuria della popolazione femminile. Questo dato rafforza il ruolo dell'indicano come marker robusto nella differenziazione del microbiota intestinale nei due sessi.

3. Un'analisi incrociata dei dati relativi ad età e sesso suggerisce l'esistenza di tre popolazioni differenti:

- Fascia di età femminile under 60
- Fascia di età maschile under 60
- Fascia di età maschile e femminile over 60

Questa divisione evidenzia un dato interessante: sotto i 60 anni le donne mostrano una predisposizione maggiore alla disbiosi rispetto agli uomini, sopra i 60 anni l'uomo e la donna iniziano avere la stessa sensibilità alla disbiosi (45).

I limiti di riferimento utilizzati in questo confronto sono confrontabili con quelli presenti in letteratura e validati da una popolazione molto ampia ed eterogenea.

1.5.2 ZONULINA: UN MARKER DI PERMEABILITÀ INTESTINALE

La zonulina è una proteina di 47 kDa in grado di modulare le giunzioni strette (Tight Junctions) degli enterociti, il suo dosaggio è utile per valutare la sindrome dell'intestino permeabile (44). Il meccanismo d'azione della zonulina coinvolge il legame con due recettori presenti sull'epitelio intestinale: l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) e il PAR2 (Protease-Activated Receptor 2). L'attivazione di questo complesso recettoriale induce la fosforilazione delle proteine della zonula occludens, con conseguente alterazione strutturale delle giunzioni strette e aumento della permeabilità intestinale (47).

La zonulina è misurabile sia nel siero sia su campioni di feci; la presenza di specifiche quantità di zonulina a livello fecale è indice di un'alterata funzionalità delle giunzioni cellulari, mentre alti livelli di zonulina sierica indicano un aumento della permeabilità intestinale (44).

1.5.3 BREATH TEST AL GLUCOSIO PER DIAGNOSI DI SIBO

I breath test sono utilizzati per esplorare la fisiopatologia dei disordini funzionali gastrointestinali; questi test sfruttano il concetto che parte dei gas, come idrogeno, metano e anidride carbonica, prodotti dalla fermentazione della flora batterica del

colon, diffondono nel sangue e vengono eliminati attraverso l'espiazione. Negli individui sani, questo processo avviene prevalentemente nell'intestino crasso, dove risiede la maggior parte dei batteri intestinali, tuttavia, nei pazienti con SIBO, la fermentazione batterica avviene più prossimalmente all'interno dell'intestino tenue. Il breath test è economico, non invasivo e presenta una procedura semplice; per diagnosticare la SIBO il substrato utilizzato è il glucosio che, in condizioni di normalità viene assorbito nell'intestino tenue, mentre in caso di sovracrescita batterica viene fermentato localmente producendo idrogeno e metano.

Poiché il breath test si basa sulla rivelazione dei gas prodotti dalla fermentazione batterica del substrato somministrato, è necessario ridurre al minimo la produzione di gas derivato dalla fermentazione di altre fonti alimentari; perciò, è necessaria una preparazione specifica nei giorni precedenti all'esame in modo da limitare l'attività fermentativa del microbiota intestinale. In particolare, è vietata l'assunzione di lassativi ed antibiotici nei 30 giorni precedenti all'esame, il giorno prima del test è necessario seguire una dieta a basso residuo composta da riso bianco, pesce, pollo ed è necessario seguire un digiuno di 12 ore prima dell'esecuzione del test.

Il breath test al glucosio viene eseguito effettuando una raccolta basale dell'espiazione al tempo 0, segue la somministrazione di una dose standardizzata di glucosio disciolta in acqua e nelle 2 ore successive l'espiazione viene prelevata ogni 15 minuti. Un breath test al glucosio risulta positivo per SIBO se si ha un aumento maggiore di 12 ppm di idrogeno rispetto al valore basale entro i primi 90 minuti dall'ingestione del glucosio (48). Nelle figure 6 e 7 sono mostrati due grafici che illustrano l'andamento del breath test al glucosio, sull'asse delle ascisse è indicato il tempo (in minuti) e sull'asse delle ordinate la concentrazione di idrogeno (espressa in ppm). Le curve evidenziano un test con esito positivo e uno con esito negativo.

