



Ministero della Salute

Consiglio Superiore di Sanità - Sezione III

Il Microbiota umano: dalla ricerca alle applicazioni cliniche. Raccomandazioni e Linee di indirizzo

GIUGNO 2018

**Il Microbiota umano: dalla ricerca alle applicazioni cliniche.
Raccomandazioni e Linee di indirizzo**

Gruppo di lavoro “Microbiota”

Patrizia Brigidi, Luciano Cavallo, Valeria Di Giorgi Gerevini, Gabriella Fabbrocini, Antonio Gasbarrini, Anna Gaspardone, Maria Grazia Leone, Anna Maria Littera, Letizia Lombardini, Alessandro Nanni Costa, Anna Teresa Palamara, Cristina Pintus, Eleonora Porcu, Lorenza Putignani, Gabriele Riccardi, Maurizio Sanguinetti, Claudia Santini, Bruno Scarpa, Roberta Siliquini, Annamaria Staiano, Stefania Stefani, Maria Rita Tamburrini, Deborah Traversi, Marina Urpis

***Coordinatrice:** Anna Teresa Palamara*

Si ringrazia Gian Maria Rossolini per il contributo fornito alla stesura del Capitolo relativo al Trapianto di Microbiota

IL MICROBIOTA UMANO: dalla ricerca alle applicazioni cliniche. Raccomandazioni e Linee di indirizzo

INDICE

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI E ACRONIMI

SOMMARIO E RACCOMANDAZIONI

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE AL MICROBIOTA UMANO: RUOLO E FUNZIONI

1.1 Introduzione al microbiota umano

1.2 Generazione e modulazione del microbiota intestinale umano dalla nascita all'età adulta

1.2.1 Il microbiota nelle prime fasi di vita

1.2.2 L'influenza dell'esposoma sulla modulazione del microbiota intestinale umano nel corso della vita

1.3. Definizioni di eubiosi/disbiosi del microbiota intestinale

CAPITOLO 2: PRINCIPI DI REALIZZAZIONE DI MAPPE METAGENOMICHE COSIDDETTE "TARGETED" PER LA DESCRIZIONE TASSONOMICA DEL MICROBIOTA FECALE UMANO.

2.1. Principali caratteristiche delle mappe di microbiota intestinale fecale: utilizzo di piattaforme di *next generation sequencing* (NGS) per l'esecuzione della metagenomica "*TARGETED*" del microbiota intestinale

2.2. Attività preparatoria del flusso metagenomico di analisi di campioni fecali per la generazione di mappe di microbiota fecale

2.3. Standardizzazione dei processi diagnostici NGS associati a fase pre-analitica, analitica, post-analitica

2.4. Conclusioni Operative, Box 2.1-2.4

CAPITOLO 3: INTEGRATORI ALIMENTARI CONTENENTI CELLULE MICROBICHE VIVE, PREBIOTICI, PRODOTTI BIOTERAPEUTICI ATTIVI VIVI E DISPOSITIVI MEDICI CONTENENTI COMPONENTI/LISATI BATTERICI

3.1. Raccomandazioni su integratori alimentari contenenti cellule microbiche vive

3.2 Raccomandazioni su prodotti bioterapeutici vivi (LBP) per uso umano

3.2.1 Caratterizzazione dei microrganismi

3.2.2 Identificazione tassonomica della specie e del ceppo

3.2.3 Produzione

3.2.4 Indicazioni terapeutiche e vie di somministrazione

3.2.5 Valutazione clinica degli LBP

3.3 Raccomandazioni su dispositivi medici: verso dispositivi contenenti componenti/lisati microbici

CAPITOLO 4: TRAPIANTO DI MICROBIOTA INTESTINALE

4.1 Aspetti clinici

4.1.1 Introduzione: valutazione ragionata e appropriatezza clinica del fecal microbiota transplantation o FMT

4.1.2 FMT nel paziente adulto e in quello pediatrico

4.1.3 Standardizzazione dei flussi per l'esecuzione di FMT

4.2 Requisiti regolatori per la preparazione, la conservazione e l'impiego clinico del microbiota fecale destinato al FMT

4.2.1. Requisiti regolatori per la preparazione e conservazione del MFU destinato al FMT

APPENDICE

Programma Nazionale sul Trapianto di Microbiota Fecale umano (FMT) – aspetti regolatori, clinici e organizzativi.

Elenco delle abbreviazioni e acronimi

BSL Livello di Bio-Sicurezza
CBER Center for Biologics Evaluation & Research
CE Comunità Europea
CD Clostridium Difficile
CMV Cytomegalovirus
CNT Centro Nazionale Trapianti
CTD Common Technical Document
DNA DeoxyriboNucleic Acid
EBV Epstein Barr Virus
EFSA European Food Safety Authority
EIA: Enzyme Immunoassay
EMA European Medicines Agency
FDA Food and Drug Administration
FMT Fecal Microbiota Transplantation
GI Gastro Intestinale
GVHD Chronic Graft-Versus-Host Disease
HAV Hepatitis A Virus
HBV Hepatitis B Virus
HBsAg Hepatitis B surface antigen
HCV Hepatitis C Virus
HEV Hepatitis E virus
HIV Human Immunodeficiency Virus
HMP Human Microbiome Project
HTLV Human T-cell leukemia virus
IBD Inflammatory bowel disease
IBS Sindrome dell'Intestino Irritabile
IDA International Depository Authority
IUMS International Union of Microbiological Societies
LBP Live Biotherapeutic Product
LGG Lactobacillus rhamnosus
MDR Multidrug Resistant
MFU Microbiota Fecale Umano
MICI Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali
NGS Next Generation Sequencing
OTU Unità Operative Tassonomiche
PCR C-reactive Protein
PCR Polymerase chain reaction
PEG Polyethylene glycol
rCDI Recurrent Clostridium difficile infection
RNA RiboNucleic Acid
rRNA ribosomal RiboNucleic Acid
SCFA Short Chain Fatty Acids
TSE Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili
UE Unione Europea
VEQ Valutazione Esterna della Qualità
VES Velocità di Eritro-Sedimentazione

SOMMARIO e RACCOMANDAZIONI

Grandi progressi sono stati ottenuti, negli ultimi anni, nelle conoscenze relative alla composizione (microbiota) e all'espressione genica (microbioma) della componente microbica associata a vari distretti corporei (intestinale, respiratoria, cutanea, vaginale, orale ecc.). Il trasferimento alla pratica clinica delle conoscenze raggiunte può costituire una grande potenzialità per lo sviluppo di nuovi strumenti ad alta efficacia per la gestione diagnostico-terapeutica di molte patologie. Considerando che la maggior parte delle applicazioni cliniche ad oggi disponibili riguardano il microbiota intestinale, questo documento sarà focalizzato principalmente sugli sviluppi diagnostico-terapeutici in questo settore.

In tale contesto, l'applicazione di tecnologie meta-omiche e omiche (metagenomica, metabolomica, proteomica e metaproteomica), basata su avanzate procedure analitiche e computazionali, fornisce strumenti efficaci e dinamici. Purtroppo, l'utilizzo di piattaforme diverse e di metodi originali sviluppati *in house*, nonché la diffusione di strutture che operano nel settore al di fuori di una adeguata validazione, rappresenta un serio ostacolo per il consolidamento e l'allargamento su larga scala dei risultati, pur promettenti, finora ottenuti.

L'obiettivo generale del Gruppo di Lavoro (GdL), istituito *ad hoc*, in seno alla Sezione III del Consiglio Superiore di Sanità, è stato quello di elaborare linee di indirizzo e raccomandazioni che, partendo dallo stato dell'arte delle conoscenze sul microbiota in relazione alle sue molteplici interazioni con l'organismo ospite e l'ambiente esterno e, tenendo conto delle problematiche inerenti alle possibili applicazioni nella pratica clinica, fornissero gli strumenti utili ad assicurare sul territorio nazionale la massima omogeneità nei metodi, nelle piattaforme e nelle procedure per le eventuali applicazioni in diagnostica, nonché la massima chiarezza negli aspetti regolatori relativi all'utilizzo dei probiotici come integratori, farmaci o dispositivi medici.

L'ottica nella quale il GdL si è mosso è stata quella di favorire lo sviluppo di applicazioni pre-cliniche e cliniche importanti per:

1. facilitare l'applicazione clinica delle conoscenze nell'ambito del microbiota definendo profili-tipo associati a singoli individui, gruppi di età, gruppi di patologie per la caratterizzazione di stati di eubiosi e disbiosi del microbiota nelle età pediatriche, nell'adulto e nell'anziano;
2. favorire la standardizzazione dei protocolli diagnostici basati su tecnologie omiche (es. standardizzazione della raccolta e trattamento del campione, ottimizzazione delle procedure omiche e delle pipelines bioinformatiche interpretative dei big data), definendo altresì le caratteristiche di operatori specialisti in "microbiologia del microbiota", in grado di fornire strumenti pre-clinici e clinici, di concerto con altri specialisti interessati al microbiota e alle sue applicazioni;
3. definire il ruolo dei probiotici nel migliorare l'equilibrio del microbiota e la loro eventuale efficacia nel mantenere/ripristinare lo stato di salute, descrivendo altresì lo stato attuale degli aspetti regolatori e formulando indicazioni per una loro revisione laddove ritenuto utile;

4. allestire programmi standardizzati di fecal microbiota transplantation (FMT) sul territorio nazionale.

BOX 1. *Il Gruppo di Lavoro sul Microbiota della Sezione III intende col presente documento gettare le basi scientifiche per un tavolo permanente di studio sul microbiota umano che fornisca strumenti di lavoro utili all'approfondimento e all'aggiornamento in merito alla tematica in oggetto, e alle sue possibili applicazioni cliniche.*

Pertanto, in considerazione dei rapidi progressi della ricerca e delle sue applicazioni in ambito diagnostico e terapeutico, si prevede di procedere con successivi e continui lavori di revisione ed estensione del presente documento, al fine di contribuire alla trasferibilità dei risultati ottenuti dalla ricerca alla pratica clinica garantendo sicurezza, omogeneità applicativa e corrispondenza a procedure adeguatamente standardizzate ed aderenti allo stato dell'arte. Inoltre, tenendo conto del rapido incremento nelle evidenze scientifiche inerenti al ruolo di componenti non batteriche del microbioma, quali virus (viroma), funghi (micobioma) (Park & Zao, 2018) e parassiti (Marzano et al., PLoS Negl Trop Dis. 2017 Nov 2;11(11):e0005916. "Omic" investigations of protozoa and worms for a deeper understanding of the human gut "parasitome") sarà necessario un prossimo aggiornamento finalizzato in modo particolare a questi specifici settori.

Raccomandazioni alle Istituzioni per lo sviluppo di applicazioni cliniche basate sul Microbiota

Al fine di favorire lo sviluppo della ricerca sul Microbiota e sulle sue applicazioni in ambito diagnostico-terapeutico, è necessario individuare e rendere facilmente accessibili sul territorio strumenti che consentano agli operatori di riferirsi a dati ottenuti su larga scala e ad alto livello di standardizzazione. Purtroppo, a differenza di molti altri Paesi europei, in Italia non è stato mai avviato un Progetto Nazionale per la raccolta dei dati su tutto il territorio. Nonostante questo, molti ricercatori italiani hanno partecipato, grazie alla loro personale competenza e autorevolezza scientifica, a progetti europei sul tema specifico, ma la mancanza di dati "italiani" costituisce di fatto un grave handicap per la competitività del Paese, con particolare riguardo allo sviluppo di tecnologie applicative a livello diagnostico e terapeutico.

A partire da queste considerazioni, il GdL raccomanda alle varie Istituzioni coinvolte nella ricerca sul Microbiota le seguenti azioni:

- ***pianificare studi*** per la raccolta di dati a livello nazionale e la loro stratificazione per gruppi di età, stili di vita, dieta, ecc. ***mediante la costituzione di un Consorzio di esperti nel settore del microbiota che cooperino nella creazione e gestione della rete;***
- ***costituire una banca dati nazionale pubblica che contenga profili metagenomici di microbiota intestinale e di altri distretti corporei, possibilmente correlati a dati di fenomica (es. dati anamnestici, di laboratorio, etc), certificati per standardizzazione***

condivisa delle procedure omiche (Knight R et al. – Best practice for analysing microbiomes – Nature rev Microbiol 2018, 22 May; Putignani *et al.*, 2016 - Inflamm Bowel Dis. 2016; 22(2):487-504), che possa essere costruita e realizzata mediante Fondi Pubblici del Ministero della Salute in cooperazione con altre Istituzioni;

- ***pianificare studi tesi a tracciare profili di microbiota in varie fasce di età e in vari distretti corporei che abbiano lo scopo di definire, per quanto possibile, profili transizionali di eubiosi-disbiosi sui quali basare eventuali interventi mirati al mantenimento/ripristino dello stato di salute e di wellness;***
- ***favorire*** l'utilizzo nella pratica clinica delle nuove applicazioni diagnostiche del microbiota mediante l'interlocazione continua con le *governance* sanitarie che hanno la responsabilità di consentire l'utilizzo e "la messa a sistema" delle nuove tecnologie disponibili.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE AL MICROBIOTA UMANO - RUOLO E FUNZIONI

1.1 Introduzione al microbiota intestinale umano

Il tratto gastrointestinale (GI) è un sistema complesso che comprende un contenuto fecale caratterizzato da più di 10^{12} batteri per grammo di feci, a cui diamo il nome di “microbiota”. Il genoma del microbiota intestinale è almeno 100 volte superiore a quello umano e si definisce “microbioma”. Grazie a questo immenso patrimonio di geni, il microbiota intestinale svolge, con le sue funzioni costitutive e funzionali, un ruolo cruciale nell’impatto sullo stato di salute, agendo come barriera nei confronti dei microrganismi patogeni, modulando la risposta immunitaria ed esercitando funzioni metaboliche centrali nell’organismo ospite, che per questo motivo deve essere considerato come un sistema complesso e, quindi, come un “superorganismo”.

Variazioni nella composizione e nell’espressione genica del microbiota intestinale sono associate al rischio di insorgenza di varie patologie del tratto GI, (malattie infiammatorie croniche intestinali, sindrome del colon irritabile, celiachia, ecc.), ma sembrano coinvolte anche nella insorgenza e nella progressione di importanti malattie sistemiche non trasmissibili (allergie, malattie metaboliche, oncologiche, neurodegenerative e neuro-infiammatorie croniche ecc.) (Lynch & Pedersen, 2016).

L’avvento e il continuo sviluppo di tecnologie “meta-omiche” e computazionali sta fornendo strumenti rivoluzionari (“*systems biology*”) per lo studio del microbiota, mettendo in luce molti aspetti inerenti alla sua modulazione e le molteplici interazioni con l’ambiente esterno (esposoma), con l’alimentazione (foodoma) e con agenti patogeni (infettoma) (Putignani *et al.*, 2016), nel contesto della variabilità genetica dell’ospite (Lynch & Pedersen, 2016). Tali tecnologie permettono studi avanzati di comunità microbiche complesse, incluso il microbiota intestinale, mediante produzione dei cosiddetti *big data* (Merelli *et al.*, 2014). Tuttavia, come indicato dalla scuola di Didier Raoult (Lagier *et al.*, 2012), l’approccio colturomico, mirato a coltivare e identificare batteri ad oggi sconosciuti del microbiota mediante nuovi approcci integrati genomici e coltura-indipendenti, rimane essenziale per complementare informazioni sul microbiota ottenute mediante metagenomica “*targeted*” (metatassonomia), ossia ottenuta mediante sequenziamento del gene 16S rRNA dell’intera comunità microbica.

Esistono, allo stato attuale, varie evidenze che supportano l’idea che composizione e attività del microbiota intestinale possano influenzare gli aspetti cruciali della crescita, sviluppo, invecchiamento e malattia (Lynch & Pedersen, 2016). La dieta è uno dei *determinanti* chiave di variabilità delle comunità microbiche intestinali capace di modulare le abbondanze relative dei vari gruppi microbici e, quindi, le relative funzioni metaboliche. Metaproteomica e metabolomica della nutrizione umana (“*foodomica*”) stanno aiutando a chiarire le complesse interazioni tra dieta,

struttura e funzione dell'ecosistema microbico intestinale e salute dell'ospite, mettendo in luce una forte variabilità interindividuale nella risposta agli interventi nutrizionali. La conoscenza del profilo microbico individuale è dunque essenziale per la definizione di diete personalizzate (Kinross *et al.*, 2011). Allo stesso modo, è stato dimostrato che il microbiota intestinale può influenzare l'efficacia di trattamenti farmacologici; pertanto, la sua caratterizzazione può essere rilevante anche per il successo di strategie terapeutiche.

Allo stato attuale è possibile realizzare carte meta-omiche di microbiota intestinale sulla base della valutazione di:

- a) enterotipi metatassonomici individuo- ed età-dipendenti per la descrizione di microbioti intestinali in condizioni di salute e malattia;
- b) enterofenotipi metabolici e fenotipici clinico-osservazionali, integrando dati metabolomici e anamnestici;
- c) enterofenotipi metatassonomici, metabolomici e clinici integrati.

1.2 Generazione e modulazione del microbiota intestinale umano dalla nascita all'età adulta

Il lavoro di caratterizzazione di microbioti in varie età della vita e in diverse condizioni fisiologiche e patologiche può essere realizzato solo grazie alla sinergica interazione interdisciplinare tra Microbiologi, Clinici ed *Esperti in Metodologie Omiche e Bioinformatiche*. Sono di seguito riportati alcuni esempi di studi pubblicati nel settore

1.2.1 Il microbiota nelle prime fasi di vita

Benché l'ipotesi paradigmatica che alla nascita l'intestino del neonato sia sterile ("*sterile womb paradigm*") sia stata recentemente rivisitata ("*in utero colonization*"), ancora oggi si ritiene che l'intestino del neonato sia colonizzato da batteri provenienti prevalentemente dalla madre (parto naturale), ma anche dall'ambiente esterno (parto cesareo) (Neu, 2015; Rutayisire *et al.*, 2016; Perez-Munoz *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2017; Rautava, 2017; Indrio *et al.*, 2017). La formazione dell'ecosistema microbiota intestinale è un processo complesso ma continuo, influenzato da vari determinanti di variabilità sia endogeni che esogeni, che producono effetti immediati al momento del parto e possono protrarsi, almeno in parte, per diversi anni durante l'infanzia (Adlerberth & Wold, 2009; Rutayisire *et al.*, 2016; Salminen *et al.*, 2004; Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Rutayisire *et al.*, 2016, Hill *et al.*, 2017). Come l'inoculo batterico acquisito alla nascita si articola successivamente nella differenziazione dei diversi ecosistemi microbici, in diversi distretti dell'organismo ospite, è argomento di grande discussione nella comunità scientifica (Del Chierico *et al.*, 2015).