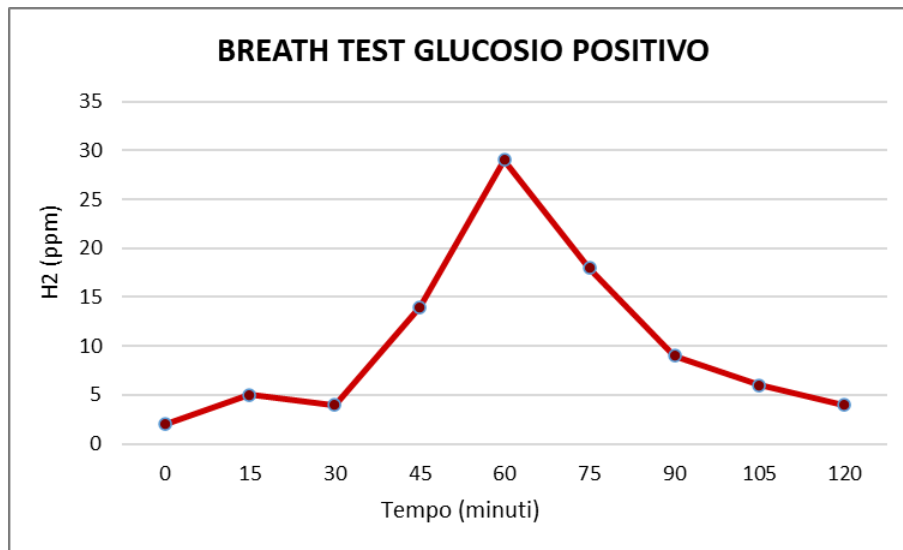


Figura 6 Esempio di breath test al glucosio positivo per SIBO

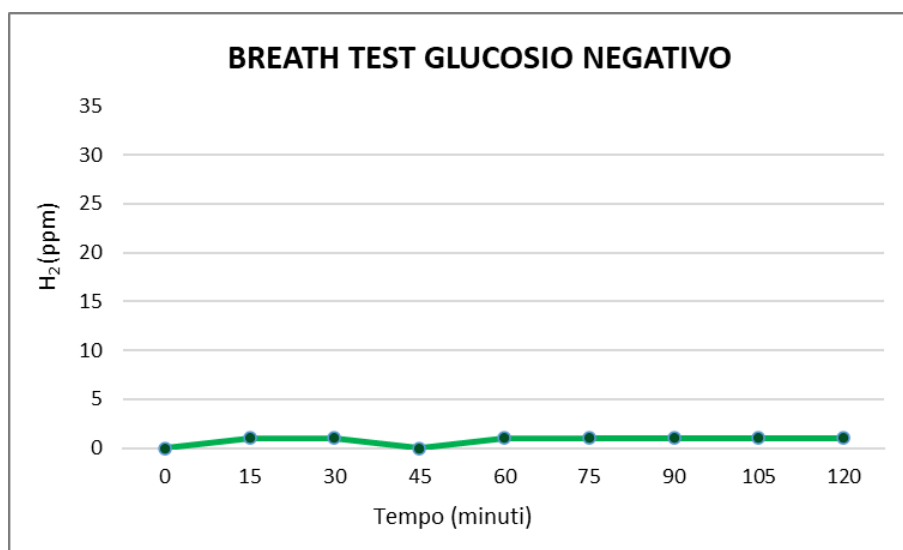


Figura 7 Esempio di breath test al glucosio negativo per SIBO

Il breath Test è in grado di differenziare una SIBO da una IMO. Quindi se il test dell'esperto (breath Test al Glucosio) rileva una maggiore presenza di metano si ha la presenza di IMO. Una diagnosi di IMO si associa ad un importante meteorismo e a sindrome dell'intestino irritabile sottotipo costipazione, transito intestinale rallentato e una scarsa assimilazione di nutrienti. L'IMO è più difficile da sconfiggere e devono essere utilizzate terapie ancor più mirate (6, 48)

2. ESPERIENZA DI STAGE

Durante l'esperienza di stage svolta presso il laboratorio analisi Dr Fioroni di San Benedetto del Tronto, sotto la supervisione del tutor aziendale Dott. Michele Spina, ho avuto modo di assistere e prendere parte a diverse tipologie di analisi cliniche, focalizzandomi principalmente sul test dell'indicano urinario per la diagnosi di disbiosi intestinale. Il mio compito è stato quello di seguire tutte le fasi che caratterizzano il test dell'indicano urinario, dall'arrivo dei campioni in laboratorio fino alla refertazione dei risultati ottenuti. Un'ulteriore attività svolta durante lo stage è stata quella di confrontare a livello osservazionale, per identificare possibili correlazioni, i risultati del test dell'indicano urinario con altre quattro tipologie di analisi (breath test al glucosio, zonulina sierica, zonulina fecale e *Candida* nelle feci).

3. MATERIALI E METODI

3.1 ESECUZIONE DEL DISBIOSI TEST (INDICANO URINARIO)

Durante l'esperienza di stage ho eseguito in affiancamento il test dell'indicano urinario, l'obiettivo è stato quello di determinare la concentrazione dell'indicano, mediante cromatografia HPLC-FL, allo scopo di diagnosticare una disbiosi intestinale; i valori ottenuti sono stati rapportati alla creatinuria del campione. Nel periodo di stage svolto da maggio ad agosto 2025, ho analizzato circa 40 campioni a settimana.

Preparazione dei campioni

- Agitare i campioni di urine
- Aggiungere 20 µl di campione in vial HPLC
- Diluire con 1 ml di acqua bidistillata
- Agitare i vial per 20 secondi

Curva di calibrazione

La curva di calibrazione è stata costruita utilizzando i controlli L1 e L2 certificati EUREKA; essi sono stati ricostituiti in acqua secondo le istruzioni del produttore. In seguito, sono state effettuate una serie di diluizioni in vial HPLC in modo da ottenere una serie di punti di calibrazione.

Preparazione HPLC-FL

Prima dell'analisi, la colonna HPLC è stata lavata e condizionata con la fase mobile.

Condizioni cromatografiche HPLC-FL

Il metodo segue una validazione di ripetibilità, accuratezza, precisione, specificità, linearità, sensibilità (limite di rivelazione e quantificazione), robustezza e intervallo di misura interne al Laboratorio.

Elaborazione dei dati

I vials preparati sono stati inseriti nell'autocampionatore dell'HPLC, l'analisi è stata eseguita in modo automatico dal cromatografo; i picchi cromatografici rilevanti l'indicano sono stati integrati mediante il software associato all'HPLC. In seguito, i valori di indicano ottenuti sono stati rapportati alla creatinuria.

Limiti di riferimento:

INDICANO $\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinuria

<17 disbiosi assente

17-35 disbiosi lieve

36-70 disbiosi media

>70 disbiosi severa

3.2 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST ED ALTRE ANALISI DI LABORATORIO

Un'ulteriore attività svolta durante lo stage si è focalizzata su un'indagine retrospettiva dei dati presenti nei database interni; ho selezionato i dati dal 2020 al 2024 relativi ai campioni in cui sono state eseguite le seguenti combinazioni di esami:

- Test indicano e breath test al glucosio
- Test indicano e zonulina sierica
- Test indicano e zonulina fecale
- Test indicano e Candidosi fecale

Questo confronto nasce dall'esigenza di mettere in relazione alcuni test diagnostici utilizzati da nutrizionisti e gastroenterologi (disbiosi test-indicano, presenza di candidosi fecale), con esami utilizzati per un sospetto quadro patologico di SIBO (breath test glucosio) o su una popolazione con grave sintomatologia intestinale (zonulina fecale e sierica). Lo scopo di questa parte del lavoro è stato di vedere, almeno a livello osservazionale, se ci sono delle correlazioni tra i vari test e qual è il loro andamento.

I dati raccolti sono stati organizzati in un foglio di calcolo Excel ed è stato realizzato un grafico per ciascuna coppia di analisi, al fine di osservare eventuali relazioni tra i dati.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

A seguire sono riportati i confronti tra i risultati delle coppie di esami indicate in precedenza, sotto forma di istogrammi. L'asse delle ascisse riporta quattro intervalli di concentrazione per il test dell'indicano, mentre l'asse delle ordinate riporta il numero o la percentuale di campioni in quell'intervallo, divisa tra due colonne (colonna rossa- valore patologico al test confrontato, colonna verde- valore normale).

4.1 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST-INDICANO E BREATH TEST AL GLUCOSIO

Numero di campioni individuati= 11

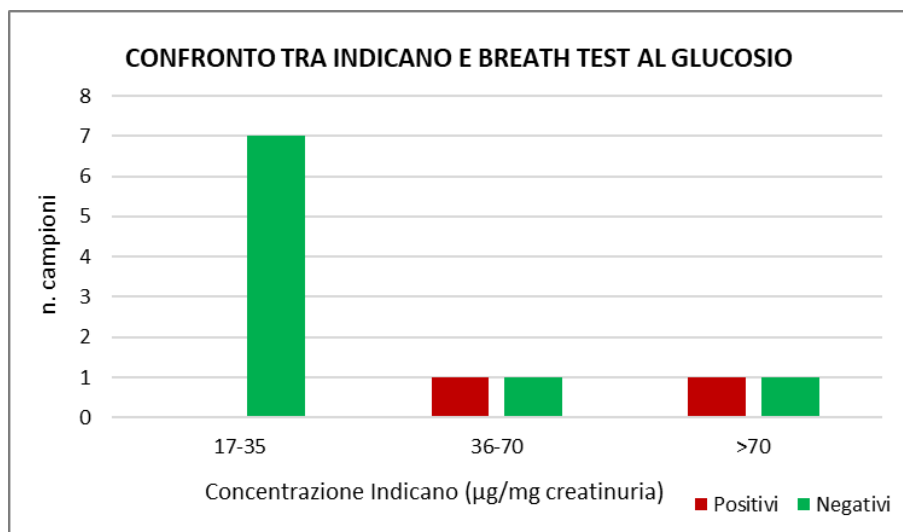


Figura 8 Confronto tra le concentrazioni di indicano rilevate e i risultati del breath test al glucosio

Nell'istogramma in figura 8 sono stati confrontati i valori del test dell'indicano con i risultati del breath test al glucosio. Si può osservare che la maggioranza di breath test negativi per SIBO si trovano nei valori di concentrazione di indicano compresa tra 17-35 µg/mg creatinuria (disbiosi lieve o assente), ciò mostra che, in presenza di disbiosi lieve o assente, il breath test per SIBO risulta negativo; tuttavia, lo scarso numero di pazienti che si sono sottoposti ad entrambi i test (solamente 11) rende

difficile trarre conclusioni significative. È inoltre stato omissso dal grafico l'intervallo “< 17 µg/mg creatinuria” per mancanza di casi.