Sembra che gli ecosistemi microbici dell'ospite supportino la selezione di un gruppo di comunità ben adattate, originatesi dalla comunità dell'inoculo colonizzante, mentre la genetica dell'ospite, insieme ad altre condizioni quali la dinamica del parto, le modalità di allattamento, lo svezzamento ecc. ne influenzino la composizione successiva, modulando le caratteristiche ambientali della nicchia ecologica. I primi colonizzatori (*Enterobatteri*) sono progressivamente sostituiti dai

Bifidobatteri e da batteri appartenenti ai phyla Firmicutes e Bacteroidetes. L'introduzione di cibi solidi determina la comparsa dei beta-Proteobatteri.

La modalità del parto è uno dei principali determinanti di insorgenza e modulazione del microbiota intestinale del neonato. Bambini nati da parto naturale sviluppano comunità microbiche simili al microbiota vaginale delle loro madri (es: *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., *Sneathia* spp.), mentre bambini nati da parto cesareo sono caratterizzati da comunità microbiche simili a quelle della superficie epidermica (es: *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp.). Tale impronta iniziale potrebbe differenzialmente contribuire all'insorgenza di patologie descritte come più frequenti in bambini nati da parto cesareo piuttosto che in quelli nati da parto naturale, quali obesità, patologie atopiche (allergie e asma), artrite giovanile, malattie infiammatorie croniche intestinali, diabete mellito tipo 1 e tipo 2, e forse anche disturbi della funzione cerebrale (Negele *et al.*, 2004; Penders *et al.*, 2007; Bager *et al.*, 2008; Kolokotroni *et al.*, 2015; Chang & Neu, 2015; Sevelsted *et al.*, 2015; Paun *et al.*, 2016; Indrio *et al.*, 2017; Keag OE *et al.*, 2018). La comunità microbica vaginale è caratterizzata da relativamente poche specie batteriche, la cui variabilità è interindividuale e funzione anche dell'etnia (Ravel *et al.*, 2011), con il genere *Lactobacillus* che da solo costituisce il 50% di tutto l'ecosistema microbico. Durante il parto, l'ecosistema vaginale continua ad essere prevalentemente costituito da Lattobacilli e da *Prevotella* spp. Durante la gravidanza i cambiamenti delle comunità microbiche vaginali rappresentano un evento critico per il nascituro, fornendo serbatoi di microbi benefici solo in condizioni di salute della madre (Dominguez-Bello *et al.*, 2011). Addirittura, l'esposizione del neonato al microbiota vaginale materno immediatamente dopo la nascita (vaginal seeding) è stata proposta come una strategia di intervento, per minimizzare le variazioni del microbiota indotte dal parto cesareo (Dominguez-Bello *et al.*, 2016).

La profilassi antibiotica intra-parto determina nel neonato lo sviluppo di un microbiota differente rispetto a quello dei nati da madri non trattate, favorendo una iper-rappresentazione di Enterococchi e *Clostridium* e una sotto-rappresentazione di Bacteroidi e Parabacteroidi (Azad *et al.*, 2016; Corvaglia *et al.*, 2016).

Esposizione perinatale agli antibiotici: la terapia con antibiotici, più frequente e prolungata nei neonati pretermine e a basso peso, certamente modifica il microbiota intestinale con effetti a distanza sull'insorgenza di patologie successive (Bokulich *et al.*, 2016). Si è ipotizzato, in particolare, che l'esposizione perinatale abbia un effetto favorente lo sviluppo dell'obesità (Turta & Rautava, 2016; Shao *et al.*, 2017; Rasmussen *et al.*, 2018)

Anche **la nascita pretermine** e il basso peso alla nascita determinano effetti sia diretti che indiretti (dipendenti dal maggior uso di antibioticoterprie e dall'alimentazione frequentemente di tipo parenterale) sulla composizione del microbiota rispetto alla nascita a termine, almeno nel primo semestre di vita, con *Bifidobatteri* sotto-rappresentati e *Proteobatteri* iper-rappresentati (Forsgren *et al.*, 2017; Hill *et al.*, 2017).

Nei neonati con peso molto basso alla nascita vi è elevata presenza di potenziali patogeni (*Enterobatteri* e *Stafilococchi*) e bassa prevalenza di *Bifidobatteri*, *Batteroidi* e *Lattobacilli* (Drell *et al.*, 2014).

L'allattamento materno modula ulteriormente il microbiota del neonato con un importante impatto sin dalle prime ore di vita (Conway & Cohen, 2015; Nash *et al.*, 2017). È stato ipotizzato che, oltre che per contatto con la cute materna, batteri intestinali commensali provenienti dall'intestino materno (*Lactobacillus* spp. e anaerobi obbligati quali il *Bifidobacterium* spp.) pervengano al neonato attraverso un percorso entero-mammario (Rodriguez, 2014). Inoltre, il latte materno contiene un ampio spettro di oligosaccaridi che promuovono la crescita e l'attività di specifiche popolazioni batteriche, in particolare *Bifidobacterium* e *Bacteroides* spp. (Jost *et al.*, 2015). Il microbiota dei neonati allattati con formula, invece, presenta una prevalenza di γ -Proteobacteria pro-infiammatori. È stato ipotizzato, inoltre, che la elevata concentrazione di alcuni ceppi batterici, in particolare di *Bifidobacteri infantis*, nel microbiota intestinale dei neonati allattati con latte materno sia positivamente associata a una protezione immunitaria, attraverso numerosi meccanismi (Houghteling & Walker 2015). L'allattamento materno risulta, pertanto, particolarmente indicato in tutte le situazioni neonatali non ottimali, quali prematurità, basso peso, parto cesareo (Hill *et al.*, 2017).

1.2.2 L'influenza dell'esposoma sulla modulazione del microbiota intestinale umano nel corso della vita

È ormai consolidato il fatto che il microbiota intestinale descrive una vera e propria traiettoria adattativa nel corso della nostra esistenza, modificando la sua composizione e, pertanto, anche la sua funzionalità, dall'infanzia all'età adulta. Il complesso e dinamico processo di formazione dell'ecosistema microbico intestinale a cui si assiste durante il periodo neonatale, come descritto nel paragrafo precedente, generalmente termina nell'arco dei primi tre anni di vita quando, con lo svezzamento e quindi l'introduzione di cibi solidi, lo sviluppo della mucosa intestinale e la maturazione del sistema immunitario, si ha l'acquisizione di quello che viene definito il microbiota “*adult-type*”, ovvero un ecosistema microbico caratterizzato da maggiore stabilità e da una complessità via via crescente, sia a livello tassonomico che funzionale (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016).

Dal punto di vista della composizione, il microbiota intestinale adulto mostra un'elevata diversità a livello di specie, che tuttavia si riduce ad alti livelli filogenetici. Infatti, la maggior parte dei batteri presenti nell'intestino di individui sani appartiene a due soli phyla, Firmicutes e Bacteroidetes, che insieme costituiscono oltre il 90% dell'ecosistema microbico intestinale adulto. Membri di Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Lentisphaerae e Spirochaetes sono normalmente rappresentati ma le loro abbondanze relative sono spesso inferiori all'1% (Candela *et al.*, 2014). A livello di famiglia, il microbiota intestinale adulto è principalmente caratterizzato dalla presenza di *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Bacteroidaceae*, che includono

microrganismi noti a produrre acidi grassi a corta catena (*short-chain fatty acids*, SCFA). Gli SCFA (principalmente acetato, propionato e butirato) sono metaboliti microbici derivanti dalla fermentazione di polisaccaridi complessi, che giocano un ruolo chiave e multifattoriale nella fisiologia umana e sono particolarmente importanti per il mantenimento dell'omeostasi metabolica e immunologica (Koh *et al.*, 2016). Tra le altre famiglie normalmente presenti, ma generalmente sub-dominanti nel microbiota adulto, vi sono *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Streptococcaceae*, *Rikenellaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Prevotellaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Desulfovibrionaceae*. Alcune di queste famiglie sono state correlate a determinate variabili ambientali e, in particolar modo, a precise abitudini alimentari, come *Prevotellaceae*, la cui abbondanza è correlata all'*intake* di fibre (Flint *et al.*, 2008). Variazioni nell'abbondanza relativa di altre famiglie sono state, invece, riscontrate nel contesto di diverse patologie, enteriche e non. Ad esempio, le famiglie *Enterobacteriaceae* e *Desulfovibrionaceae* includono al loro interno batteri opportunisti, detti anche "patobionti", capaci di proliferare in condizioni di infiammazione e sostenere il processo infiammatorio stesso, con importanti ripercussioni sullo stato di salute dell'ospite (Bäumler and Sperandio, 2016).

Il microbiota intestinale adulto continua ad essere un ecosistema altamente dinamico, in grado di modificare la sua struttura e le sue funzionalità in risposta a cambiamenti in diverse variabili endogene e ambientali, quali stato fisiologico, età, dieta o, in senso lato, stile di vita. In un contesto mutualistico, ovvero di eubiosi, queste risposte dell'ecosistema sono funzionali al mantenimento dell'omeostasi dell'ospite (Candela *et al.*, 2012).

Tuttavia, con l'avanzare dell'età, il microbiota intestinale può subire importanti modifiche, con compromissione della sua struttura. In particolare, nelle persone anziane e soprattutto in quelle fragili, l'ecosistema microbico intestinale presenta un assetto generalmente infiammato e pro-infiammatorio, con riduzione della biodiversità e l'incremento di patobionti (Claesson *et al.*, 2012). La cosa interessante è che in persone particolarmente longeve è stata comunque rilevata anche un'elevata abbondanza e/o prevalenza di batteri considerati *health-promoting*, quali *Bifidobacterium*, *Akkermansia* e *Christensenellaceae*, che potrebbero pertanto giocare un ruolo nella longevità, supportando il mantenimento dello stato di salute (Biagi *et al.*, 2016).

Ad oggi esistono evidenze che dimostrano che, oltre ai fattori genetici (Hill *et al.*, 2017) ed epigenetici, alle interazioni con il sistema immunitario, ecc. l'esposizione a diversi fattori, (esposoma) influenza in modo significativo la composizione e l'espressione del microbiota intestinale, contribuendo alla sua plasticità (microbiota dinamico) (Falony *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2018; Rothschild *et al.*, 2018). Tra questi particolare importanza è rivestita da:

Fattori nutrizionali: l'età di svezzamento, la dieta e gli stili nutrizionali rappresentano uno dei più importanti determinanti postnatali di diversità microbica del tratto gastrointestinale (Penders *et al.*, 2006; Aldenberg, 2014), specie nel primo triennio di vita, periodo considerato "*window opportunity*" per la modulazione del microbiota (Laursen *et al.*, 2017). Come descritto sopra, alla

fine del primo triennio di vita, con maggiore rapidità nei bambini che hanno iniziato più precocemente lo svezzamento, si realizza il profilo batterico dell'adulto, composto prevalentemente dai phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes* i cui rapporti sono strettamente influenzati dalla dieta (De Filippo *et al.*, 2010; Koenig *et al.*, 2011; Bergström *et al.*, 2014).

De Filippo *et al.* (2010) hanno infatti messo in evidenza che, benché durante l'allattamento materno avessero una dominanza simile di specie *Bifidobacterium*, dopo lo svezzamento il microbiota dei bambini africani risultava molto più ricco di *Bacteroidetes* rispetto a quello dei bambini italiani, con specie molto diverse, più adatte di altre a liberare energia da cibo vegetale, che rappresenta il costituente principale della dieta dei bambini africani. Successivi studi hanno confermato questa eterogeneità legata alle abitudini alimentari nel lungo termine (Voreades *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2017). L'insieme di queste osservazioni supporta fortemente la possibilità che la composizione del microbiota possa variare geograficamente adattandosi alla dieta dell'ospite (Voreades *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2017) e che questo adattamento inneschi riarrangiamenti genici con batteri ambientali (Del Chierico *et al.*, 2012). Le evidenze suggeriscono che contenute variazioni della dieta sul lungo periodo hanno un ampio effetto sul microbiota intestinale, mentre cambiamenti estremamente radicali conducono a profili di microbiota, simili in differenti soggetti, che si osservano entro pochi giorni dall'inizio del nuovo regime alimentare (Gilbert, 2018). Al momento, tuttavia, non è perfettamente noto come l'introduzione di nuovi componenti alimentari nella dieta interferisca con lo sviluppo del microbiota intestinale. Delle evidenze sono state prodotte nei seguenti casi:

- effetto benefico sul microbiota e sulla salute umana di una dieta ricca di fibre (Makki, 2018) e di una dieta vegetariana anche se l'effetto benefico, in quest'ultimo caso, è osservabile prevalentemente sul lungo periodo (Losasso, 2018; Zhang, 2018);
- modulazione della glicemia - mediata dal microbiota - in seguito all'assunzione di specifici alimenti (Houghton, 2018) ;
- modulazione da parte del microbiota della concentrazione della leptina nell'uomo e della conseguente variazione nella sensazione di appetito e/o sazietà (Seridi, 2018).

La dieta costituisce un determinante di variabilità ideale per intervenire con un basso rischio, in modo culturalmente e psicologicamente accettabile, sulla modulazione del microbiota.

Resta tuttavia aperta la questione dell'impatto reale delle interazioni tra dieta e microbiota tali da produrre un effetto positivo certo sull'organismo, ivi incluso il condizionamento delle preferenze alimentari verso una nutrizione equilibrata (Gilbert, 2018) e altri fattori dell'esposoma, tra cui abitudini familiari, presenza di animali da compagnia, caratteristiche ambientali urbane o rurali, ecc. (Laursen *et al.*, 2017; Davis *et al.*, 2017).

Stili di vita: l'attività fisica, che riduce l'infiammazione e lo stress ossidativo, produce cambiamenti generalmente benefici nella struttura del microbiota, come aumento della biodiversità e dell'abbondanza relativa di *Akkermansia* (Clarke *et al.*, 2014). Al contrario, un effetto potenzialmente negativo è indotto dalla carenza di sonno e da elevati livelli di stress che

modificano le proporzioni dei phyla Bacteroidetes e Actinobacteria (Karl, 2017). Infine l'esposizione a differenti ambienti e zone di residenza, ivi inclusa l'esposizione occupazionale, sono noti influire sulla composizione del microbiota (Gilbert, 2018). Ad esempio, nel microbiota di popolazioni urbane occidentali rispetto a quello di popolazioni che vivono in zone rurali e seguono uno stile di vita tradizionale, è stato riscontrato un maggior quantitativo di geni coinvolti nella detossificazione di xenobiotici (come conservanti alimentari e sottoprodotti del petrolio) e nella resistenza agli antibiotici, ampiamente utilizzati in campo medico ma anche negli allevamenti (Rampelli *et al.*, 2015). Inoltre, è stato dimostrato che persone che condividono gli stessi spazi, condividono anche una simile struttura del microbiota intestinale (Rothschild *et al.*, 2018)

Quantità dei nutrienti assunti: particolarmente in età pediatrica e senile, la sottanutrizione e la malnutrizione rappresentano situazioni che incidono significativamente sulla composizione del microbiota intestinale (Subramian *et al.*, 2014; Voreades *et al.*, 2014). Allo stesso modo, il digiuno, inclusi periodi di nutrizione parenterale totale, può sbilanciare la configurazione del microbiota verso un profilo mucolitico e pro-infiammatorio (Alverdy *et al.*, 2014).

Antibioticoterapia: particolarmente in età pediatrica, soprattutto per i bambini ricoverati nelle unità di terapia intensiva neonatale, e in età anziana, nei reparti di medicina interna, l'antibioticoterapia determina una soppressione sia delle specie benefiche che di quelle patogene, permettendo la crescita prevalente di ceppi antibiotico-resistenti. Gli effetti negativi sul microbiota intestinale variano in base al principio attivo, alla dose ed alla modalità di somministrazione dell'antibiotico somministrato (Voreades *et al.*, 2014). Recenti evidenze di co-coltura dimostrano che patogeni multi-resistenti sono in grado di distinguere tra co-patogeni, commensali, probiotici e cellule dell'ospite, gettando le basi per capire come il microbiota possa influire sull'insorgenza di patologie infettive persistenti difficili da trattare (Chan, 2018).

1.3. Definizione di eubiosi/disbiosi del microbiota intestinale

Gli studi sul microbiota intestinale, basati sul NGS (*next generation sequencing*) del gene 16S rRNA batterico, si sono rapidamente diffusi negli ultimi 10 anni. È evidente, analizzando i dati pubblicati, che questi studi sono stati in grado di produrre delle solide informazioni sulla struttura e sulle potenzialità funzionali delle comunità microbiche che popolano il tratto GI umano, evidenziando una elevata variabilità interindividuale e una apparente stabilità intraindividuale (Heintz-Buschart *et al.*, 2016). Tali studi hanno consentito di differenziare situazioni di eubiosi o normobiosi, ovvero di microbiota *in salute*, da situazioni di disbiosi o di squilibrio del microbiota. In particolare, è stato possibile caratterizzare i profili disbiotici del microbiota nel contesto di patologie quali IBS, morbo di Crohn, coliti ulcerose, obesità, disfunzioni epatiche non alcol-correlate e diabete di tipo 1 e 2 (Vernocchi *et al.*, 2016). Inoltre, sono oggi indagate potenziali relazioni tra una struttura alterata del microbiota intestinale e altri profili patologici, tra i quali i disordini dello spettro autistico, la sclerosi multipla e le patologie neurodegenerative, così come le malattie oncologiche (Li *et al.*, 2017). Le alterazioni disbiotiche del microbiota generalmente

coinvolgono la perdita di microrganismi *health-associated* (principalmente produttori di SCFA), l'aumento di patogeni opportunisti (come batteri mucolitici, produttori di idrogeno, metano e acido solfidrico, e proteobatteri con aumento dell'endotossina lipopolisaccaride (LPS) e/o un'ampia destrutturazione dell'ecosistema microbico, con conseguenze importanti sullo stato di salute dell'ospite, in termini di compromissione dell'integrità della mucosa intestinale, infiammazione acuta della mucosa stessa con traslocazione dei batteri e dei loro frammenti, effetti tossici sui colonociti, danno ossidativo, alterazione del pattern di citochine prodotte, e altri effetti a livello sistemico (Craven *et al.*, 2012; Le Chatelier *et al.*, 2013; Duvallet *et al.*, 2017).