La disbiosi è un'alterazione dell'equilibrio del microbiota intestinale, mentre la SIBO (Sovracrescita Batterica dell'Intestino Tenue) è una forma specifica di disbiosi, una condizione in cui si verifica una proliferazione batterica anomala proprio nell'intestino tenue. La disbiosi è un concetto più ampio che include molteplici squilibri del microbiota in varie parti del tratto gastrointestinale, mentre la SIBO è una condizione mirata che colpisce l'intestino tenue, causando sintomi come gonfiore, dolore addominale, diarrea o deficit nutrizionali.

Da quanto osservato sembrerebbe come un paziente che, in un controllo di routine (quale è il Disbiosi Test) ottiene un livello di disbiosi assente o lieve, con buona probabilità anche il Test della SIBO risulterebbe negativo: come se un'assenza di disbiosi sia correlata ad un'assenza di SIBO. Questo dato osservazionale andrebbe confermato almeno su altri 50 campioni.

4.2 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST-INDICANO E ZONULINA SIERICA

Numero di campioni individuati= 103

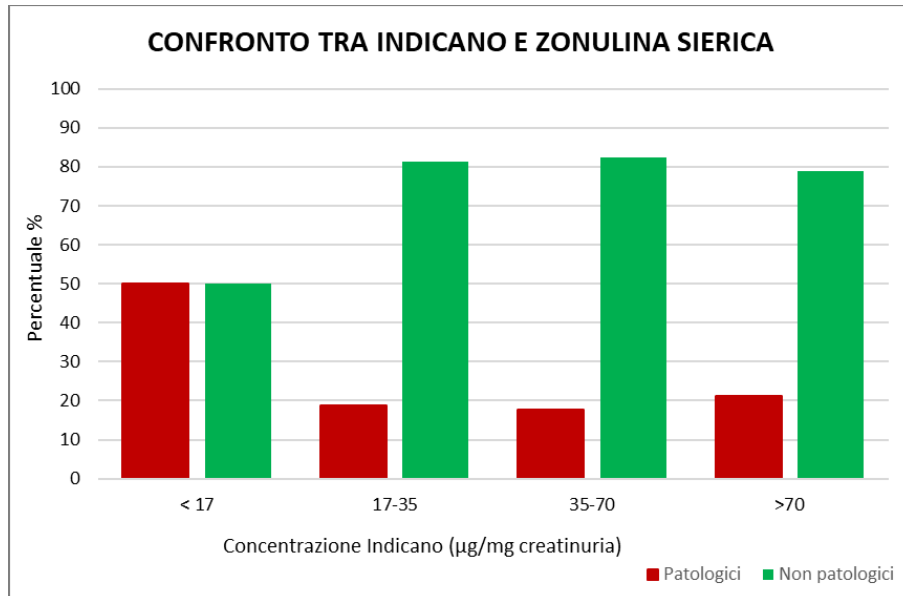


Figura 9 Confronto tra le concentrazioni di indicano rilevate e i risultati della zonulina sierica

Nell'istogramma in figura 9 sono stati confrontati i valori del test dell'indicano con i valori di zonulina sierica. Il primo intervallo presenta una popolazione molto ridotta (4 campioni) mentre i successivi tre presentano un numero pressoché omogeneo di campioni (circa 30 per intervallo). Analizzando visivamente i dati, in questi ultimi tre intervalli non si osserva una correlazione tra la concentrazione di indicano e quella di zonulina sierica: la distribuzione tra risultati positivi e negativi è pressoché costante. Questo suggerisce che non ci sia una correlazione tra il valore di indicano e zonulina sierica. Questo è un dato abbastanza sorprendente perché si aspettava una correlazione molto più consistente tra disbiosi gravi e valori patologici di zonulina sierica.

La zonulina sierica misura la permeabilità intestinale attraverso una proteina, mentre la disbiosi è uno squilibrio della flora batterica intestinale. I due parametri sono collegati: elevati livelli di zonulina possono indicare una maggiore permeabilità intestinale, spesso associata alla disbiosi, poiché la barriera intestinale compromessa consente il passaggio di sostanze indesiderate e può favorire infiammazione e disbiosi.

È evidente che non tutte le disbiosi siano in grado di alterare la permeabilità intestinale (potrebbe essere effettuata una nuova statistica per capire se c'è un cut-off per cui un livello elevato di disbiosi-indicano è in grado di indurre stati di permeabilità intestinale gravi), o che ci siano permeabilità intestinali indotte da altri fattori esogeni/endogeni e non da una perdita di eubiosi.