Un indicatore di alterazione dello stato di eubiosi è anche la diminuzione della diversità microbica. Questa viene valutata attraverso degli indici di ricchezza microbica, ovvero valutazioni quantitative della numerosità delle specie presenti in una comunità (diversità alfa) (Soderborg *et al.*, 2016). Inoltre, possono essere identificati altri parametri come la riduzione del rapporto tra Firmicutes e Bacteroidetes, in particolare con aumento dei *Clostridium* e *Bacteroides*, e riduzione di *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Prevotella* (Gulden *et al.*, 2015). In letteratura sono proposti alcuni test basati sulla misura di un indice di disbiosi che sembra essere valido in specifici campi di applicazione, es. per il trattamento dell'IBD (Casen *et al.*, 2015; Putignani *et al.*, 2016). I presupposti per sviluppare strumenti diagnostici e prognostici di disbiosi sembrano quindi essere presenti ma, al momento, ci troviamo di fronte a evidenze che debbono essere interpretate caso per caso. Il riconoscimento di possibili segnali precoci di transizione da eubiosi a disbiosi è altresì auspicabile come strumento preventivo futuro. Tuttavia, recenti meta-analisi suggeriscono che le disbiosi microbiche intestinali possono modificarsi nel tempo e che, pertanto, la caratterizzazione delle loro dinamiche è importante nella definizione di strategie terapeutiche personalizzate (Halfvarson *et al.*, 2017; Zaneveld *et al.*, 2017). Dall'integrazione degli studi di metagenomica con la metatrascrittomica e la metaproteomica è inoltre emerso che i geni funzionali individuati dalla metagenomica non necessariamente sono anche espressi. Per questa ragione, solo l'integrazione degli approcci omici potrà condurre alla reale comprensione degli stati di eubiosi e disbiosi del microbiota intestinale e delle loro dinamiche, e di come sia possibile modulare eventuali sbilanciamenti (Heintz-Buschart *et al.*, 2016).

BOX 1.1. È cruciale approfondire il percorso di alterazione dell'omeostasi intestinale dalle condizioni fisiologiche (eubiosi) alla fase di disbiosi e il suo ruolo nell'instaurarsi della patologia. In questo percorso, è fortemente necessario produrre sorveglianze epidemiologiche su larga scala per sopperire alla mancanza di dati che descrivano i profili interindividuali in popolazioni pediatriche, adulte e dell'anziano. Studi cronologici consequenziali, in grado di identificare *su campo* il processo omeostasi-disbiosi-malattia potrebbero essere particolarmente importanti in ambito pediatrico per identificare marker di patologia e individuare strategie preventive personalizzate. Lo stesso approccio può essere esteso, ovviamente anche a coorti di adulti e di soggetti anziani per monitorare nelle diverse età il passaggio da eubiosi a disbiosi intestinale.

Bibliografia

1. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 2009; 98(2):229-238. *Review.*
2. Albenberg LG, Wu GD. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology.* 2014 May;146(6):1564-72. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.058. Epub 2014 Feb 4.
3. Alverdy J, Gilbert J, DeFazio JR, Sadowsky MJ, Chang EB, Morowitz MJ, Teitelbaum DH. Proceedings of the 2013 A.S.P.E.N. Research workshop: the interface between nutrition and the gut microbiome: implications and applications for human health [corrected]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2014 Feb;38(2):167-78. doi: 10.1177/0148607113517904. Epub 2013 Dec 30.
4. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Sears MR, Becker AB, Scott JA, Kozyrskyj AL. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2013; 9(1):15.
5. Azad MB, Konya T, Persaud RR, Guttman DS, Chari RS, Field CJ, Sears MR, Mandhane PJ, Turvey SE, Subbarao P, Becker AB, Scott JA, Kozyrskyj AL; CHILD Study Investigators. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG.* 2016; 123(6):983-93.
6. Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 634–642.
7. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature.* 2016; 535(7610): 85-93.
8. Bergström A, Skov TH, Bahl MI, Roager HM, Christensen LB, Ejlerskov KT, Mølgaard C, Michaelsen KF, Licht TR. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl Environ Microbiol.* 2014 May; 80(9):2889-2900.
9. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turrioni S, Consolandi C, Quercia S, Scurti M, Monti D, Capri M, Brigidi P, Candela M. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol.* 2016; 26(11): 1480-5.
10. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev.* 2010; 86(Suppl 1):13–15.
11. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, D Lieber A, Wu F, Perez-Perez GI, Chen Y, Schweizer W, Zheng X, Contreras M, Dominguez-Bello MG, Blaser MJ. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med.* 2016 Jun 15; 8(343):343ra82.
12. Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Oct 8; (4):CD006135. *Review.*
13. Burcelin *Molecular Metabolism* 5 (2016) 771e781
14. Candela M, Biagi E, Maccaferri S, Turrioni S, Brigidi P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends Microbiol.* 2012; 20(8): 385-91.
15. Candela M, Turrioni S, Biagi E, Carbonero F, Rampelli S, Fiorentini C, Brigidi P. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(4): 908-22.
16. Casen e t al., *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2015 42:71-83
17. Chan AP, Choi Y, Brinkac LM, Krishnakumar R, DePew J, Kim M, Hinkle MK, Lesho EP,

- Fouts DE. Multidrug resistant pathogens respond differently to the presence of co-pathogen, commensal, probiotic and host cells. *Sci Rep.* 2018 Jun 5;8(1):8656. doi: 10.1038/s41598-018-26738-1.
18. Chang L, Neu J. Early factors leading to later obesity: interactions of the microbiome, epigenome, and nutrition. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2015; 45(5):134-142
 19. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* 2012; 488(7410): 178-84.
 20. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, Hayes P, O'Reilly M, Jeffery IB, Wood-Martin R, Kerins DM, Quigley E, Ross RP, O'Toole PW, Molloy MG, Falvey E, Shanahan F, Cotter PD. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut.* 2014; 63(12): 1913-20.
 21. Conway T, Cohen PS. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr.* 2015 June; 3(3).
 22. Corvaglia L, Tonti G, Martini S, Aceti A, Mazzola G, Aloisio I, Di Gioia D, Faldella G. Influence of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis for Group B Streptococcus on Gut Microbiota in the First Month of Life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016; 62(2):304-308.
 23. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JL, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science.* 2009; 326:1694–1697.
 24. Craven et al., *PLoS ONE* 2012 | Volume 7 | Issue 7 | e4159
 25. Crow, J. M. Microbiome: That healthy gut feeling. *Nature.* 2011; 480 (7378):S88-89.
 26. Cuello-Garcia CA, Brożek JL, Fiocchi A, Pawankar R, Yepes-Nuñez JJ, Terracciano L, Gandhi S, Agarwal A, Zhang Y, Schünemann HJ. Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Oct; 136(4):952-61. *Review.*
 27. Davis EC, Wang M, Donovan SM. [The role of early life nutrition in the establishment of gastrointestinal microbial composition and function.](#) *Gut Microbes.* 2017; 8(2):143–171. *Review.*
 28. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:14691–14696.
 29. Del Chierico F, Vernocchi P, Bonizzi L, Carsetti R, Castellazzi AM, Dallapiccola B, de Vos W, Guerzoni ME, Manco M, Marseglia GL, Muraca M, Roncada P, Salvatori G, Signore F, Urbani A, Putignani L. Early-life gut microbiota under physiological and pathological conditions: The central role of combined meta-omics-based approaches. *J Proteomics.* 2012; 75(15):4580-4587. *Review.*
 30. Del Chierico F, Vernocchi P, Petrucca A, Paci P, Fuentes S, Praticò G, Capuani G, Masotti A, Reddel S, Russo A, Vallone C, Salvatori G, Buffone E, Signore F, Rigon G, Dotta A, Miccheli A, de Vos WM, Dallapiccola B, Putignani L. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PLoS One.* 2015 Sep 2;10(9):e 0137347.
 31. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, Pudlo NA, Kitamoto S, Terrapon N, Muller A, Young VB, Henrissat B, Wilmes P, Stappenbeck TS, Núñez G, Martens EC. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell.* 2016; 167(5): 1339-1353.e21.
 32. di Mauro G, Bernardini R, Barberi S, Capuano A, Corraera A, De' Angelis GL, Iacono ID, de Martino M, Ghiglieroni D, Di Mauro D, Giovannini M, Landi M, Marseglia GL, Martelli A,

- Miniello VL, Peroni D, Sullo LRMG, Terracciano L, Vascone C, Verduci E, Verga MC, Chiappini E. Prevention of food and airway allergy: consensus of the Italian Society of Preventive and Social Paediatrics, the Italian Society of Paediatric Allergy and Immunology, and Italian Society of Pediatrics. *World Allergy Organ J.* 2016 Aug 18; 9:28. *Review.*
33. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology.* 2011; 140(6): 1713-1719. *Review.*
 34. 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(26):11971-11975.
 35. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, Bokulich NA, Song SJ, Hoashi M, Rivera-Vinas JI, Mendez K, Knight R, Clemente JC. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med.* 2016 ;22:250–253.
 36. Drell T, Lutsar I, Stšepetova J, Parm U, Metsvaht T, Ilmoja ML, Simm J, Sepp E. The development of gut microbiota in critically ill extremely low birth weight infants assessed with 16S rRNA gene based sequencing. *Gut Microbes.* 2014; 5(3):304-312.
 37. Duvallet C, Gibbons SM, Gurry T, Irizarry RA, Alm EJ. Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *Nat Commun.* 2017; 8(1): 1784.
 38. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., and Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5278): 1635-1638.
 39. Endesfelder et al., *Curr Diab REs* (2016) 16:60
 40. Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, Gil A, Vieites JM, Norin E, Young D, Scott JA, Doré J, Edwards CA; INFABIO team. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology.* 2011 May; 157(Pt 5):1385-1392.
 41. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kurilshikov A, Bonder MJ, Valles-Colomer M, Vandeputte D, Tito RY, Chaffron S, Rymenans L, Verspecht C, De Sutter L, Lima-Mendez G, D'hoë K, Jonckheere K, Homola D, Garcia R, Tigchelaar EF, Eeckhaut L, Fu J, Henckaerts L, Zhernakova A, Wijmenga C, Raes J. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science.* 2016; 352(6285): 560-4.
 42. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, et al., Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:219–226.
 43. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(2): 121-31.
 44. Forsberg A, West CE, Prescott SL, Jenmalm MC. Pre- and probiotics for allergy prevention: time to revisit recommendations? *Clin Exp Allergy.* 2016 Dec ;46(12):1506-1521. *Review.*
 45. Forsgren M, Isolauri E, Salminen S, Rautava S. Late preterm birth has direct and indirect effects on infant gut microbiota development during the first six months of life. *Acta Paediatr.* 2017; 106(7):1103-1109.
 46. Goldenberg JZ, Lytvyn L, Steurich J, Parkin P, Mahant S, Johnston BC. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Dec 22; (12):CD004827. *Review.*
 47. Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, Lo CK, Beardsley J, Mertz D, Johnston BC. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Dec 19; 12:CD006095. *Review.*

48. Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA. The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell*. 2018; 33(4): 570-580.
49. Gulden et al., *Clinical Immunology* (2015) 159, 143-153
50. Gunaratne AW, Makrides M, Collins CT. Maternal prenatal and/or postnatal n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) supplementation for preventing allergies in early childhood. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Jul 22; (7):CD010085. *Review*.
51. Gupta VK, Paul S, Dutta C. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Front Microbiol*. 2017 Jun 23; 8:1162. *Review*.
52. Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, D'Amato M, Bonfiglio F, McDonald D, Gonzalez A, McClure EE, Dunklebarger MF, Knight R, Jansson JK. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2017; 2: 17004.
53. Hehemann J, Correc G, Barbeyron T, et al., Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* 2010; 464:908–912.
54. Heintz-Buschart et al., *Nature Microbiology* 2, 16180 (2016)
55. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB, O'Shea CA, Watkins C, Dempsey E, Mattivi F, Touhy K, Ross RP, Ryan CA, O'Toole PW, Stanton C. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET cohort. *Microbiome*. 2017 Jan 17; 5(1):4.
56. Houghteling PD, Walker WA. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 60(3):294–307. *Review*.
57. Houghton D, Hardy T, Stewart C, Errington L, Day CP, Trenell MI, Avery L. Systematic review assessing the effectiveness of dietary intervention on gut microbiota in adults with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2018 May 12. doi: 10.1007/s00125-018-4632-0.
58. Indrio F, Martini S, Francavilla R, Corvaglia L, Cristofori F, Mastrolia SA, Neu J, Rautava S, Russo Spina G, Raimondi F, Loverro G. Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome, and Long-term Health Development. *Front Pediatr*. 2017; 5:178. *Review*.
59. Jackson MA, Verdi S, Maxan ME, Shin CM, Zierer J, Bowyer RCE, Martin T, Williams FMK, Menni C, Bell JT, Spector TD, Steves CJ. Gut microbiota associations with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nat Commun*. 2018; 9(1): 2655.
60. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev*. 2015 Jul; 73(7):426-437. *Review*.
61. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001; 357:1076–1079.
62. Karl JP, Margolis LM, Madslie EH, Murphy NE, Castellani JW, Gundersen Y, Hoke AV, Levangie MW, Kumar R, Chakraborty N, Gautam A, Hammamieh R, Martini S, Montain SJ, Pasiakos SM. Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017 Jun 1;312(6):G559-G571. doi: 10.1152/ajpgi.00066.2017. Epub 2017 Mar 23.

63. Keag OE, Norman JE, Stock SJ. Long-term risks and benefits associated with cesarean delivery for mother, baby, and subsequent pregnancies: Systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2018; 15(1):e1002494. *Review.*
64. Kinross JM, Darzi AW, Nicholson JK. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.* 2011 Mar 4; 3(3):14.
65. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1:4578-4585.
66. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Microbes and health sackler colloquium: succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1: 4578-85.
67. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* 2016; 165(6): 1332-1345.
68. Kolokotroni O, Middleton N, Gavatha M, Lamnisos D, Proftis KN, Yiallourous PK. Asthma and atopy in children born by caesarean section: effect modification by family history of allergies - a population based cross-sectional study. *BMC Pediatr.* 2012; 12:179.
69. Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Nov 2;2:136. doi: 10.3389/fcimb.2012.00136. eCollection 2012.
70. Laursen MF, Bahl MI, Michaelsen KF, Licht TR. First foods and gut microbes. *Front Microbiol.* 2017 Mar 6; 8:356.
71. Laursen MF, Laursen RP, Larnkjær A, Michaelsen KF, Bahl MI, Licht TR. Administration of two probiotic strains during early childhood does not affect the endogenous gut microbiota composition despite probiotic proliferation. *BMC Microbiol.* 2017 Aug 17; 17(1):175.
72. Laursen MF, Laursen RP, Larnkjær A, Mølgaard C, Michaelsen KF, Frøkiær H, Bahl MI, Licht TR. Faecalibacterium Gut Colonization Is Accelerated by Presence of Older Siblings. *mSphere.* 2017 Nov 29; 2(6).
73. Laursen MF, Zachariassen G, Bahl MI, Bergström A, Høst A, Michaelsen KF, Licht TR. Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. *BMC Microbiol.* 2015; 15:154.
74. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013 Aug 29;500(7464):541-6. doi: 10.1038/nature12506.
75. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (31): 11070-5.
76. Li et al., *Front Cell Neurosci.* 2017; 11: 120
77. Losasso C, Eckert EM, Mastrorilli E, Villiger J, Mancin M, Patuzzi I, Di Cesare A, Cibin V, Barrucci F, Pernthaler J, Corno G, Ricci A. Assessing the Influence of Vegan, Vegetarian and Omnivore Oriented Westernized Dietary Styles on Human Gut Microbiota: A Cross Sectional Study. *Front Microbiol.* 2018 Mar 5;9:317. doi: 10.3389/fmicb.2018.00317. eCollection 2018.
78. Lynch SV, Pedersen O. Human Microbiota *Nature Special* 14 June 2012; *Science, Special Issue Microbiota at work, Vol 352, Issue 6285, 29 April 2016; N Engl J Med* 375; 24, December 15, 2016.

79. Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. Cell Host Microbe. 2018 Jun 13;23(6):705-715. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.012.
80. Mennini M, Dahdah L, Artesani MC, Fiocchi A, Martelli A. Probiotics in Asthma and Allergy Prevention. *Front Pediatr*. 2017 Jul 31; 5:165. *Review*.
81. Merelli I, Pérez-Sánchez H, Gesing S, D'Agostino D., Managing, Analysing, and Integrating Big Data in Medical Bioinformatics: Open Problems and Future Perspectives, *BioMed Research International*, Volume 2014 (2014), Article ID 134023.
82. Moya-Perez A, Luczynski P, Renes IB, Wang S, Borre Y, Ryan CA, Knol J, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Intervention strategies for cesarian section-induced alterations in the microbiota-gut-brain axis. *Nutr Rev*. 2017 Apr; 75(4):225–240. *Review*.
83. Nash MJ, Frank DN, Friedman JE. Early Microbes Modify Immune System Development and Metabolic Homeostasis—The “Restaurant” Hypothesis Revisited. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Dec 13; 8:349. *Review*.
84. Negele K, Heinrich J, Borte M, von Berg A, Schaaf B, Lehmann I, Wichmann HE, Bolte G; LISA Study Group. Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004; 15:48–54.
85. Nermes M, Endo A, Aarnio J, Salminen S, Isolauri E. Furry pets modulate gut microbiota composition in infants at risk for allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 136(6):1688–1690. e1.
86. Neu J. Developmental aspects of maternal-fetal, and infant gut microbiota and implications for long-term health. *Matern Health Neonatol Perinatol*. 2015 Feb 11; 1:6. *Review*.
87. Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1031.
88. Osborn DA, Sinn JK, Jones LJ. Infant formulas containing hydrolysed protein for prevention of allergic disease and food allergy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Mar 15; 3:CD003664. *Review*.
89. Osborn DA, Sinn JK. Probiotics in infants for prevention of allergi *Review.c* disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17; (4):CD006475
90. O'Sullivan A, Farver M, Smilowitz JT. The Influence of Early Infant-Feeding Practices on the Intestinal Microbiome and Body Composition in Infants. *Nutr Metab Insights*. 2015 Dec 16; 8(Suppl 1):1-9.
91. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007; 5:e177.
92. Panduru M, Panduru NM, Sălăvăstru CM, Tiplica G-S. Probiotics and primary prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized con-trolled studies. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015; 29:232–42.
93. Paun A, Danska JS. Modulation of type 1 and type 2 diabetes risk by the intestinal microbiome. *Pediatr Diabetes*. 2016; 17:469–477. *Review*.
94. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, Adams H, van Ree R, Stobberingh EE. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*. 2007; 56:661–667.
95. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006; 118:511–521.
96. Perez-Munoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 2017; 5(1):48. *Review*.

97. Pessione E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2:86. *Review.*
98. Praveen P, Jordan F, Priami C, Morine MJ. The role of breast-feeding in infant immune system: a systems perspective on the intestinal microbiome. *Microbiome.* 2015; 3(1):1–12.
99. Putignani L, Dallapiccola B. Foodomics as part of the host-microbiota-exposome interplay. *J Proteomics.* 2016 Sep 16;147:3-20. doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.033. Epub 2016 Apr 26.
100. Putignani L, Del Chierico F, Vernocchi P, Cicala M, Cucchiara S, Dallapiccola B; Dysbiotrack Study Group. Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. *Inflamm Bowel Dis.* 2016; 22(2):487-504.
101. Rampelli S, Schnorr SL, Consolandi C, Turroni S, Severgnini M, Peano C, Brigidi P, Crittenden AN, Henry AG, Candela M. Metagenome Sequencing of the Hadza Hunter-Gatherer Gut Microbiota. *Curr Biol.* 2015; 25(13): 1682-93.
102. Rasmussen SH, Shrestha S, Bjerregaard LG, Ängquist LH, Baker JL, Jess T, Allin KH. Antibiotic exposure in early life and childhood overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab.* 2018 Jan 23. *Review.*
103. Rautava S. Microbial Composition of the Initial Colonization of Newborns. *Nestle Nutr Inst Workshop. Ser.* 2017; 88:11-21. *Review.*
104. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Microbes and health sackler colloquium: vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:Suppl 1:4680–4687.
105. Rodriguez JM. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr.* 2014; 5(6):779-84.
106. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, Costea PI, Godneva A, Kalka IN, Bar N, Shilo S, Lador D, Vila AV, Zmora N, Pevsner-Fischer M, Israeli D, Kosower N, Malka G, Wolf BC, Avnit-Sagi T, Lotan-Pompan M, Weinberger A, Halpern Z, Carmi S, Fu J, Wijmenga C, Zhernakova A, Elinav E, Segal E. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature.* 2018; 555(7695): 210-215.
107. Rutayisire E, Huang K., Liu Y. Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2016; 16(1):86. *Review.*
108. Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut.* 2004; 53:1388–1389.
109. Schindler T, Sinn JK, Osborn DA. Polyunsaturated fatty acid supplementation in infancy for the prevention of allergy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Oct 28;10:CD010112. *Review.*
110. Schwartz S, Friedberg I, Ivanov IV, Davidson LA, Goldsby JS, Dahl DB, Herman D, Wang M, Donovan SM, Chapkin RS. A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response. *Genome Biol.* 2012; 13(4):r32.
111. Seridi L, Leo GC, Dohm GL, Pories WJ, Lenhard J. Time course metabolome of Roux-en-Y gastric bypass confirms correlation between leptin, body weight and the microbiome. PLoS One. 2018 May 31;13(5):e0198156. doi: 10.1371/journal.pone.0198156. eCollection 2018.
112. Sevelsted A, Stokholm J, Bønnelykke K, Bisgaard H. Cesarean section and chronic immune disorders. *Pediatrics.* 2015; 135:e92–98. *Review.*

113. Shao X, Ding X, Wang B, Li L, An X, Yao Q, Song R, Zhang JA. Antibiotic Exposure in Early Life Increases Risk of Childhood Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Jul 20 ;8:170. *Review*.
114. Simpson MR, Avershina E, Storro O, Johnsen R, Rudi K, Oien T. Breastfeeding-associated microbiota in human milk following supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. *J Dairy Sci*. 2018 Feb; 101(2):889-899.
115. Soderborg et al., *Clinical immunology* (2015) 159, 143-153
116. Subramanian S, Huq S, Yatsunenkov T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA, Benezra A, De Stefano J, Meier MF, Muegge BD, Barratt MJ, VanArendonk LG, Zhang Q, Province MA, Petri WA Jr, Ahmed T, Gordon JI. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*. 2014 Jun 19;510(7505):417-21.
117. Tun HM, Konya T, Takaro TK, Brook JR, Chari R, Field CJ, Guttman DS, Becker AB, Mandhane PJ, Turvey SE, Subbarao P, Sears MR, Scott JA, Kozyrskyj AL; CHILD Study Investigators. Exposure to household furry pets influences the gut microbiota of infant at 3-4 months following various birth scenarios. *Microbiome*. 2017 Apr 6;5(1):40.
118. Turta O, Rautava S. Antibiotics, obesity and the link to microbes - what are we doing to our children? *BMC Medicine*. 2016; 14:57.
119. Vatanen et al., *Cell* 165, 842–853, May 5, 2016
120. Vernocchi et al., *Frontiers in Microbiology* | www.frontiersin.org 1 July 2016 | Volume 7 | Article 1144.
121. Voreades N, Kozil A, Weir TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol*. 2014 Sep 22; 5:494.
122. Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJF. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr Obes*. 2017; 12 Suppl 1:3-17. *Review*.
123. Watkins C, Stanton C, Ryan CA, Ross RP. Microbial Therapeutics Designed for infant Health. *Front Nutr*. 2017 Oct 26; 4:48. *Review*.
124. Watson J, Jones RC, Cortes C, Gerber SI, Golash MS, Bancroft E, Mascola I, Gorwitz RJ, Jernigan DB, James L, Nguyen DM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among healthy newborns—Chicago and Los Angeles County, 2004, reprinted from *MMWR* 2006;55:329–332. *JAMA* 2006;296:36–38.
125. West CE, Dzidic M, Prescott SL, Jenmalm MC. Bugging allergy; role of pre-, pro- and synbiotics in allergy prevention. *Allergol Int*. 2017 Oct; 66(4):529-538. *Review*.
126. Yasmin F, Tun HM, Konya TB, Guttman DS, Chari RS, Field CJ, Becker AB, Mandhane PJ, Turvey SE, Subbarao P, Sears MR; CHILD Study Investigators, Scott JA, Dinu I, Kozyrskyj AL. Cesarean Section, Formula Feeding, and Infant Antibiotic Exposure: Separate and Combined Impacts on Gut Microbial Changes in Later Infancy. *Front Pediatr*. 2017 Sep 26;5:200.
127. Zaneveld JR, McMinds R, Vega Thurber R. Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nat Microbiol*. 2017; 2: 17121.
128. Zhang C, Björkman A, Cai K, Liu G, Wang C, Li Y, Xia H, Sun L, Kristiansen K, Wang J, Han J, Hammarström L, Pan-Hammarström Q Impact of a 3-Months Vegetarian Diet on the Gut Microbiota and Immune Repertoire. *Front Immunol*. 2018 Apr 27;9:908. doi: 10.3389/fimmu.2018.00908. eCollection 2018.
129. Zhao, L. My Microbiome and me. *Science*. 2012; 336: 1248-1250.

CAPITOLO 2: PRINCIPI DI REALIZZAZIONE DI MAPPE METAGENOMICHE COSIDDETTE “TARGETED” PER LA DESCRIZIONE TASSONOMICA DEL MICROBIOTA FECALE UMANO

2.1 Principali caratteristiche delle mappe di microbiota intestinale fecale: utilizzo di piattaforme di *next generation sequencing* (NGS) per l’esecuzione della metagenomica “TARGETED” del microbiota intestinale

Nel presente e nei prossimi paragrafi ci riferiremo nello specifico all’analisi del microbiota intestinale fecale, per la quale già esistono processi di ottimizzazione e standardizzazione del flusso pre-analitico, analitico e post-analitico. Nel presente documento ci si riferirà, inoltre, alla cosiddetta *targeted metagenomica*, cioè al sequenziamento di regioni ipervariabili del 16S rRNA batterico, che consente di realizzare la cosiddetta metatassonomia o *phylotyping* della comunità microbica stessa, con la identificazione e l’assegnazione delle distribuzioni relative delle cosiddette “unità operative tassonomiche” (OTUs), a diversi livelli filogenetici, e la stima delle loro abbondanze relative. I principali livelli tassonomici selezionati allo scopo di descrivere i sistemi microbici in considerazione sono:

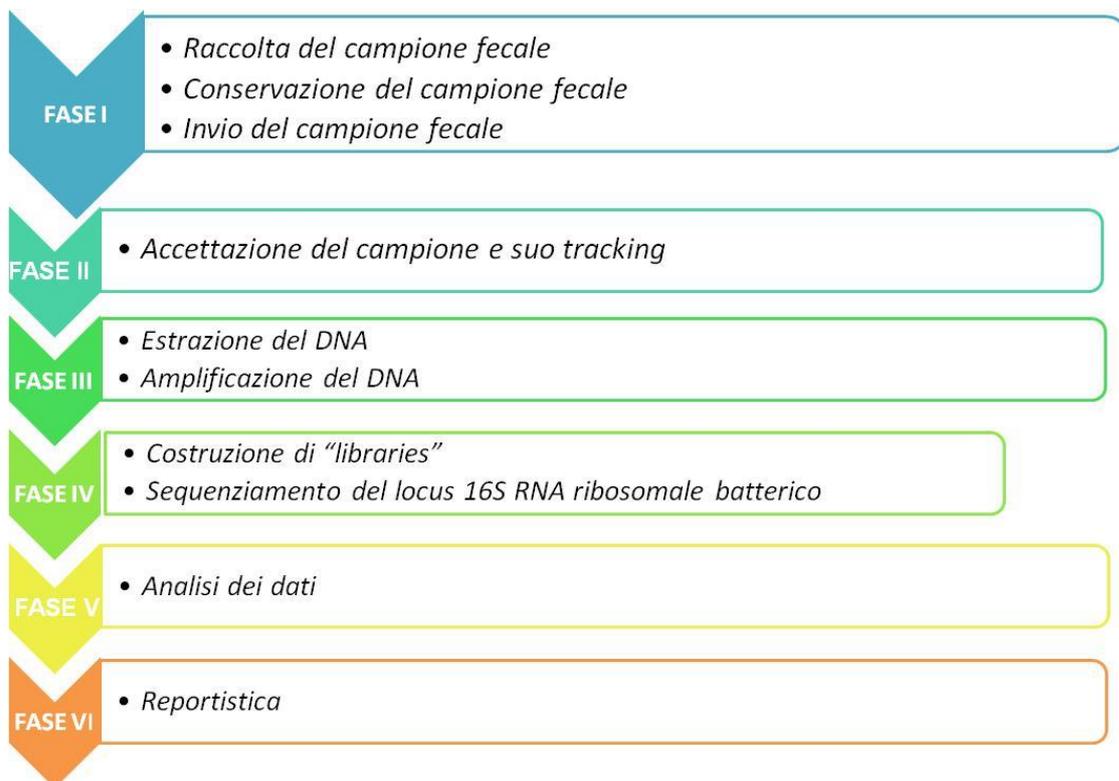
1. L2: Phylum
2. L5: Family (opzionale)
3. L6: Genus/Species

Non ci si riferirà, nel presente documento, ad attività di NGS per eseguire il cosiddetto whole genome sequencing (WGS) di metagenomi batterici.

2.2 Attività preparatoria del flusso metagenomico di analisi di campioni fecali per la generazione di mappe di microbiota fecale

Nei successivi paragrafi verranno descritte le operazioni da eseguire per l’analisi del microbiota intestinale che avviene mediante l’utilizzo di piattaforme NGS per il sequenziamento del gene 16S rRNA batterico.

Si riporta sinteticamente il workflow pre-analitico e post-analitico NGS delle operazioni che attualmente costituiscono una pipeline di sequenziamento del 16S per l’analisi del microbiota intestinale:



2.3 Standardizzazione dei processi diagnostici NGS associati a fase pre-analitica, analitica, post-analitica

FASE I: Raccolta, conservazione e invio del campione fecale:

Per valutare eventuali fluttuazioni nel profilo del microbiota e produrre un profilo mediano del microbiota da analizzare, l'analisi va preferibilmente eseguita su triplicati biologici (tre campioni fecali), raccolti in tre giorni consecutivi. I tre campioni fecali devono essere raccolti e conservati secondo le modalità per la raccolta delle feci per esame colturale (*ad esempio*: opportuno contenitore, conservazione da parte dell'utente dei campioni fecali a temperatura controllata; trasporto refrigerato a 4°C o a temperatura controllata) ed essere consegnati presso Centri con comprovata esperienza per l'analisi del microbiota intestinale.

Al riguardo, si auspica che vengano al più presto censiti i Laboratori che, sulla base delle strutture, capacità strumentali e competenze umane siano in grado di effettuare un'analisi diagnostica del microbiota intestinale il più possibile appropriata e affidabile.

FASE II: Accettazione del campione fecale:

I campioni biologici devono essere accettati mediante sistema elettronico di *tracking* del campione (*software-assisted procedure*), in modo da garantire **un processo certificato in qualità delle attività**.

Il percorso del campione deve articolarsi nei seguenti processi:

1. accettazione presso il laboratorio che esegue l'analisi;
2. check-in mediante *software-assisted procedure*;
3. inserimento nel flusso NGS.

Il materiale biologico deve essere aliquotato per eseguire la estrazione del DNA su opportuna aliquota e conservato, laddove indicato, a T controllata (-80°C).

FASE III: Estrazione e Amplificazione del DNA:

Un'aliquota di ogni campione ($\cong 200$ mg ca) viene processata dall'operatore per l'estrazione del DNA. Il DNA ottenuto viene successivamente amplificato mediante tecniche di PCR; in particolare, viene amplificata, mediante primer universali, **la regione ipervariabile V3-V4 del gene 16S rRNA batterico**, riconosciuta come *gold standard* per l'identificazione batterica.

FASE IV: Costruzione di "libraries" e sequenziamento del gene del 16S rRNA batterico

La presente fase analitica si compone dei seguenti passaggi:

1. indicizzazione dei campioni, ovvero aggiunta di specifiche sequenze nucleotidiche a ogni campione, per consentirne il riconoscimento nelle successive fasi di analisi;
2. normalizzazione di ogni campione indicizzato ad una specifica concentrazione espressa in molarità;
3. creazione di un pool di campioni;
4. creazione di un sample-sheet dove vengono riportati tutti i campioni associati ai relativi oligonucleotidi;
5. sequenziamento NGS del pool di campioni, con profondità minima di sequenziamento di 25.000 reads per campione.

Sequenziamento: come anticipato sopra, il DNA da sottoporre a sequenziamento, derivante da ciascun campione, viene modificato mediante aggiunta di oligonucleotidi adattatori, i quali sono complementari agli oligonucleotidi ancorati alla cella di flusso del sequenziatore. Cicli multipli di amplificazione convertono la singola molecola di DNA stampo in un "cluster" o fascio di frammenti, amplificati clonalmente, ciascuno dei quali composto approssimativamente da 100-200 milioni di ampliconi clonali separati. Il sequenziamento dei filamenti avviene mediante l'ibridazione di un oligonucleotide complementare alla sequenza dell'oligonucleotide adattatore. Successivamente, si ha l'aggiunta di una DNA polimerasi e di una miscela dei 4 nucleotidi marcati con fluorofori differenti, che fungono da terminatori "reversibili". I nucleotidi terminatori sono incorporati in base alla complementarità della sequenza di ciascun filamento, all'interno di ogni cluster clonale. Dopo l'incorporazione del nucleotide appropriato, gli altri reagenti in eccesso vengono rimossi con un lavaggio e la fluorescenza relativa ad ogni "cluster" viene rilevata e registrata. Mediante successivi passaggi, il gruppo di blocco dei nucleotidi terminatori "reversibili" viene rimosso e la marcatura fluorescente viene allontanata tramite un lavaggio, consentendo di effettuare il ciclo successivo di sequenziamento.

FASE V: Analisi dei dati

L'analisi bioinformatica prevede i seguenti passaggi computazionali:

- 1) l'unione delle sequenze Forward e Reverse in un'unica sequenza per ogni campione;

- 2) il filtraggio delle sequenze di lunghezza inferiore a 100 nt, con un quality control (QC) di 26;
- 3) l'allineamento con le sequenze contenute nel database Greengenes per l'identificazione tassonomica;
- 4) l'analisi statistica mediante approcci uni- e multivariati.

Pannello riassuntivo dei checkpoints (QC) da considerare:

- QC con enumerazione sequenze
- QC sulla qualità delle sequenze
- *Denoising*
- Curve di rarefazione
- Allineamento al database *Greengenes* per assegnazione ai diversi livelli tassonomici (L2, L5, L6)
- Determinazione della *alpha-diversity* (biodiversità, ovvero diversità delle specie all'interno del singolo campione)
- Determinazione della *beta-diversity* (diversità delle specie tra diversi campioni)
- Analisi delle abbondanze relative e valutazione statistica non-parametrica (es. Kruskal-Wallis Test)

FASE VI: Reportistica e presentazione del dato

Il report microbiologico del microbiota consiste al momento di tre parti descrittive:

1. Descrizione quantitativa delle abbondanze relative delle OTU a livello di phylum (istogramma descrittivo);
2. Descrizione quantitativa delle abbondanze relative delle OTU a livello di famiglia (opzionale, istogramma descrittivo);
3. Descrizione quantitativa delle abbondanze relative delle OTU a livello di genere/specie (istogramma descrittivo).

Sia per soggetti adulti che pediatrici, può essere generata una mappa delle comunità microbiche a livello L2, (L5), L6, considerando come *threshold* per l'esclusione delle OTU un valore di abbondanza relativa $\leq 1\%$. Tale valore, infatti, sulla base delle esperienze già condotte in diagnostica del microbiota, appare come la soglia al di sotto della quale non è "informativo" riportare le distribuzioni di OTU.

2. 4 Conclusioni Operative, Box 2.1-2.4

BOX 2.1. Profili di microbiota intestinale e correlazione con stati di malattia. Questa procedura può portare a identificare dei profili microbici *potenzialmente correlabili a uno stato patologico*. Appare utile sottolineare che tale correlazione potrà essere successivamente validata e utilizzata come indicatore di specifica malattia solo quando sarà disponibile un numero molto esteso di report microbiologici, tale da consentire di passare da un profilo a valenza individuale a un profilo di popolazione.

BOX 2.2. Profili di microbiota intestinali e confronto con gruppi di controllo. Nel caso specifico di soggetti pediatrici, per i quali l'esperienza diagnostica sul microbiota intestinale è molto avanzata e per i quali il profilo è complicato da processi di *programming* età-dipendenti, l'analisi deve essere effettuata *versus* gruppi di controllo sani e fortemente stratificati per età. Allo stesso modo, *il profilo del microbiota di soggetti adulti deve essere confrontato con database di soggetti sani. I database generati dovranno essere possibilmente open source.*

BOX 2.3. Il report microbiologico del microbiota intestinale. Il report microbiologico del microbiota intestinale va sempre e comunque discusso con un clinico di comprovata esperienza nel settore per decidere eventuali trattamenti di tipo nutrizionale, di supplementazione mediante pro o prebiotici fino alla pianificazione del trapianto fecale, qualora considerato opportuno.

BOX 2.4. Una delle sfide più importanti per il prossimo futuro dovrà riguardare la costituzione di Banche Dati pubbliche e Consorzi scientifici per la condivisione dei profili di microbiota ottenuti nei diversi laboratori che, avendo una comprovata esperienza nel settore, potranno essere identificati come Centri di riferimento per il "mapping" del microbiota intestinale e di altri distretti corporei.

CAPITOLO 3: INTEGRATORI ALIMENTARI CONTENENTI PROBIOTICI, PRODOTTI BIOTERAPEUTICI VIVI (FARMACI) E DISPOSITIVI MEDICI

3.1. Raccomandazioni su integratori alimentari contenenti probiotici

Gli integratori alimentari sono definiti dalla direttiva 2002/46/CE, attuata con il decreto legislativo 21 maggio 2004, n. 169) come: “*prodotti alimentari destinati ad integrare la dieta normale e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, sia monocomposti che pluricomposti...*”.