È corretto affermare che la permeabilità intestinale non è sempre indotta da disbiosi, ma questa può esserne una causa. La permeabilità intestinale (Leaky gut) può essere provocata da una combinazione di fattori, tra cui: diete scorrette, uso di farmaci, come antibiotici e FANS, stress, infezioni, e fattori chimici. Sebbene la disbiosi (alterazione del microbiota intestinale) sia una causa comune, altre condizioni possono alterare la barriera intestinale, rendendola più permeabile.

Questi risultati ci indicano come in casi di anamnesi grave (grave sintomatologia) ed insuccessi di terapie alimentari e nutraceutiche, oltre al test della disbiosi, vanno effettuati in un secondo step gli esami di zonulina sierica: questo permetterebbe al clinico di adottare delle strategie terapeutiche più mirate. Ad esempio, se nel primo step il paziente ha una disbiosi negativa, che non si concilia con una anamnesi clinica con grave sintomatologia, dovrà effettuare il test di zonulina che, se positivo, indirizzerà il clinico verso una terapia mirata alla mucosa intestinale e al ripristino della permeabilità.

4.3 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST-INDICANO E ZONULINA FECALE

Numero di campioni individuati= 56

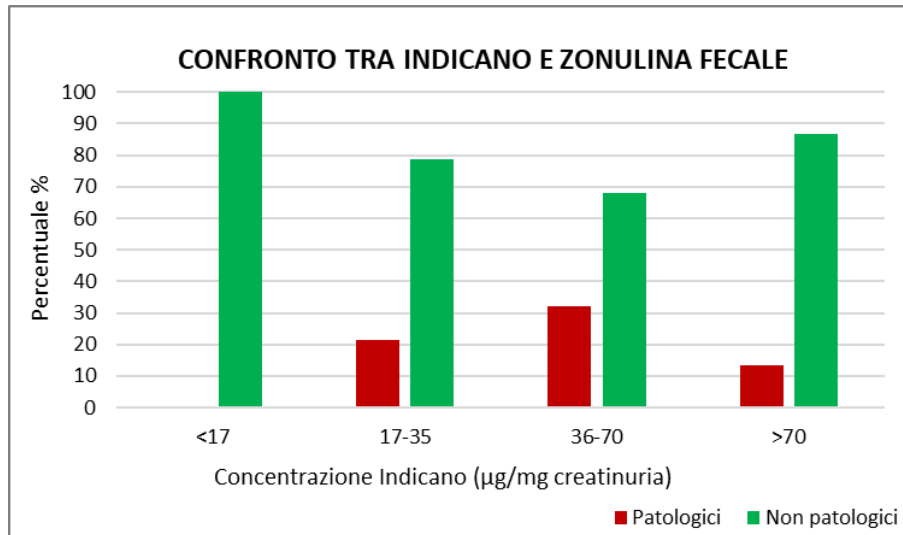


Figura 10 Confronto tra le concentrazioni di indicano rilevate e i risultati della zonulina fecale

Nell'istogramma in figura 10 sono stati confrontati i valori del test dell'indicano con i valori di zonulina fecale. Il primo intervallo è stato escluso dall'analisi in quanto sono presenti solo 2 campioni. Gli altri tre intervalli presentano una popolazione pressoché omogenea (circa 20 campioni per ciascun intervallo). Il grafico sembra suggerire che non ci sia correlazione tra il test dell'indicano e la concentrazione di zonulina fecale, in quanto la percentuale dei campioni positivi e negativi nei tre intervalli è circa costante.

La zonulina fecale rileva la presenza di zonulina nelle feci e indica un'alterazione della barriera intestinale, mentre la zonulina sierica misura la proteina nel sangue e stima la permeabilità sistemica, indicando quindi un danno più avanzato o sistemico. La scelta tra i due test dipende dal quadro clinico e dalla valutazione medica, poiché la zonulina sierica è un indice più sensibile e indica un passaggio di sostanze dall'intestino al circolo sanguigno. Il test gold standard per l'individuazione di permeabilità intestinale è considerato ad oggi quello della zonulina sierica, perché le feci sono una matrice molto meno omogenea e rende più critica la quantizzazione del marker proteico. Infatti, la zonulina fecale può riflettere un grado di variabilità o meno omogeneità rispetto alla zonulina sierica, a causa

della natura dinamica della sua produzione e del passaggio attraverso il lume intestinale.

I dati raccolti (una popolazione abbastanza consistente) ci dicono che la zonulina fecale e quella sierica si comportano, rispetto al test della disbiosi, allo stesso modo, per cui al momento, con i dati in possesso, il test gold standard per la permeabilità intestinale rimane la zonulina sierica, come indicato nelle linee guida della Biochimica Italiana (SIBIOC).

4.4 CONFRONTO TRA DISBIOSI TEST-INDICANO E CANDIDA NELLE FECI

Numero di campioni individuati= 333

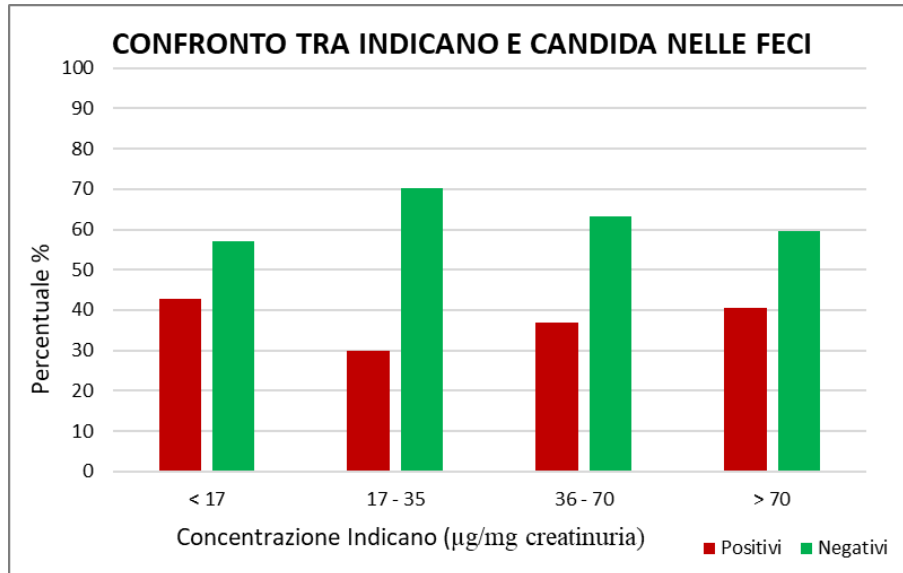


Figura 11 Confronto tra le concentrazioni di indicano e la presenza di *Candida* nelle feci

Nell'istogramma in figura 11 sono stati confrontati i valori del test dell'indicano con la presenza di *Candida* nelle feci. Nell'intervallo "< 17µg/mg creatinuria" sono presenti 14 campioni, mentre nei tre intervalli successivi si ha la presenza di circa 90 campioni, il che permette una maggiore attendibilità delle osservazioni visive, grazie all'elevato numero di campioni presenti. Dal grafico si osserva che, nei tre intervalli, si ha in media la presenza di *Candida* nel 35% dei campioni, inoltre si osserva che non c'è una correlazione tra il test dell'indicano e la presenza di *Candida*, perché la distribuzione di campioni positivi e negativi alla *Candida* è costante nei vari intervalli. La *Candida* è presente normalmente nell'intestino di gran parte della popolazione e fa parte della flora intestinale, ma non è considerato un problema finché non supera un livello di crescita eccessivo (disbiosi) o non vi sono condizioni che ne favoriscono la proliferazione, come un sistema immunitario indebolito o l'assunzione di antibiotici.

Un'analisi delle feci può rilevare un'eccessiva quantità (non quantitativa) di *Candida*, indicando una potenziale sovracrescita e non solo la sua presenza

normale. La determinazione quantitativa della carica di *Candida* però al momento non è una procedura in routine: questo è uno dei motivi per cui possiamo dire che la sua determinazione qualitativa nelle feci non è correlata a disbiosi gravi. In futuro si dovranno utilizzare metodologie più avanzate nella ricerca della sovracrescita fecale, ma soprattutto avere dei cut-off discriminati certi e robusti di una popolazione di riferimento. Ad oggi non esistono dei "limiti di riferimento" standard universali per la sovracrescita di *Candida* nelle feci, poiché il valore considerato normale varia in base al tipo di test e al laboratorio.

5. CONCLUSIONI

L'analisi dei quattro grafici mostra che, nel primo grafico, in cui è stato confrontato il test dell'indicano con il breath test al glucosio, nell'intervallo "17-35µg/mg creatinuria" si osserva un possibile legame tra disbiosi e SIBO. Nei grafici di confronto tra test dell'indicano e zonulina sierica/fecale, che presentano un numero più ampio di campioni, non si nota alcuna relazione tra le due analisi; mentre il quarto grafico, basato su una popolazione molto più ampia, conferma che non c'è un'associazione tra il test dell'indicano e la *Candida* nelle feci.