Sono solitamente presentati in piccole unità di consumo come capsule, compresse, bustine, flaconcini e simili, per contribuire ad ottimizzare lo stato nutrizionale e/o favorire la normalità delle funzioni dell'organismo.

L'immissione in commercio è subordinata alla procedura di notifica dell'etichetta al Ministero della Salute. Una volta superata tale procedura, i prodotti sono inclusi in un apposito elenco con uno specifico codice, i cui estremi possono essere riportati nella stessa etichetta.

Le sostanze impiegabili negli integratori, in ogni caso, devono aver fatto registrare in ambito UE un pregresso consumo significativo (precedente alla data del 15 maggio 1997) come prova di sicurezza. Se non ricorre tale condizione, la sostanza si configura come un “*novel food*” ai sensi del regolamento (UE) 2015/2283 e, pertanto, un eventuale impiego anche nel solo settore degli integratori richiede la preventiva autorizzazione a livello europeo.

Inoltre, le sostanze che sono state utilizzate, come ingredienti, esclusivamente negli integratori alimentari, prima della data citata, sono considerate “*novel food*” per l'uso in alimenti diversi dagli integratori e, quindi, soggette a preventiva autorizzazione.

BOX 3.1. Le linee guida ministeriali (LGM), come previsto dall'articolo 5 del decreto legislativo 169/2004, disponibili sul sito del Ministero e aggiornate periodicamente, contengono disposizioni applicabili agli integratori alimentari per aspetti non armonizzati a livello europeo: “Apporto di vitamine, minerali e altre sostanze”, e sono strutturate nelle seguenti sezioni:

- Vitamine e minerali, dove sono riportati i livelli massimi di apporto consentiti.
- Probiotici e prebiotici, dove sono riportate specifiche disposizioni per tali costituenti a effetto “fisiologico”.
- Altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico, dove sono riportate varie disposizioni per altri nutrienti e altre sostanze a effetto nutritivo o fisiologico, diverse dai *botanicals*.

L'impiego di sostanze e preparati vegetali (*botanicals*) è disciplinato dal DM 9 luglio 2012, come modificato nell'allegato 1 dal decreto 27 marzo 2014.

Alla luce delle conoscenze attuali, modificazioni del profilo del microbiota possono essere valutate in studi sull'uomo mediante l'impiego dell'analisi NGS o di altri metodi molecolari e colturali quali- e quantitativi.

BOX 3.2. Metodiche per l'identificazione dei microorganismi e la valutazione della biodiversità

Tra le metodiche già previste nelle citate linee guida per l'identificazione dei microorganismi, si sottolineano le seguenti tecnologie per la valutazione della biodiversità:

- sequenziamento NGS del DNA codificante il 16S rRNA per la caratterizzazione filogenetica di batteri e del DNA codificante il 18S/ITS rRNA per la caratterizzazione filogenetica dei lieviti;
- sequenziamento genomico mediante approccio WGS;
- spettrometria di massa, metodo MALDI TOF MS Biotyper.

Un importante *endpoint* dell'uso di integratori alimentari contenenti probiotici è quello di aumentare la biodiversità del microbiota intestinale, incrementare l'abbondanza relativa di batteri produttori di acidi grassi a catena corta (SCFA) (ad es. *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Blautia*, *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Lachnospiraceae*, *Eubacterium*) e di ridurre quella dei patobionti (ad es. *Bilophila*, *Enterobacteriaceae*, *Collinsella*, *Erysipelotrichaceae*, *Campylobacter*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*).

Argomentazioni ed evidenze scientifiche ottenute in studi sull'uomo per correlare somministrazione di integratori alimentari contenenti probiotici ed effetti benefici su microbiota possono concorrere nel dimostrare un loro possibile effetto benefico sulla salute.

Ai sensi del regolamento (CE) 1924/2006, qualora l'operatore del settore alimentare fosse in possesso di dati scientifici validi in tal senso potrebbe richiedere una autorizzazione per una indicazione sulla salute, che, una volta concessa, potrebbe essere rivendicata sull'etichetta dell'integratore stesso.

Ovviamente, i dati devono essere presentati e raccolti come definito dalle linee guida dell'EFSA (Autorità europea per la sicurezza alimentare).

Gli alimenti conformi alle linee guida ministeriali sui probiotici possono utilizzare nell'etichettatura e nella pubblicità il termine "probiotico", anche se le linee guida della Commissione UE del 2007, esplicative dell'applicazione del regolamento (CE) 1924/2006, riportano che detto termine, di per sé, dovrebbe essere considerato un claim sulla salute.

Appare oggi evidente che l'utilizzo del termine "probiotico" si configura come una indicazione volta a informare il consumatore sulla presenza di microrganismi vivi in un prodotto alimentare e non, di per sé, su specifici effetti benefici che vanno oltre il contributo per l'equilibrio del

microbiota intestinale. Peraltro effetti utili per l'equilibrio del microbiota intestinale vanno considerati di per sé un beneficio sulla salute quando adeguatamente documentati con le conoscenze e le metodologie disponibili. In ogni caso, l'uso del termine "probiotico" dovrebbe essere considerato un claim "nutrizionale", consistente, ai sensi del regolamento (CE) 1924/2006, nell'evidenziazione in un prodotto alimentare della presenza, o dell'entità, di un nutriente o di altri costituenti a effetto fisiologico. A supporto di ciò basti considerare che la stessa EFSA utilizza il termine "probiotici" nelle sue opinions per riferirsi a microrganismi vivi. In conclusione, si ritiene necessaria una revisione delle citate linee guida del 2007 della Commissione UE, che, per quanto indicato sui probiotici, appaiono oggi superate alla luce delle attuali conoscenze.

BOX 3.3 Quantità e sicurezza dei microrganismi vivi

Come previsto dalle Linee guida ministeriali – revisione marzo 2018 in riferimento alla:

Quantità

- Sulla base delle evidenze scientifiche disponibili la quantità minima sufficiente per ottenere una temporanea colonizzazione dell'intestino da parte di un ceppo microbico è di almeno 10^9 cellule vive per giorno. La porzione di prodotto raccomandata per il consumo giornaliero deve quindi contenere una quantità pari a 10^9 cellule vive per almeno uno dei ceppi presenti. L'uso di quantità diverse può essere consentito solo se il rationale per tale scelta è supportato da adeguati studi scientifici.

La quantità di cellule vive presenti nel prodotto deve essere riportata in etichetta per ogni ceppo e deve essere garantita, alle modalità di conservazione suggerite, fino al termine della shelf-life, con una incertezza di 0,5 log.

I metodi d'analisi più adatti per quantificare le cellule batteriche vive possono essere diversi per ogni specie.

Sicurezza

- L'uso di un nuovo ceppo microbico, sia pure appartenente a una specie già impiegata, richiede una nuova valutazione della sicurezza e dell'efficacia in relazione alla capacità di colonizzare.

Ai fini dell'accertamento della sicurezza si ribadisce la necessità di una identificazione tassonomica a livello di specie e di ceppo, con le tecniche precedentemente indicate, così come la valutazione del profilo di antibiotico-resistenza (antibatteriche o antimicotiche a seconda dei casi). Il profilo delle antibiotico-resistenze va determinato per ogni singolo ceppo microbico utilizzato, al fine di escludere la presenza di quelle acquisite e anche di quelle solo potenzialmente trasmissibili.

Come eccezione, non si ritiene necessaria la valutazione della sicurezza di un ceppo che appartiene a specie sufficientemente caratterizzate, così come definito dai documenti EFSA per lo status di QPS per alcuni gruppi batterici. Anche in questo caso, comunque, va valutato il profilo di antibiotico-resistenza

3.2 Raccomandazioni su prodotti bioterapeutici vivi (LBP) per uso umano

Un bioterapeutico vivo (*Live Biotherapeutic Product*, LBP) è un prodotto biologico che contiene microrganismi vivi (come batteri o lieviti) naturali, ricombinanti, che può essere utilizzato per la prevenzione, il trattamento o la cura di una malattia o condizione clinica, non somministrabili per via iniettiva.

Gli LBP sono pertanto medicinali costituiti da uno o più ceppi di microrganismi vivi (batteri o lieviti), somministrati oralmente o a livello vaginale e utilizzati nella prevenzione e nel trattamento di patologie associate ad alterazioni del profilo di microbiota non solo intestinale, ma anche vaginale.

Le specie più comuni sono, tra i batteri, Lactobacilli, Bifidobacteria, alcune specie di Streptococco, *Bacillus clausii*, e, tra i lieviti, *Saccharomyces cerevisiae* var *bouardii*.

Gli LBP rientrano pertanto a pieno titolo nella definizione di medicinale, di cui alla Direttiva 2001/83/CE (recepita a livello nazionale dal d.lgs. 219/2006), e come tali possono essere utilizzati sull'uomo o somministrati all'uomo “allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche, esercitando un'azione farmacologica, immunologica o metabolica, ovvero di stabilire una diagnosi medica”.

Ai fini del rilascio di una autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) di un LBP, le aziende sono tenute a fare riferimento alle normative europee vigenti nonché alle linee guida.

In particolare si segnalano:

- Farmacopea Europea, che costituisce norma di legge e garantisce l'applicazione di requisiti omogenei nei diversi Paesi Membri, per quanto riguarda gli standard di qualità;
- *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*;
- Linee guida dell'*European Medicines Agency* (EMA), per quanto riguarda la valutazione del profilo di qualità, sicurezza ed efficacia.

Al fine di armonizzare tra i Paesi Membri gli standard di qualità per questa tipologia di prodotti, la Farmacopea Europea ha recentemente indetto una consultazione pubblica per la revisione di tre monografie riguardo ai LBP.

In particolare, la monografia generale “*Live Biotherapeutic Products for human use(3053)*” con raccomandazioni generali sulla produzione e la caratterizzazione dei prodotti, e i due capitoli: 2.6.36 “*Microbiological examination of live biotherapeutic products: test for enumeration of microbial contaminants*” e 2.6.38 “*Microbiological examination of live biotherapeutic products (LBPs): test for specified micro-organisms*” in cui sono descritti i metodi per valutare la conformità dei LBPs rispettivamente alle specifiche relative alla contaminazione microbica e alla qualità microbiologica.

Fermo restando quanto sopra specificato, si riportano di seguito alcune indicazioni che le aziende devono tenere in considerazione ai fini della presentazione di un dossier di autorizzazione all'immissione in commercio.

Esistono allo stato attuale alcuni bioterapeutici vivi autorizzati come farmaci.

3.2.1 Caratterizzazione dei microrganismi

Di seguito si riportano alcuni degli aspetti che devono essere presi in considerazione:

- i) informazione sulla loro origine;
- ii) determinazione della stabilità fenotipica e genotipica;
- iii) valutazione della resistenza agli antibiotici (accertare l'assenza di meccanismi trasferibili di resistenza);
- iv) valutazione ed esclusione della virulenza;
- v) valutazione della capacità di persistenza nell'ospite;
- vi) valutazione della produzione di sostanze ad attività biocida.

3.2.2 Identificazione tassonomica della specie e del ceppo

L'accertamento della posizione tassonomica è volto a garantire la sicurezza del microrganismo usato perché consente di riconoscere la specie batterica o fungina.

L'identificazione tassonomica a livello di specie può essere eseguita tramite tecniche, quali ad esempio:

- sequenziamento del DNA codificante il 16S rRNA per la caratterizzazione filogenetica di batteri e del DNA codificante il 18S/ITS rRNA per la caratterizzazione filogenetica dei lieviti;
- sequenziamento genomico;
- spettrometria di massa, metodo MALDI TOF MS Biotyper.

La tipizzazione del ceppo batterico può essere eseguita mediante:

- sequenziamento del genoma;
- identificazione di sequenze signature (loci) specifiche;
- spettrometria di massa, metodo MALDI TOF MS Biotyper.

Per denominare la specie occorre utilizzare la nomenclatura tassonomica riconosciuta dalla *International Union of Microbiological Societies* (IUMS).

È inoltre raccomandato il deposito dei ceppi nelle Collezioni Internazionali che posseggano lo status di IDA (International Depository Authority, collezioni internazionali di ceppi batterici).

3.2.3 Produzione

Alla produzione dei medicinali si applicano le Norme di buona fabbricazione relative ai medicinali per uso umano stabilite dalla Comunità Europea.

La documentazione registrativa deve seguire le modalità di presentazione e i format previsti dal Volume 2B, *Notice to Applicants, Medicinal products for human use, Presentation and format of the dossier Common Technical Document* (CTD).

3.2.4 Indicazioni terapeutiche e vie di somministrazione

La disbiosi (alterazione della composizione e del metabolismo del microbiota fino a causare una disfunzione nell'ospite) è stata correlata a una crescente lista di patologie, che include le patologie

infiammatorie intestinali – IBD, obesità, sindrome metabolica, steatosi epatica, diabete tipo 1 e tipo 2, allergie, aterosclerosi, e molte altre. Inoltre, l'uso di prodotti bioterapeutici vivi ha mostrato risultati promettenti nella riduzione delle infezioni, agendo tramite stimolazione delle risposte immunitarie innate e modulando il metabolismo gastrointestinale.

Gli LBP trovano impiego nella pratica clinica, in monoterapia o in terapia di associazione con altri farmaci (in particolare antimicrobici) per le seguenti condizioni cliniche:

- enteriti e diarree infettive in genere (enterocolite dell'adulto);
- dismicrobismi intestinali di differente origine, come quelli da antibiotici o da altri farmaci e da squilibri dietetico-nutrizionali;
- dismicrobismi intestinali nei lattanti;
- vaginiti e vulvo-vaginiti.

Sono inoltre in sviluppo, in differenti fasi di sperimentazione clinica, LBP per le seguenti indicazioni terapeutiche:

- antagonismo e prevenzione di infezioni di altri distretti (cavo orale, tratto urinario ecc.).

3.2.5 Valutazione clinica degli LBP

Farmacodinamica ed Efficacia

Si ritiene che gli LBP agiscano secondo i seguenti meccanismi di azione: interferenza con la crescita di microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni; stimolazione di altri processi potenzialmente benefici come risultato di una colonizzazione transitoria, persistente o a lungo termine da parte del microrganismo contenuto nel LBP.

Pertanto l'obiettivo degli studi varia in relazione al supposto effetto preventivo o terapeutico e all'utilizzo in monoterapia o in terapia di associazione con antimicrobici o altre classi di farmaci.

Gli studi clinici sono volti a verificare l'esistenza di meccanismi di interferenza degli LBP con l'ospite e la loro efficacia nel trattamento delle diverse condizioni cliniche per le quali si richiede l'indicazione terapeutica.

Pur non essendo disponibili linee guida specifiche per l'esecuzione di studi clinici, si possono tenere in considerazione le linee guida CBER/FDA. Tali linee guida prevedono la possibilità di un riferimento a studi precedentemente condotti con prodotti analoghi, sia pur tenendo conto delle limitazioni dovute al diverso grado di caratterizzazione dei vari prodotti.

L'applicabilità dei dati clinici ottenuti da studi precedenti al prodotto in questione si basa sulla similarità del prodotto in studio con quello già autorizzato, sul disegno degli studi, sugli obiettivi e gli *endpoint* selezionati, nonché sul numero dei soggetti arruolati, sulla durata del trattamento e sulla posologia scelta, sul tipo e sulla durata di osservazione e di follow-up, sull'analisi statistica dei dati.

Qualora invece sia in studio l'uso di un nuovo ceppo microbico, sia pure appartenente ad una specie già impiegata, è richiesta sempre una nuova valutazione della sicurezza e dell'efficacia.

In tal caso deve essere effettuato uno studio clinico *ad hoc*, per il quale la linea guida FDA prevede

la possibilità di arruolare volontari sani, soggetti a rischio oppure una popolazione di pazienti di età variabile, da neonati prematuri a soggetti in età geriatrica, affetti dalla patologia per la quale si richiede l'indicazione terapeutica.

La valutazione dell'efficacia del trattamento con LBP va pertanto testata in:

- 1) saggi ex vivo per valutare l'adesività su tappeti cellulari specifici;
- 2) studi clinici volti a valutare il profilo quali e quantitativo del microbiota nel volontario sano in seguito alla somministrazione del prodotto in studio e la persistenza nel microambiente intestinale dei microrganismi contenuti nell'LBP in studio;
- 3) studi clinici randomizzati.

Possibili *endpoint* per la valutazione del profilo di efficacia sono la correzione del dismicrobismo intestinale, l'incremento di batteri produttori di SCFA (*Short Chain Fatty Acids*), la riduzione della dominanza dei patobionti, l'antagonismo verso patogeni, la riduzione delle recidive.

- 4) Posologia: definita dallo studio.

Aspetti di Sicurezza

Ai fini dell'accertamento della sicurezza si ribadisce l'importanza dell'identificazione tassonomica a livello di specie e di ceppo, con le tecniche precedentemente indicate, così come la valutazione del profilo di antibiotico-resistenza (antibatterica o antimicotica a seconda dei casi). Il profilo delle antibiotico-resistenze va determinato per ogni singolo ceppo microbico utilizzato. Relativamente al profilo di sicurezza, è indicata una valutazione preliminare su volontari sani al fine di identificare eventi avversi comuni legati al prodotto prima di effettuare studi su popolazioni più vulnerabili (bambini o pazienti affetti dalla patologia per cui si richiede l'indicazione terapeutica).

3.3 Raccomandazioni su dispositivi medici: verso dispositivi contenenti componenti/lisati microbici

Sul mercato europeo esistono attualmente diversi prodotti contenenti microrganismi, alcuni di questi (ad esempio ovuli vaginali e tamponi vaginali) qualificati come dispositivi medici. Il settore dei dispositivi medici è attualmente normato dai d.lgs. 46/97 e d.lgs. 507/92 modificati con d.lgs. 37/10, di recepimento delle Direttive europee 93/42/CEE e 90/385/CEE, i quali saranno abrogati a decorrere dal 26 maggio 2020, data di applicazione del nuovo regolamento europeo 745/2017/UE. Tale regolamento ha rafforzato alcuni elementi chiave dell'attuale approccio normativo introducendo disposizioni al fine di migliorare la protezione della salute dei pazienti fissando elevati standard di qualità e sicurezza e creare, al contempo, un quadro legislativo sostenibile, propizio all'innovazione. Secondo questo regolamento si definisce "dispositivo medico": *qualunque strumento, apparecchio, apparecchiatura, software, impianto, reagente, materiale o altro articolo, destinato dal fabbricante a essere impiegato sull'uomo, da solo o in combinazione, per una o più delle seguenti destinazioni d'uso mediche specifiche: 1) diagnosi, prevenzione, monitoraggio, previsione, prognosi, trattamento o attenuazione di malattie, 2) diagnosi, monitoraggio, trattamento, attenuazione o compensazione di una lesione o di una disabilità, 3)*

studio, sostituzione o modifica dell'anatomia oppure di un processo o stato fisiologico o patologico, 4) informazione attraverso l'esame in vitro di campioni provenienti dal corpo umano, inclusi sangue e tessuti donati, e che non esercita nel o sul corpo umano l'azione principale cui è destinato mediante mezzi farmacologici, immunologici o metabolici, ma la cui funzione può essere coadiuvata da tali mezzi.

Come si può bene comprendere da quanto sopra riportato, il tema è molto ampio e comprende categorie di prodotti tra loro molto diversificati e lontani dal tema oggetto della nostra revisione critica.

In relazione all'inquadramento regolatorio finora utilizzato per questo genere di prodotti (LBP come farmaco o come dispositivo medico), è importante considerare le diverse caratteristiche del ceppo. In letteratura sono riportati diversi lavori che dimostrano come batteri appartenenti non solo allo stesso genere (es. *Lactobacillus*) ma anche alla stessa specie (es. *L.acidophilus*) non sono tutti uguali e non hanno le stesse proprietà. Tali differenze, rilevate quindi anche in ceppi appartenenti alla stessa specie, hanno dimostrato che ceppi diversi possono avere caratteristiche molto differenti tra loro. Per questo motivo le peculiarità probiotiche sono definite ceppo-dipendenti e non possono essere estese all'intera specie e di conseguenza ai prodotti che li contengono.

Infatti, se i microrganismi svolgono un'azione di tipo meccanico, per esempio inibizione dei patogeni per competizione sterica, si può parlare di dispositivo medico. Quando invece l'attività principale è attribuibile a un'attività metabolica, come ad esempio la produzione di sostanze bioattive (perossido di idrogeno, batteriocine, batteriolisine, ecc.) non è possibile considerare il prodotto come dispositivo medico.

In altre parole fino ad oggi, in base alla Direttiva 93/42/CEE, un prodotto contenente microrganismi vivi poteva essere qualificato come dispositivo medico se il meccanismo di azione principale era di tipo fisico-meccanico, ovvero attraverso una sorta di competizione sterica verso i potenziali agenti patogeni.

Oggi il nuovo Regolamento sui dispositivi medici, in linea con le intenzioni della Commissione europea, all'articolo 1, comma 6, lettera h), esclude dallo scopo i microrganismi vivi "*Il presente regolamento non si applica: ai prodotti che contengono o sono costituiti da materiali biologici vitali o organismi vitali, compresi microrganismi, batteri, funghi o virus al fine di conseguire o contribuire alla destinazione d'uso del prodotto*". Tale previsione entrerà in vigore il 26 maggio 2020, salvo che la Commissione Europea, come previsto all'articolo 4, non anticipi tale previsione con atto di esecuzione su richiesta di uno Stato membro (comma 1) o di propria iniziativa (comma 2).

I prodotti contenenti microrganismi vivi, successivamente a tale data, non potranno essere immessi nel mercato come dispositivi medici.

Sarebbe auspicabile che i microorganismi vivi con meccanismo d'azione farmacologico, immunologico o metabolico, considerati medicinali ai sensi dell'art. 1, punto 2) della Direttiva 2001/83/CE, possano essere contenuti nei dispositivi medici qualora esplicino un'azione ancillare

(art. 1, comma 8 del Regolamento (UE) 745/2017). Sarebbe altresì auspicabile che i prodotti contenenti microrganismi vivi il cui meccanismo d'azione principale sia di tipo fisico-meccanico, attualmente esclusi dallo scopo del Regolamento (UE) 745/2017, possano in futuro avere a livello europeo un inquadramento normativo *ad hoc* alla luce dei recenti sviluppi applicativi.

I microrganismi inattivati (tindalizzazione), lisati, estratti cellulari potrebbero costituire una alternativa all'utilizzo dei microrganismi vivi qualora solide evidenze scientifiche dimostrino che il meccanismo di azione sia conforme a quanto previsto dalla norma per i dispositivi medici, ovvero mediante meccanismi d'azione principali che non siano farmacologici, immunologici o metabolici.

Inoltre, i problemi correlati alla sicurezza e alla stabilità di LBP hanno portato a un aumento d'interesse verso sospensioni batteriche inattivate che risolverebbero, almeno in parte, i problemi sopracitati, incluso il rischio di traslocazione e conseguente infezione. La procedura di tindalizzazione uccide il probiotico e ne blocca la produzione di metaboliti attivi. In linea generale, la tindalizzazione, una sterilizzazione contraddistinta da brevi cicli di calore umido, consente l'uccisione del microrganismo nel suo medium contenente detriti batterici e i suoi prodotti rilasciati durante il processo di induzione di morte.

In alternativa alla tindalizzazione potrebbero essere usati cicli di scongelamento e congelamento.

In letteratura vengono riportate pratiche sperimentali per l'ottenimento di lisati mediante i) Ultrasuoni; ii) Lisi con batteriofagi e iii) Uso di enzimi autolitici.

I fabbricanti dei dispositivi contenenti LPB o microrganismi inattivati sono responsabili della raccolta e valutazione dei pertinenti dati clinici (valutazione clinica) e della conduzione delle indagini cliniche, ai sensi dell'articolo 14 del D. Lgs 46/97 e dell'Allegato X. Dal maggio 2020 si dovranno applicare le previsioni del Regolamento contenute nel capo VI e negli Allegati XIV e XV.

Bibliografia

- 1) Adams CA – The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Res Rev* 2010; 23: 37-46
- 2) Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1258-70. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.035.
- 3) Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, D'Amato M, Bonfiglio F, McDonald D, Gonzalez A, McClure EE, Dunkleberger MF, Knight R, Jansson JK. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2017 Feb 13;2:17004. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.4.
- 4) Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66. Epub 2014 Jun 10.
- 5) Honda K and Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*. 2016 Jul 7;535(7610):75-84. doi: 10.1038/nature18848
- 6) Kaila M, Isolauri E., Saxelin M., Arvilommi H., Vesikari T. Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 1995; 72:51-53
- 7) Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016 Jun 2;165(6):1332-1345. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- 8) Lopetuso L., Graziani C., Guarino A., Lamborghini nA., Masi S., Stanghellini V. Gelatin tannate and tyndallized probiotics: a novel approach for treatment of diarrhea. *Europ Rev for Medical and Pharmacological Sciences* 2017; 21: 873-883
- 9) O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol*. 2017 Apr 25;2:17057. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.57.
- 10) Simakachorn N¹, Pichaiapat V, Rithipornpaisarn P, Kongkaew C, Tongpradit P, Varavithya W. Clinical evaluation of the addition of lyophilized, heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB to oral rehydration therapy in the treatment of acute diarrhea in children. *Pediatric Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 68-72
- 11) Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*. 2016; 535(7610):56-64. doi: 10.1038/nature18846.
- 12) Zakostelska Z¹, Kverka M, Klimesova K, Rossmann P, Mrazek J, Kopecny J, Hornova M, Srutkova D, Hudcovic T, Ridl J, Tlaskalova-Hogenova H - Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One*. 2011;6(11): e27961. doi: 10.1371/journal.pone.0027961. Epub 2011 Nov 22.
- 13) Zaneveld JR, McMinds R, Vega Thurber R. Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nat Microbiol*. 2017 Aug 24;2:17121. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.121.

CAPITOLO 4: TRAPIANTO DI MICROBIOTA FECALE

4.1. Aspetti clinici

4.1.1. *Introduzione: valutazione ragionata e appropriatezza clinica del fecal microbiota transplantation o FMT*

Il trapianto di microbiota intestinale (FMT – fecal microbiota transplantation) consiste nell'introduzione del materiale fecale di un donatore sano nell'intestino di un soggetto malato per il trattamento di una specifica patologia correlata a uno squilibrio del microbiota intestinale (disbiosi).

Il primo uso riportato del FMT per malattie gastrointestinali risale a ben 1500 anni fa, in Cina. Tuttavia, il FMT fece la sua prima comparsa nella medicina tradizionale solo nel 1958, quando Ben Eiseman e collaboratori trattarono con successo 4 pazienti affetti da colite pseudomembranosa usando clisteri fecali. In seguito, occasionali *case series* hanno dimostrato l'efficacia del FMT nella cura dell'infezione ricorrente da *Clostridium difficile* (rCDI). Il FMT è stato recentemente riscoperto come opzione terapeutica per due motivi principali: innanzitutto, l'incremento della diffusione e della resistenza antibiotica dell'infezione da *C. difficile*; in secondo luogo, il recente avanzamento di conoscenze riguardo il nostro microbiota intestinale, delle sue funzioni e del suo ruolo nella patogenesi di numerose malattie gastrointestinali ed extraintestinali, che pone le basi per la terapia di patologie correlate all'alterazione del microbiota intestinale tramite FMT.

Ad oggi, un grande insieme di evidenze (inclusi trial randomizzati e controllati, e review sistematiche e metanalisi) mostra come il FMT sia un'arma terapeutica molto efficace contro rCDI, tanto che sia le linee guida americane che europee per la gestione dell'infezione da *C. difficile* hanno inserito il FMT come opzione per il trattamento della sua forma ricorrente. Dati promettenti sull'uso del FMT in patologie non infettive vengono da trial randomizzati e controllati in pazienti con colite ulcerosa e pazienti con sindrome metabolica. Attualmente, esistono numerose linee guida basate sull'opinione di esperti, e una Consensus Conference basata sull'evidenza, che hanno stabilito le indicazioni e la metodologia del FMT.

4.1.2 *FMT nel paziente adulto e in quello pediatrico*

Indicazioni del FMT

Infezione da *C. difficile* nell'adulto

Il FMT ha dimostrato un elevato tasso di efficacia nella cura dell'infezione ricorrente da *C. difficile*, sia in trial randomizzati e controllati, dove si è dimostrato significativamente più efficace della vancomicina, sia in review sistematiche e in metanalisi, mostrando un tasso di risoluzione medio di tale patologia che spazia dal 92 al 94%.

Tale procedura ha inoltre dimostrato di essere anche molto sicura in pazienti con infezione

ricorrente da *C. difficile*. Pertanto, il FMT trova piena applicazione in pratica clinica per la cura della rCDI, ed è considerato una opzione terapeutica valida nella cura dell'infezione da *C. difficile* refrattaria al trattamento antibiotico standard, pur non essendo indicato, ad oggi, per la cura dell'infezione da *C. difficile* in prima linea.

Altre indicazioni nell'adulto

Al momento, altre indicazioni per l'uso di FMT (quali le malattie infiammatorie croniche intestinali, la sindrome dell'intestino irritabile, le patologie metaboliche e le patologie neurologiche) sono da considerarsi praticabili soltanto in un contesto di ricerca sperimentale, dal momento che gli studi attualmente disponibili non hanno dimostrato un profilo soddisfacente di efficacia e/o sicurezza.

Paziente pediatrico

Nel caso di FMT in paziente pediatrico, sono in corso studi e trial clinici per il trapianto in casi di malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), episodi di *chronic graft-versus-host disease* (GVHD) dopo trapianto di cellule staminali, patologie autoimmuni, infezioni da *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii multi-drug resistant* (MDR). Tutte le indicazioni al trapianto per il paziente pediatrico devono essere discusse caso per caso (esempio casi compassionevoli) e studio per studio (trapianto sperimentale in trial clinici) con il Comitato Etico, sotto la diretta responsabilità del clinico proponente e di un collegio multidisciplinare di esperti. In caso di studio (trapianto sperimentale in trial clinici), i protocolli dovranno essere sottoposti al Centro Nazionale Trapianti (CNT) come previsto per le procedure di trapianti sperimentali.

4.1.3 Standardizzazione dei flussi per l'esecuzione di FMT

Criteri e aspetti clinici per il trattamento dei pazienti e selezione dei donatori

Pazienti

Criteri di inclusione pazienti

- età \geq 18 anni
- diagnosi confermata di infezione di CDI multipla ricorrente a partire dal primo episodio di ricorrenza, con diarrea definita come 3 o più movimenti intestinali diarroici in 24 ore per almeno 2 giorni, con nessun'altra causa, da 8 settimane dall'ultima terapia antibiotica standard con vancomicina o fidaxomicina per 10 giorni
- immunoassay enzimatico (EIA) positivo per la tossina di CD o test molecolare per il gene (*gene locus*) della tossina di CD nelle feci
- sottoscrizione del consenso informato

Criteri d'esclusione pazienti

- età inferiore a 18 anni
- gastroenterite attiva dovuta a patogeni diversi dal CDI
- neutropenia \leq 0,5 x 10⁹/L

- evidenza radiologica di megacolon tossico o perforazione intestinale (ecografia o radiografia addominale (*abdominal CT scan or X-ray*))
- presenza di colostomia
- controindicazioni alla colonscopia
- grave malattia in corso a prognosi infausta nel breve/medio periodo
- qualsiasi condizione per la quale, secondo il medico, il trapianto di MFU metta a rischio la salute del paziente
- gravidanza
- storia di ipersensibilità al macrogol contenuto nelle preparazioni coloscopiche

Donatori

Selezione del donatore

Numerose evidenze dimostrano come non ci sia differenza fra donatori consanguinei e donatori non consanguinei in termini di efficacia e sicurezza, almeno quando il MFU è utilizzato per trattare l'infezione da CDI.

Prima della donazione è necessario fornire adeguate informazioni al donatore e deve essere acquisito il consenso informato dello stesso e il consenso al trattamento dei dati personali, come previsto dalla normativa vigente sulla privacy.

Prima della donazione di MFU è necessario un accurato screening del soggetto per evitare la trasmissione di malattie ai pazienti che consiste in tre procedure fondamentali:

1. screening iniziale tramite questionario preliminare;
2. screening tramite esami bioumorali (siero e feci) dei soggetti risultati idonei al questionario;
3. valutazione finale tramite questionario e test molecolare rapido per i principali patogeni enterici sul campione fecale il giorno stesso della donazione.

È fortemente consigliato lo screening del profilo di microbiota fecale e la comparazione del profilo tra donatore e ricevente.

1. Screening iniziale tramite questionario preliminare

Il questionario preliminare deve investigare tre principali aspetti:

- 1a)** storia nota o fattori di rischio per malattie infettive;
- 1b)** storia di malattie gastrointestinali, metaboliche, neurologiche;
- 1c)** utilizzo di farmaci/sostanze che possono alterare il microbiota intestinale.

1a) Storia nota o fattori di rischio per malattie infettive

- Storia nota o esposizione a HIV, HBV o HCV, sifilide, virus umano T-linfotropico I e II, malaria, tripanosomiasi, tubercolosi
- Infezione sistemica nota non controllata al momento della donazione
- Uso di droghe e/o sostanze illegali
- Comportamenti sessuali a rischio (rapporti/contatti sessuali occasionali/anonimi,

comportamenti sessuali ad alto rischio con prostitute, tossicodipendenti, soggetti positivi per HIV, epatiti, sifilide; prostituzione; storia di malattia sessualmente trasmissibile)

- Soggetto sottoposto a trapianto di tessuti / organi
- Precedente (<12 mesi) trasfusione di sangue/emocomponenti o somministrazione di emoderivati
- Recente (<6 mesi) puntura accidentale con siringhe
- Recente (<6 mesi) esecuzione di tatuaggi, piercing, agopuntura
- Recente trattamento medico in condizioni di scarsa igiene (es. ospedali da campo, trattamenti medici in condizioni di fortuna, trattamenti medici non standardizzati)
- Rischio di trasmissione di malattie causate da prioni (Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili) (presenza di anamnesi familiare per TSE e altri fattori di rischio)
- Recenti (<6 mesi) infezioni batteriche, virali, fungine o parassitarie con implicazione gastrointestinale
- Recenti viaggi (<6 mesi) in paesi tropicali, paesi ad alto rischio di malattie trasmissibili o diarrea del viaggiatore
- Recente (<6 mesi) storia di vaccinazione con virus attenuato vivo, se c'è un rischio di trasmissione
- Lavoro come operatore sanitario
- Lavoro a contatto con animali (per escludere il rischio di trasmissione di infezioni zoonotiche)
- Lavoro nel trattamento delle acque reflue e nel trattamento di rifiuti organici, es. compostaggio

1b) Patologie gastrointestinali, metaboliche, neurologiche

- Storia di sindrome dell'intestino irritabile, malattie infiammatorie croniche intestinali, stipsi cronica funzionale, morbo celiaco, altri disturbi gastro intestinali cronici
- Storia di malattie autoimmuni croniche e sistemiche con coinvolgimento gastrointestinale
- Storia o rischio elevato di cancro gastrointestinale (incluse poliposi)
- Comparsa recente di diarrea o ematochezia
- Storia di patologie neurologiche o psichiatriche
- Sovrappeso e obesità (indice di massa corporea > 25)

1c) Farmaci

- Recente (<3 mesi) di esposizione ad antibiotici, immunosoppressori, chemioterapici
- Terapia occasionale o continuativa con inibitori della pompa protonica effettuata nei 3 mesi precedenti

I soggetti risultati idonei al suddetto questionario dovranno eseguire un pannello di esami bioumorali su siero e feci. La maggioranza di tali esami è consigliata per ogni potenziale donatore, mentre alcuni esami sono consigliati per condizioni specifiche, a giudizio del medico.

2. Screening tramite esami bioumorali (siero e feci) dei soggetti risultati idonei al questionario

Gli esami bioumorali dovrebbero essere eseguiti al massimo 4 settimane prima della donazione.

2a) *Esami generali*

Sangue

Sierologia per agenti infettivi (tutti gli esami devono essere negativi):

- HAV IgM
- HBsAg
- anti-HBcAg (totale e IgM)
- HCV Ab
- HIV-1 e HIV-2 Ab/Ag
- HEV IgM
- *Treponema pallidum* Ab
- CMV Ab IgM
- EBV Ab IgM
- *Entamoeba histolytica* Ab

Altri parametri: emocromo, VES, PCR, glicemia, albumina, creatinina, elettroliti, transaminasi, bilirubina, γ GT, fosfatasi alcalina

Feci (tutti i risultati devono essere negativi):

Patogeni batterici

- *C. difficile* tossinogenico (test molecolare)
- *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* (test colturale o molecolare)
- *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* VT-produttore, enteroaggregativo, enteropatogeno, enterotossigeno, *Vibrio cholera* (test molecolare)
- *Listeria monocytogenes* (test colturale)
- *H. pylori* (antigene fecale)
- Patogeni multi-antibiotico-resistenti (Enterococchi vancomicina-resistenti, *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente, Gram negativi multiresistenti (Enterobatteri resistenti ai carbapenemi o produttori di ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* resistente ai carbapenemi, *Acinetobacter* resistente ai carbapenemi)) (test colturale)

Patogeni virali

- Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, Astrovirus e Sapovirus (test molecolare)

Altri patogeni

- *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayatanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis* (test molecolare)
- Uova, cisti e forme vitali di parassiti intestinali (esame coproparassitologico micro- e macroscopico, con inclusione di *Isospora*, Microsporidi ed elminti)

- Sangue occulto fecale

2b) Esami da effettuare in presenza di fattori di rischio

Sangue

- Sierologia per HTLV I e II
- Sierologia per *Strongyloides stercoralis*
- Sierologia per *Toxocara canis*

Feci

- Calprotectina fecale

3. Valutazione finale tramite questionario e test molecolare rapido per i principali patogeni enterici sul campione fecale il giorno stesso della donazione

3a) Questionario

Un ulteriore questionario viene somministrato ai donatori il giorno stesso della donazione per sincerarsi che non siano intervenuti, nell'intervallo fra l'acquisizione dei risultati e la donazione, eventi che potrebbero inficiare la procedura. È suggerito che tale questionario identifichi i seguenti punti:

- Comparsa di diarrea, nausea, vomito, dolore addominale, ittero, altri sintomi gastrointestinali
- Insorgenza di malattia, oppure, in generale, di febbre, mal di gola, linfadenopatie
- Uso di antibiotici o altri farmaci che possano alterare il microbiota intestinale
- Assunzione di sostanze potenzialmente nocive
- Nuovi partner sessuali, comportamenti sessuali ad alto rischio, viaggi all'estero (in particolare in ambienti tropicali), contatti con sangue umano
- Comparsa di diarrea tra le persone con cui si è frequentemente a contatto nel quotidiano

3b) Test molecolare rapido

Il giorno stesso della donazione deve essere inoltre eseguito il test molecolare rapido sul campione fecale per i principali patogeni enterici.