6. BIBLIOGRAFIA

1. A. Altomare, C. Di Rosa, E. Imperia, S. Emerenziani, M. Cicala, M. P. L. Guarino, Diarrhea Predominant-Irritable Bowel Syndrome (IBS-D): Effects of Different Nutritional Patterns on Intestinal Dysbiosis and Symptoms. *Nutrients* **13**, 1506 (2021).
2. J. Álvarez, J. M. Fernández Real, F. Guarner, M. Gueimonde, J. M. Rodríguez, M. Saenz de Pipaon, Y. Sanz, Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterol. Hepatol.* **44**, 519–535 (2021).
3. L. Capurso, Il microbiota intestinale. *Recenti Prog. Med.* **107**, 257–266 (2016).
4. M. B. Madigan, *Brock. Biologia dei microrganismi. Microbiologia generale, ambientale e industriale. Ediz. mylab.* (Pearson, Milano, 2016).
5. E. Thursby, N. Juge, Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**, 1823–1836 (2017).
6. M. Banaszak, I. Górna, D. Woźniak, J. Przysławski, S. Drzymała-Czyż, Association between Gut Dysbiosis and the Occurrence of SIBO, LIBO, SIFO and IMO. *Microorganisms* **11**, 573 (2023).
7. W. Fusco, M. B. Lorenzo, M. Cintoni, S. Porcari, E. Rinninella, F. Kaitsas, E. Lener, M. C. Mele, A. Gasbarrini, M. C. Collado, G. Cammarota, G. Ianiro, Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients* **15**, 2211 (2023).
8. G. Clarke, R. M. Stilling, P. J. Kennedy, C. Stanton, J. F. Cryan, T. G. Dinan, Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol. Endocrinol.* **28**, 1221–1238 (2014).
9. I. Rowland, G. Gibson, A. Heinken, K. Scott, J. Swann, I. Thiele, K. Tuohy, Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* **57**, 1–24 (2018).
10. J. de J. Rodríguez-Romero, A. C. Durán-Castañeda, A. P. Cárdenas-Castro, J. A. Sánchez-Burgos, V. M. Zamora-Gasga, S. G. Sáyago-Ayerdi, What we know about protein gut metabolites: Implications and insights for human health and diseases. *Food Chem. X* **13**, 100195 (2021).
11. H. M. Roager, T. R. Licht, Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat. Commun.* **9**, 3294 (2018).

12. V. T. Pham, S. Dold, A. Rehman, J. K. Bird, R. E. Steinert, Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans. *Nutr. Res.* **95**, 35–53 (2021).
13. R. S. Aleman, M. Moncada, K. J. Aryana, Leaky Gut and the Ingredients That Help Treat It: A Review. *Molecules* **28**, 619 (2023).
14. B. Macura, A. Kiecka, M. Szczepanik, Intestinal permeability disturbances: causes, diseases and therapy. *Clin. Exp. Med.* **24**, 232 (2024).
15. T. Vanuytsel, J. Tack, R. Farre, The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation. *Front. Nutr.* **8**, 717925 (2021).
16. C. Stolfi, C. Maresca, G. Monteleone, F. Laudisi, Implication of Intestinal Barrier Dysfunction in Gut Dysbiosis and Diseases. *Biomedicines* **10**, 289 (2022).
17. M. Gulhane, L. Murray, R. Lourie, H. Tong, Y. H. Sheng, R. Wang, A. Kang, V. Schreiber, K. Y. Wong, G. Magor, S. Denman, J. Begun, T. H. Florin, A. Perkins, P. Ó. Cuív, M. A. McGuckin, S. Z. Hasnain, High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Sci. Rep.* **6**, 28990 (2016).
18. S. Devkota, Y. Wang, M. Musch, V. Leone, H. Fehlner-Peach, A. Nadimpalli, D. A. Antonopoulos, B. Jabri, E. B. Chang, Dietary fat-induced taurocholic acid production promotes pathobiont and colitis in IL-10^{-/-} mice. *Nature* **487**, 104–108 (2012).
19. T. Suzuki, Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 631–659 (2012).
20. M. S. Desai, A. M. Seekatz, N. M. Koropatkin, N. Kamada, C. A. Hickey, M. Wolter, N. A. Pudlo, S. Kitamoto, N. Terrapon, A. Muller, V. B. Young, B. Henrissat, P. Wilmes, T. S. Stappenbeck, G. Núñez, E. C. Martens, A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **167**, 1339–1353.e21 (2016).
21. M. Vancamelbeke, S. Vermeire, The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 821–834 (2017).
22. Y. Kinashi, K. Hase, Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. *Front. Immunol.* **12**, 673708 (2021).