I soggetti che hanno superato tutte le fasi di valutazione e di controllo (compresi gli esami biumorali eseguiti al massimo 4 settimane prima della donazione) possono essere arruolati come donatori.

Per donazioni successive, se non vi sono cambiamenti nella salute dei donatori e non sono intervenuti accadimenti specifici, gli esami sul sangue e sulle feci possono essere considerati validi fino a 8 settimane dopo la prima donazione.

Dopo tale periodo tutte le analisi previste per la prima donazione vanno ripetute. La ripetizione di alcune analisi sierologico-infettivologiche potrebbe non essere necessaria alla luce dei risultati ottenuti nelle precedenti analisi. In ogni caso il test molecolare rapido va ripetuto a ogni donazione.

Prima della donazione, è necessario fornire adeguate informazioni al donatore e deve essere

acquisito il consenso informato del donatore e il consenso al trattamento dei dati personali come previsto dalla normativa vigente sulla privacy.

Nel caso di FMT in pazienti pediatriche, si suggerisce che i donatori siano selezionati tra i genitori, che risultano anche tutori del ricevente, escludendo nel caso di malattie infiammatorie croniche intestinali il genitore affetto da patologia comune col figlio. In questi pazienti è fortemente consigliato lo screening del profilo di microbiota fecale e la comparazione del profilo tra donatore e ricevente quale ulteriore attività della fase di selezione del donatore. Nei casi in cui i genitori non risultino eleggibili dopo screening, si può utilizzare un *donatore universale*.

PREPARAZIONE DEL MATERIALE FECALE

Il materiale fecale da utilizzare per il FMT può essere preparato il giorno stesso della procedura oppure essere congelato e conservato. Entrambi i processi di preparazione devono rispettare un insieme minimo di indicazioni, secondo la recente Consensus Conference sul FMT nella pratica clinica (Cammarota *et al.* – Gut 2017).

Il materiale fecale da utilizzare per il FMT deve provenire da donatori che sono stati selezionati secondo quanto indicato nei paragrafi precedenti.

Le operazioni di preparazione del microbiota fecale umano (MFU), dal ricevimento del materiale donato fino al rilascio del prodotto finale disponibile per il trapianto, devono essere documentate.

Il laboratorio che ha preparato il MFU deve accertarsi che il contenitore con il materiale donato abbia un'etichetta che riporti le seguenti informazioni: codice del donatore, data e ora della donazione, identificazione del paziente (se MFU fresco).

Preparazione del materiale fecale fresco

- Il tempo tra la donazione e il FMT non deve superare le 6 ore. È pertanto importante che le procedure di donazione, preparazione del MFU e FMT siano ben coordinate
- Per la preparazione del MFU deve essere utilizzato uno spazio dedicato provvisto di misure di controllo per batteri sporigeni e altri agenti infettivi
- Le manipolazioni critiche devono essere effettuate sotto cappa a flusso laminare verticale
- Per proteggere i batteri anaerobi, il materiale deve essere lavorato il più velocemente possibile
- Dal momento della raccolta al momento della preparazione, il materiale fecale può essere conservato a temperatura ambiente (20°C–30°C)
- Per ogni campione devono essere utilizzati un minimo di 30 g di feci diluiti in soluzione salina sterile. Un campione di 5 grammi *ca.* deve essere conservato a -80° per futuri esami
- Il suddetto materiale fecale deve essere sospeso nella soluzione salina tramite agitatore o manualmente, e quindi filtrato attraverso garza sterile o analogo sistema di filtrazione (es. filtro di metallo sterilizzabile)
- Devono essere utilizzati strumenti e dispositivi sterili di qualità, convalidati o espressamente certificati, ove possibile, marcati CE
- Durante la preparazione del campione, l'operatore deve indossare maschera facciale, guanti

protettivi e camice. La lavorazione del materiale fecale deve avvenire secondo il livello di sicurezza BSL 2

- Il materiale di lavorazione incluse le sacche per confezionare il prodotto finale devono essere sterili
- Il prodotto finale deve essere chiuso e sigillato in un prima sacca munita di una etichetta che riporti le stesse informazioni del materiale pervenuto dalla donazione. A questi dati devono essere aggiunti la data e l'orario limite massimo per la somministrazione del prodotto e la temperatura di conservazione. Il trasporto del prodotto, collocato in una seconda sacca, deve avvenire in un contenitore esterno per evitare il danneggiamento della sacca e gli sbalzi termici

Preparazione del materiale fecale congelato

Al termine della lavorazione del MFU si procede alla fase di congelamento come di seguito riportato:

1. Per ogni campione devono essere utilizzati un minimo di 50 g di feci e 150 mL di soluzione salina sterile. Un campione di 5 grammi ca. deve essere conservato a -80°C per futuri esami
2. Prima del congelamento, deve essere aggiunto glicerolo fino a una concentrazione finale del 10%
3. Il prodotto finale deve essere etichettato chiaramente e risultare tracciabile, e congelato a -80°C
4. Il giorno dell'infusione, la sospensione fecale è scongelata in acqua a 37°C e infusa entro 6 ore dallo scongelamento
5. Dopo lo scongelamento, si può aggiungere soluzione salina fino a ottenere il volume di sospensione desiderato
6. Lo scongelamento e il congelamento ripetuti devono essere evitati, anche perché una valutazione quantitativa della successiva perdita di diversità del microbiota totale, coltivabile e non coltivabile è di difficile attuazione

Metodologia procedurale e vie di somministrazione

Prima del trattamento è necessario che il paziente sia informato adeguatamente sulle procedure e che fornisca il suo consenso.

Terapia antibiotica pre-trapianto di MFU

I pazienti con rCDI devono essere trattati con vancomicina o fidaxomicina almeno per 3 giorni prima del trapianto. Tali antibiotici devono essere interrotti 12-48 ore prima dell'infusione fecale. In caso di emergenza, e in caso di pronta disponibilità del materiale fecale, tale terapia antibiotica può essere evitata.

Preparazione intestinale dei riceventi

I riceventi sono preparati con lavaggio intestinale con polietilenglicole (PEG) prima della procedura di trapianto, quando essa viene effettuata sia tramite colonscopia, sia tramite il tratto digerente superiore.

Vie di somministrazione

Il materiale fecale può essere infuso attraverso vie di somministrazione differenti, in particolare: tramite il tratto digerente superiore (come ad esempio gastroscopia, sondino nasogastrico o nasodigunale, enteroscopia, gastrostomia percutanea) e il tratto digestivo inferiore (colonscopia e clistere). Quest'ultima via di somministrazione sembra portare ad *outcome* di efficacia migliori rispetto a quella per via orale. In caso di infusione tramite clistere, il paziente deve essere istruito a trattenere il materiale infuso per almeno 30 minuti e mantenere la posizione supina al fine di ridurre al minimo l'impulso alla defecazione.

La colonscopia è capace di esplorare l'intero colon e può quindi valutare le caratteristiche della patologia meglio dei clisteri. Tale aspetto è rilevante in particolare per l'identificazione della colite pseudomembranosa, segno endoscopico di colite severa, la quale è un fattore prognostico negativo per la risoluzione dell'infezione dopo infusione singola, pertanto dovrebbe essere trattata con infusioni fecali multiple.

In caso di somministrazione tramite colonscopia, il materiale fecale dovrebbe essere infuso nel colon destro; in caso di colite severa, le feci possono essere infuse anche nel colon sinistro, per motivi di sicurezza.

In caso di somministrazione tramite il tratto digestivo superiore, i pazienti devono essere tenuti in posizione verticale a 45° per 4 ore dopo l'infusione per prevenire l'aspirazione del materiale fecale.

In caso di condizioni critiche del paziente, l'utilizzo di clisteri dovrebbe essere preferito.

Il campione finale di MFU da somministrare al paziente deve consistere di almeno 30g di feci diluite in soluzione salina sterile.

In caso di fallimento o di recidiva dopo infusione fecale, la procedura può essere ripetuta a giudizio del clinico.

Il paziente è tenuto a firmare un apposito consenso informato prima di ogni procedura, per sua accettazione.

Considerazioni di sicurezza e monitoraggio del paziente

Follow-up dei pazienti

Dai dati di letteratura, il trapianto di MFU ha dimostrato di essere una procedura sicura, con un numero molto basso di effetti collaterali (e solitamente di lieve entità) anche nei pazienti immunocompromessi e nei pazienti critici, a prescindere dalla via di somministrazione. In caso di condizioni critiche del paziente, l'utilizzo di clisteri dovrebbe essere preferito. Gli eventi avversi a breve termine che accadono più comunemente dopo la procedura di trapianto di MFU sono: diarrea, dolori addominali, stipsi e febbre. Eventi avversi gravi, quali batteriemia, perforazione

intestinale, morte, sono molto rari.

Il paziente deve essere seguito nell'immediato periodo post-trapianto per valutare l'insorgenza di reazioni/eventi immediati. Reazioni/eventi avversi gravi devono essere segnalati alle autorità competenti. Successivamente il paziente deve essere seguito per almeno 8 settimane dopo la procedura di trapianto per valutare l'efficacia del trattamento e gli eventuali eventi avversi a breve termine.

Caso per caso deve essere valutata la frequenza dell'analisi del microbiota del paziente. Si ritiene utile una raccolta di campioni fecali a 7, 30 e 60 giorni dopo il trapianto per completare il follow-up clinico (diario sintomi, parametri di laboratorio), consentire la mappa (caratterizzazione) del microbiota intestinale del paziente e valutare l'attecchimento del microbiota donato.

4.2 Requisiti regolatori per la preparazione, la conservazione e l'impiego clinico del microbiota fecale destinato al FMT

4.2.1 Requisiti regolatori per la preparazione e conservazione del MFU destinato al FMT

Considerata la peculiarità della composizione del microbiota fecale umano (MFU) destinato ad applicazioni sull'uomo, non completamente riconducibile all'ambito di applicazione di "tessuti o cellule", al fine comunque di garantire elevati livelli di qualità e sicurezza e misure adeguate per il prelievo, la preparazione, la conservazione e la distribuzione del microbiota fecale umano e per il controllo degli eventuali rischi per i pazienti, si ritiene di poter fare riferimento alla regolamentazione in materia di "tessuti e cellule" e quindi considerare applicabili al MFU, ove possibile, i requisiti previsti dal decreto legislativo 6 novembre 2007, n. 191¹ e dal decreto legislativo 25 gennaio 2010, n. 16².

Secondo la normativa riportata, le attività sopracitate devono essere effettuate da una struttura autorizzata dalla Regione o Provincia autonoma come istituto dei tessuti o banca dei tessuti (art. 3, comma 1, lett. q), del d.lgs. 191/2007), secondo quanto previsto dall'articolo 6 del decreto legislativo 191/2007.

Pertanto, analogamente a quanto previsto per gli istituti dei tessuti, per la costituzione di una banca di MFU è necessario che la Regione o Provincia autonoma, ai fini dell'autorizzazione, organizzi le ispezioni e adotti adeguate misure di controllo per la verifica del possesso da parte della banca di MFU dei requisiti di cui ai decreti legislativi 191/2007 e 16/2010, e che vengano effettuate ispezioni periodiche (almeno ogni due anni) come previsto all'articolo 7 del d.lgs. 191/2007, avvalendosi del supporto del CNT. A tal fine, con Accordo Stato Regioni si dovranno stabilire anche i requisiti minimi per l'autorizzazione e accreditamento delle banche di MFU. La Regione o la Provincia autonoma organizza ispezioni e attua misure di controllo adeguate anche in caso di

¹ Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani,

² Attuazione delle direttive tecniche 2006/17/CE e 2006/86/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.

reazioni o eventi avversi gravi, sempre avvalendosi del supporto del CNT.

Donazione di MFU

I principi della donazione di MFU sono gli stessi previsti per tessuti e cellule e si basano sulla volontarietà, sull'anonimato e sulla gratuità del gesto.

Protezione dei dati e tutela della riservatezza

Tutti i dati, comprese le informazioni genetiche, raccolti ai sensi delle disposizioni vigenti e ai quali abbiano accesso terzi, sono resi anonimi in modo tale che né il donatore né il ricevente siano identificabili.

A tale fine è garantito che:

- a) siano adottate misure di protezione dei dati e misure di tutela volte a evitare aggiunte, soppressioni o modifiche dei dati non autorizzate negli archivi riguardanti i donatori o nei registri dei donatori esclusi, o qualunque trasferimento di informazioni;
- b) siano istituite procedure volte a risolvere le divergenze tra i dati;
- c) non avvenga alcuna divulgazione non autorizzata di tali informazioni, garantendo nel contempo la tracciabilità delle donazioni.

Nel rispetto delle disposizioni vigenti in materia, l'identità del o dei riceventi non è rivelata al donatore o alla sua famiglia e viceversa, con l'eccezione del donatore familiare.

Selezione, consenso del donatore e prelievo

Le attività connesse al prelievo del MFU sono effettuate in modo da assicurare che la valutazione e la selezione del donatore si svolgano nel rispetto dei criteri previsti nell'allegato 1 del d.lgs. 16/2010 e da quanto indicato nella parte relativa agli "Aspetti Clinici" del presente documento. Il donatore deve essere sottoposto agli esami previsti dall'allegato 2 del d.lgs. 16/2010 e da quanto indicato in merito agli "Aspetti Clinici". L'idoneità del donatore deve essere rilasciata da un medico e deve essere adeguatamente documentata.

La persona responsabile del processo di donazione garantisce che il donatore, o i soggetti legittimati ad esprimere il consenso alla donazione, siano stati adeguatamente informati almeno degli aspetti relativi al processo di donazione e approvvigionamento di cui sopra. Le informazioni sono fornite prima dell'approvvigionamento.

Le informazioni sono fornite da personale sanitario appositamente formato, capace di comunicarle in modo chiaro e adeguato, usando termini facilmente comprensibili per il donatore o per i soggetti legittimati ad esprimere il consenso alla donazione.

Dette informazioni comprendono: scopo, natura, conseguenze e rischi dell'approvvigionamento, esami analitici, se effettuati, registrazione e protezione dei dati del donatore, riservatezza medica nonché informazioni sulle garanzie applicabili volte a tutelare il donatore.

Il donatore e i soggetti legittimati a esprimere il consenso alla donazione sono informati del diritto a ottenere i risultati confermati degli esami analitici e a ricevere spiegazioni chiare in merito a tali risultati.

Il prelievo del MFU deve essere effettuato secondo modalità definite in specifiche procedure e previa acquisizione del consenso informato del donatore. Devono essere utilizzati strumenti e dispositivi sterili di qualità, convalidati o espressamente certificati e, ove possibile marcati CE.

Ricevimento del MFU

Le banche di MFU garantiscono che tutte le donazioni di MFU siano state sottoposte a opportuni controlli e che la selezione del donatore e l'accettazione del MFU siano risultate conformi a procedure operative interne e che sia presente la documentazione di accompagnamento.

L'accettazione o il rifiuto del MFU ricevuti sono documentati.

Le banche garantiscono la corretta e costante identificazione dei campioni di MFU. A ogni consegna o distribuzione di MFU è attribuito un codice d'identificazione.

Tracciabilità

Il MFU è reso identificabile tramite un'etichetta contenente le informazioni o i riferimenti che ne consentono il collegamento con le procedure per il prelievo del MFU, il ricevimento alla banca e i procedimenti di preparazione del MFU, la conservazione e il rilascio del prodotto.

Le banche di MFU conservano i dati necessari ad assicurare la tracciabilità in tutte le fasi dal donatore al ricevente. I dati richiesti ai fini della completa tracciabilità sono conservati per un periodo minimo di trenta anni dopo l'uso clinico. L'archiviazione dei dati può avvenire anche in forma elettronica.

Lavorazione

Le banche di MFU includono nelle proprie procedure operative standard ogni processo di lavorazione che incida sulla qualità e la sicurezza e assicurano che tali processi si svolgano in condizioni controllate. Nelle proprie procedure operative standard le banche di MFU adottano speciali disposizioni per la manipolazione del MFU e del materiale da scartare, al fine di impedire la cross contaminazione o la contaminazione dell'ambiente in cui avviene la lavorazione o del personale. Le suddette banche assicurano che il materiale utilizzato, l'ambiente di lavoro, nonché l'organizzazione, la convalida e le condizioni di controllo dei processi siano conformi a quanto indicato in merito agli "Aspetti clinici".

Etichettatura e confezionamento

I campioni di MFU devono essere muniti di un'etichetta leggibile e indelebile che riporti il codice del donatore e la data di prelievo e di lavorazione. Le banche di MFU devono avere procedure scritte relative all'etichettatura e al confezionamento e tali attività devono essere documentate.

Condizioni di stoccaggio

Le banche di MFU garantiscono che tutti i procedimenti connessi con lo stoccaggio di MFU siano documentati dalle procedure operative standard, al fine di prevenire qualunque evento che possa compromettere la funzione o l'integrità del MFU. I campioni di MFU lavorati non sono distribuiti fino a quando i requisiti previsti non sono stati soddisfatti.

Nel caso di cessazione dell'attività per qualsivoglia ragione, devono essere poste in atto misure per

garantire che i campioni di MFU stoccati, in conformità al consenso informato o l'espressione di volontà o l'autorizzazione alla donazione acquisiti, siano trasferiti ad altro istituto o istituti dei tessuti autorizzati e accreditati.

Trasporto e distribuzione

Le banche di MFU garantiscono la qualità dei campioni di MFU durante la distribuzione e il trasporto, che avviene nel rispetto delle condizioni previste.