23. K. Arimatsu, H. Yamada, H. Miyazawa, T. Minagawa, M. Nakajima, M. I. Ryder, K. Gotoh, D. Motooka, S. Nakamura, T. Iida, K. Yamazaki, Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci. Rep.* **4**, 4828 (2014).
24. R. Carnevale, V. Cammisotto, C. Nocella, F. Violi, DISBIOSI INTESTINALE ED INFARTO DEL MIOCARDIO: NUOVI MECCANISMI DI ATEROSCLEROSI. *G. Ital. Dell'arteriosclerosi* **11**, 27–41 (2020).
25. F. Izadparast, B. Riahi-Zajani, F. Yarmohammadi, A. W. Hayes, G. Karimi, Protective effect of berberine against LPS-induced injury in the intestine: a review. *Cell Cycle* **21**, 2365–2378 (2022).
26. S. S. Ghosh, J. Wang, P. J. Yannie, S. Ghosh, Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *J. Endocr. Soc.* **4**, bvz039 (2020).
27. A. Gagliardi, V. Totino, F. Cacciotti, V. Iebba, B. Neroni, G. Bonfiglio, M. Trancassini, C. Passariello, F. Pantanella, S. Schippa, Rebuilding the Gut Microbiota Ecosystem. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **15**, 1679 (2018).
28. A. Safarchi, G. Al-Qadami, C. D. Tran, M. Conlon, Understanding dysbiosis and resilience in the human gut microbiome: biomarkers, interventions, and challenges. *Front. Microbiol.* **16**, 1559521 (2025).
29. A. Kurilshikov, C. Wijmenga, J. Fu, A. Zhernakova, Host Genetics and Gut Microbiome: Challenges and Perspectives. *Trends Immunol.* **38**, 633–647 (2017).
30. S. E. Winter, A. J. Bäumlér, Gut dysbiosis: Ecological causes and causative effects on human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **120**, e2316579120 (2023).
31. V. Origüela, A. Lopez-Zaplana, Gut Microbiota: An Immersion in Dysbiosis, Associated Pathologies, and Probiotics. *Microorganisms* **13**, 1084 (2025).
32. M. C. Cenit, Y. Sanz, P. Codoñer-Franch, Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. *World J. Gastroenterol.* **23**, 5486–5498 (2017).
33. A. H. Sachdev, M. Pimentel, Gastrointestinal bacterial overgrowth: pathogenesis and clinical significance. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **4**, 223–231 (2013).
34. S. J. Sorathia, V. Chippa, J. M. Rivas, “Small Intestinal Bacterial Overgrowth” in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546634/>).

35. S. J. Lewis, S. Franco, G. Young, S. J. D. O'keefe, Altered bowel function and duodenal bacterial overgrowth in patients treated with omeprazole. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10**, 557–561 (1996).
36. F. Castiglione, G. Del Vecchio Blanco, A. Rispo, G. Petrelli, G. Amalfi, A. Cozzolino, I. Cuccaro, G. Mazzacca, Orocecal transit time and bacterial overgrowth in patients with Crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **31**, 63–66 (2000).
37. S. Velasco-Aburto, A. Llama-Palacios, M. C. Sánchez, M. J. Ciudad, L. Collado, Nutritional Approach to Small Intestinal Bacterial Overgrowth: A Narrative Review. *Nutrients* **17**, 1410 (2025).
38. E. Ierardi, G. Losurdo, C. Sorrentino, F. Giorgio, G. Rossi, A. Marinaro, K. R. Romagno, A. Di Leo, M. Principi, Macronutrient intakes in obese subjects with or without small intestinal bacterial overgrowth: an alimentary survey. *Scand. J. Gastroenterol.* **51**, 277–280 (2016).
39. J. P. Wielgosz-Grochowska, N. Domanski, M. E. Drywień, Influence of Body Composition and Specific Anthropometric Parameters on SIBO Type. *Nutrients* **15**, 4035 (2023).
40. J. Bures, J. Cyrany, D. Kohoutova, M. Förstl, S. Rejchrt, J. Kvetina, V. Vorisek, M. Kopacova, Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World J. Gastroenterol. WJG* **16**, 2978–2990 (2010).
41. L. Lombardo, LA SIBO oggi. Una condizione clinica spesso trascurata (Pacini Editore 2012).
42. K. E. Madigan, R. Bundy, R. B. Weinberg, Distinctive Clinical Correlates of Small Intestinal Bacterial Overgrowth with Methanogens. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, 1598-1605.e2 (2022).
43. L. Drago, C. Valentina, P. Fabio, Gut microbiota, dysbiosis and colon lavage. *Dig. Liver Dis.* **51**, 1209–1213 (2019).
44. R. Benelli, S. Capecchi, Il laboratorio nell'inflammatione (LILT Prato 2020).
45. S. Vagnoni, "Definizione degli intervalli di riferimento dell'indicano nelle urine," thesis, Università degli studi di Camerino (2024).
46. C. Burrini, B. Morrocchi, Risultati preliminari per la definizione dell'intervallo di riferimento per l'indoxyl solfato (indicano) nelle urine. *Biochim. Clin.*, doi: 10.19186/BC_2022.032 (2022).

47. Karina Rahmadia Ekawidyani, Murdani Abdullah, Diet, nutrition and intestinal permeability: A mini review. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **32** (2023).
48. H. F. Hammer, M. R. Fox, J. Keller, S. Salvatore, G. Basilisco, J. Hammer, L. Lopetuso, M. Benninga, O. Borrelli, D. Dumitrascu, B. Hauser, L. Herszenyi, R. Nakov, D. Pohl, N. Thapar, M. Sonyi, European guideline on indications, performance, and clinical impact of hydrogen and methane breath tests in adult and pediatric patients: European Association for Gastroenterology, Endoscopy and Nutrition, European Society of Neurogastroenterology and Motility, and European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition consensus. *United Eur. Gastroenterol. J.* **10**, 15–40 (2021).