Registro della banca e obblighi informativi

Le banche di MFU istituiscono e conservano un registro delle loro attività, nel quale sono riportati il numero di MFU prelevati, controllati, conservati, lavorati, stoccati e distribuiti, l'origine e la destinazione dei campioni di MFU. Tali informazioni devono essere comunicate tramite una relazione annuale alle Regioni o alle Province autonome e al CNT.

Notifica di eventi e reazioni avversi gravi

Il medico o la struttura sanitaria che utilizza MFU, comunica alla banca di MFU coinvolta nella donazione, approvvigionamento, controllo, lavorazione, stoccaggio e distribuzione del medesimo MFU, ogni eventuale evento e reazione avversi gravi.

Secondo la normativa vigente, con reazione avversa grave s'intende una risposta non voluta nel donatore o nel ricevente, compresa una malattia trasmissibile, connessa con l'approvvigionamento o l'applicazione sull'uomo di tessuti o cellule, che provochi la morte, metta in pericolo la vita o produca invalidità o incapacità dell'interessato, o ne produca o prolunghi l'ospedalizzazione o lo stato di malattia.

Con evento avverso grave s'intende qualunque evento negativo collegato con l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule, che possa provocare la trasmissione di malattie trasmissibili, la morte o condizioni di pericolo di vita, di invalidità o incapacità dei pazienti, o ne produca o prolunghi l'ospedalizzazione o lo stato di malattia.

La persona responsabile della banca di MFU garantisce che la Regione o la Provincia autonoma e il CNT, siano informati degli eventi o reazioni avversi gravi e che ricevano una relazione analitica delle relative cause e conseguenze.

Ciascuna banca di MFU stabilisce una procedura accurata, rapida e verificabile per ritirare dalla distribuzione qualsiasi prodotto che possa essere connesso a eventi o reazioni avverse.

Gestione della qualità

Ciascuna banca di MFU deve predisporre un sistema di qualità che comprenda almeno la seguente documentazione:

- a) procedure operative standard;
- b) linee-guida;
- c) manuali di formazione e di riferimento;
- d) moduli per le relazioni;

- e) dati relativi ai donatori;
- f) informazioni sulla destinazione finale del MFU.

Persona responsabile

L'Ente titolare dell'autorizzazione e accreditamento, in funzione delle attività svolte dalla banca di MFU, ne designa il responsabile che soddisfa almeno le seguenti condizioni:

- a) possesso del diploma di laurea in medicina e chirurgia o in scienze biologiche o chimiche; nel caso in cui la persona responsabile sia un biologo o chimico, gli deve essere comunque assicurata la possibilità di avvalersi di una professionalità medica per gli aspetti di competenza;
- b) esperienza pratica di almeno due anni nei settori pertinenti.

La persona Responsabile ha le seguenti responsabilità:

- a) garantire che il MFU destinato ad applicazioni sull'uomo, nell'ambito dell'istituto di cui è responsabile, sia prelevato, controllato, lavorato, stoccato e distribuito, ove possibile, ai sensi del d.lgs. 191/2007.

L'Ente titolare dell'autorizzazione e accreditamento comunica alla Regione o alla Provincia autonoma il nome della persona responsabile della banca di MFU. Qualora la persona responsabile debba essere temporaneamente o permanentemente sostituita, il sopraindicato Ente comunica alla Regione o alla Provincia autonoma il nome del nuovo responsabile e la data di assunzione delle funzioni.

Personale

Il personale della banca di MFU che interviene direttamente nelle attività connesse con l'approvvigionamento, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di MFU possiede le qualifiche necessarie per svolgere tali funzioni e riceve adeguata formazione professionale e periodico aggiornamento.

Rapporti fra istituti dei tessuti e terzi

Gli accordi conclusi fra una banca di MFU e terzi specificano in particolare le responsabilità che gravano sui terzi e le relative procedure dettagliate.

REQUISITI PER UN CENTRO DI FMT

Le attività di FMT possono essere effettuate presso un Centro di FMT, con un compito di governo clinico per la gestione del programma e di coordinamento di un team multidisciplinare costituito almeno da gastroenterologi, microbiologi e infettivologi, all'interno di aziende sanitarie ospedaliere, aziende ospedaliere/universitarie, Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico (IRCCS), Presidi di grandi dimensioni della Azienda sanitaria locale (ASL) e aziende sanitarie private accreditate con il Servizio Sanitario Nazionale (SSN).

Il Centro di FMT è identificato presso una struttura clinica, un reparto di gastroenterologia o medicina interna specializzata in malattie dell'apparato gastrointestinale, ed è responsabile della

selezione dei pazienti e dei donatori, della somministrazione di FMT e del follow-up dei pazienti. È necessario inoltre che all'interno dell'azienda siano presenti un servizio di endoscopia, un locale dedicato alla preparazione di MFU, un laboratorio di microbiologia responsabile della preparazione e del rilascio del MFU per la procedura di FMT e che sia assicurata una consulenza infettivologica o l'accesso a un reparto di malattie infettive.

1. Requisiti della struttura clinica

Devono essere disponibili stanze di degenza o ambulatoriali dedicati nonché un'attività ambulatoriale dedicata per la gestione clinica dei donatori e dei riceventi.

Il centro di FMT deve documentare i trattamenti di FMT effettuati attraverso la registrazione delle procedure, comprensive dei dati relativi ai pazienti/donatori, alla preparazione del MFU e alla qualità del prodotto finale e i risultati in termini di efficacia e di sicurezza del trattamento.

2. Requisiti laboratoristici

Il laboratorio di microbiologia deve assicurare:

- ✓ l'utilizzo di metodiche di *Next generation sequencing* (NGS) per la definizione del profilo di microbiota del donatore, che insieme alle caratteristiche cliniche, indirizzi nella scelta del donatore idoneo;
- ✓ la gestione in qualità del processo di laboratorio mediante tecniche convenzionali e molecolari per lo screening infettivologico sul donatore e sul materiale da infondere, comprensivo dei test rapidi per l'individuazione dei più importanti patogeni responsabili di patologie gastrointestinali;
- ✓ la partecipazione a controlli di qualità interni ed esterni (VEQ), con esito positivo, e l'implementazione di un sistema di gestione della qualità a garanzia del massimo grado di sicurezza e qualità microbiologica del prodotto.

3. Requisiti del locale per la preparazione di FMT

- ✓ Il Centro FMT deve disporre di un locale/area dedicato al controllo, alla lavorazione e alla distribuzione del FMU nel rispetto dei requisiti di qualità e sicurezza previsti dal d.lgs. 191/07 per le suddette fasi;
- ✓ le attività di preparazione del FMU devono essere condotte in conformità a quanto descritto nei paragrafi precedenti;
- ✓ l'area deve possedere i requisiti previsti per un laboratorio BSL2.

Nota: A fronte di evidenze scientifiche che si rendessero disponibili si procederà a una immediata revisione del presente documento.

Bibliografia

1. Aas J, Gessert CE, Bakken JS. Recurrent clostridium difficile colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis* 2003;36:580–5.
2. Agrawal M, Aroniadis OC, Brandt LJ, et al. The long-term efficacy and safety of fecal microbiota transplant for recurrent, severe, and complicated clostridium difficile infection in 146 elderly individuals. *J Clin Gastroenterol* 2016;50: 403–7.
3. Alang N, Kelly CR. Weight gain after fecal microbiota transplantation. *Open Forum Infect Dis* 2015;2:ofv004.
4. American Gastroenterological Association Center for Gut Microbiome Research & Education. Center establishes NIH-funded registry to track FMT. <http://www.gastro.org/about/initiatives/aga-center-for-gut-microbiome-research-education> (accessed 5 Oct 2016).
5. Angelberger S, Reinisch W, Makristathis A, et al. Temporal bacterial community dynamics vary among ulcerative colitis patients after fecal microbiota transplantation. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1620–30.
6. Aroniadis OC, Brandt LJ, Greenberg A, et al. Long-term follow-up study of fecal microbiota transplantation for severe and/or complicated Clostridium difficile infection: a multicenter experience. *J Clin Gastroenterol* 2016;50:398–402.
7. Atkins D, Best D, Briss PA, et al. Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2004;328:1490.
8. Bahl MI, Bergström A, Licht TR. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. *FEMS Microbiol Lett* 2012;329:193–7.
9. Bakken JS, Borody T, Brandt LJ, et al. Treating Clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:1044–9.
10. Bakken JS, Polgreen PM, Beekmann SE, et al. Treatment approaches including fecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection (RCDI) among infectious disease physicians. *Anaerobe* 2013;24:20–4.
11. Baxter M, Ahmad T, Colville A, et al. Fatal aspiration pneumonia as a complication of fecal microbiota transplant. *Clin Infect Dis* 2015;61:136–7.
12. Baxter M, Colville A. Adverse events in faecal microbiota transplant: a review of the literature. *J Hosp Infect* 2016;92:117–27.
13. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1079–87.
14. Browne HP, Forster SC, Anonye BO, et al. Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* 2016;533:543–6.
15. Cammarota G, et al. *Gut* 2017;0:1–12. doi:10.1136/gutjnl-2016-313017 Guidelines
16. Cammarota G, Ianiro G, Gasbarrini A. Fecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile infection: a systematic review. *J Clin Gastroenterol* 2014;48:693–702.
17. Cammarota G, Ianiro G, Magalini S, et al. Decrease in surgery for Clostridium difficile infection after starting a program to transplant fecal microbiota. *Ann Intern Med* 2015;163:487–8.
18. Cammarota G, Masucci L, Ianiro G, et al. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent Clostridium difficile infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:835–43.
19. Commission Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells.
20. Costello SP, Tucker EC, La Brooy J, et al. Establishing a fecal microbiota transplant service for the treatment of Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis* 2016;62:908–14.

21. Cui B, Feng Q, Wang H, et al. Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn's disease: safety, feasibility, and efficacy trial results. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30:51–8.
22. DAIDS Guidelines for Good Clinical Laboratory Practice Standards. 09 July 2013. 1–105. <http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/resources/DAIDSClinRsrch/Documents/gclp.pdf> (accessed 31 Aug 2016).
23. Damman CJ, Brittnacher MJ, Westerhoff M, et al. Low level engraftment and improvement following a single colonoscopic administration of fecal microbiota to patients with ulcerative colitis. *PLoS ONE* 2015;10:e0133925.
24. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2016;65:426–36.
25. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(Suppl 2):1–26.
26. Dennis M, Salpeter MJ, Hota S. Low awareness but positive attitudes toward fecal transplantation in Ontario physicians. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2015;26:30–2.
27. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells.
28. Downloaded from <http://gut.bmj.com/> on January 23, 2017 - Published by group.bmj.com 6 Drekonja D, Reich J, Gezahegn S, et al. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *Ann Intern Med* 2015;162:630–8.
29. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 1958;44:854–9.
30. Fischer M, Kao D, Mehta SR, et al. Predictors of early failure after fecal microbiota transplantation for the therapy of *Clostridium difficile* infection: a multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2016;111:1024–31.
31. Fischer M, Sipe BW, Rogers NA, et al. Faecal microbiota transplantation plus selected use of vancomycin for severe-complicated *Clostridium difficile* infection: description of a protocol with high success rate. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;42:470–6.
32. Frank J, Högenauer C, Gröchenig HP, et al. Safety of fecal microbiota transplantation in patients with chronic colitis and immunosuppressive treatment [abstract]. *J Crohns Colitis* 2015;9:S245.
33. Freedberg DE, Toussaint NC, Chen SP, et al. Proton pump inhibitors alter specific taxa in the human gastrointestinal microbiome: a crossover trial. *Gastroenterology* 2015;149:883–5.
34. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 2004;25:375–88.
35. Furuya-Kanamori L, Doi SA, Paterson DL, et al. Upper versus lower gastrointestinal delivery for transplantation of fecal microbiota in recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection: a collaborative analysis of individual patient data from 14 studies. *J Clin Gastroenterol*. Online Published First: 11 March 2016.
36. Good clinical laboratory practice (GCLP). World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2009:1–28. <http://>
37. Gorkiewicz G, Thallinger GG, Trajanoski S, et al. Alterations in the colonic microbiota in response to osmotic diarrhea. *PLoS One* 2013;8:e55817.
38. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2011;53:994–1002.
39. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2008;336:924–6.

40. Gweon TG, Kim J, Lim CH, et al. Fecal microbiota transplantation using upper gastrointestinal tract for the treatment of refractory or severe complicated *Clostridium difficile* infection in elderly patients in poor medical condition: the first study in an Asian country. *Gastroenterol Res Pract* 2016;2016:2687605.
41. Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, et al. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 2013;107:761–7.
42. Hirsch BE, Saraiya N, Poeth K, et al. Effectiveness of fecal-derived microbiota transfer using orally administered capsules for recurrent *Clostridium difficile* infection. *BMC Infect Dis* 2015;17:191. Cammarota G, et al. *Gut* 2017;0:1–12. doi:10.1136/gutjnl-2016-313017 11idelines Downloaded from <http://gut.bmj.com/> on January 23, 2017 - Published by group.bmj.com
43. Holvoet T, Joossens M, Wang J, et al. Assessment of faecal microbial transfer in irritable bowel syndrome with severe bloating. *Gut* 2016; doi:10.1136/gutjnl-2016-312513 [Epub ahead of print: 10 Aug 2016].
44. Hsu CC, Sandford BA. The Delphi technique: making sense of consensus. *Pract Assess Res Eval* 2007;12:1–6.
45. <http://ir.serestherapeutics.com/phoenix.zhtml?c=254006&p=iro1-newsArticle&ID=2190006>
46. Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* 2016;65:740–8.
47. Jalanka J, Salonen A, Salojärvi J, et al. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut* 2015;64:1562–8.
48. Jiang ZD, Hoang LD, Lasco TM, et al. Physician attitudes toward the use of fecal transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection in a metropolitan area. *Clin Infect Dis* 2013;56:1059–60.
49. Kakhana K, Fujioka Y, Suda W, et al. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut.
50. Kassam Z, Lee CH, Yuan Y, et al. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:500–8.
51. Kelly CR, de Leon L, Jasutkar N. Fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection in 26 patients: methodology and results. *J Clin Gastroenterol* 2012;46:145–9.
52. Kelly CR, Ihunnah C, Fischer M, et al. Fecal microbiota transplant for treatment of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1065–71.
53. Kelly CR, Khorutz A, Staley C, et al. Effect of fecal microbiota transplantation on recurrence in multiply recurrent *Clostridium difficile* infection. *Ann Intern Med* 2016;165:609–16.
54. Khanna S, Pardi DS, Kelly CR, et al. A novel microbiome therapeutic increases gut microbial diversity and prevents recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Infect Dis* 2016;214:173–81.
55. Khoruts A, Rank KM, Newman KM, et al. Inflammatory bowel disease affects the outcome of fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:1433–8.
56. Kump PK, Gröchenig HP, Lackner S, et al. Alteration of intestinal dysbiosis by fecal microbiota transplantation does not induce remission in patients with chronic active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:2155–65.
57. Kump PK, Gröchenig HP, Spindelbock W, et al. Preliminary clinical results of repeatedly fecal microbiota transplantation (FMT) in chronic active ulcerative colitis [abstract]. *United European Gastroenterol J* 2013;1S:A57.
58. Kump PK, Krause R, Steininger C, et al. Recommendations for the use of faecal microbiota transplantation “stool transplantation”: consensus of the Austrian Society of Gastroenterology and Hepatology (ÖGGH) in cooperation with the Austrian Society of Infectious Diseases and Tropical Medicine. *Z Gastroenterol* 2014;52:1485–92.

- 59.Lagier JC, Delord M, Million M, et al. Dramatic reduction in *Clostridium difficile* ribotype 027-associated mortality with early fecal transplantation by the nasogastric route: a preliminary report. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:1597–601.
- 60.Lee CH, Belanger JE, Kassam Z, et al. The outcome and long-term follow-up of 94 patients with recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection using single to multiple fecal microbiota transplantation via retention enema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:1425–8.
- 61.Lee CH, Steiner T, Petrof EO, *et al.* Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection: a randomized clinical trial. *JAMA* 2016;315:142–9.
- 62.Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, et al. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 2015;372:825–34.
- 63.Liao CH, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Lett Appl Microbiol* 2003;37:45–50.
- 64.Link A, Lachmund T, Schulz C, et al. Endoscopic peroral jejunal fecal microbiota transplantation. *Dig Liv Dis* 2016;48:1336–9.
- 65.Mattila E, Uusitalo-Seppälä R, Wuorela M, et al. Fecal transplantation, through colonoscopy, is effective therapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology* 2012;142:490–6.
- 66.McGlone SM, Bailey RR, Zimmer SM, et al. The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:282–9.
- 67.Meighani A, Hart BR, Mittal C, et al. Predictors of fecal transplant failure. *Eur J Gastro Hep* 2016;28:826–30.
- 68.Miller JM, Astles R, Baszler T, et al., Biosafety Blue Ribbon Panel; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon panel. *MMWR Suppl* 2012;61:1–102.
- 69.Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, et al. Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2015;149:102–9.
- 70.Moschen AR, Gerner RR, Wang J, et al. Lipocalin 2 protects from inflammation and tumorigenesis associated with gut microbiota alterations. *Cell Host Microbe* 2016;19:455–69.
- 71.Olsen MA, Yan Y, Reske KA, et al. Recurrent *Clostridium difficile* infection is associated with increased mortality. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:164–70.
- 72.Paramsothy S, Kamm M, Walsh A, et al. Multi-donor intense faecal microbiota transplantation is an effective treatment for resistant ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial [abstract]. *J Crohns Colitis* 2016;10:S14.
- 73.Puch et al., 2018 Cost-Effectiveness of Competing Treatment Strategies for *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review.
- 74.Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HGJ, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:1792–801.
- 75.Ren RR, Sun G, Yang YS, et al. Chinese physicians' perceptions of fecal microbiota transplantation. *World J Gastroenterol* 2016;22:4757–65.
- 76.Rossen NG, Fuentes S, van der Spek MJ, et al. Findings from a randomized controlled trial of fecal transplantation for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2015;149:110–18.
- 77.Satokari R, Fuentes S, Mattila E, et al. Fecal transplantation treatment of antibiotic-induced, noninfectious colitis and long-term microbiota follow-up. *Case Rep Med* 2014;2014:913867.
- 78.Satokari R, Mattila E, Kainulainen V, et al. Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection—an observational cohort study. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:46–53.

- 79.Seres Therapeutics Announces Interim Results from SER-109 Phase 2 ECOSPOR Study in Multiply Recurrent Clostridium Difficile Infection. <http://ir.serestherapeutics.com/phoenix.zhtml?c=254006&p=irol-newsArticle&ID=2190006> (accessed 6 Oct 2016).
- 80.Sleight SC, Wigginton NS, Lenski RE. Increased susceptibility to repeated freeze-thaw cycles in *Escherichia coli* following long-term evolution in a benign environment. *BMC Evol Biol* 2006;6:104.
- 81.Sofi AA, Georgescu C, Sodeman T, et al. Physician outlook toward fecal microbiota transplantation in the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1661–2.
- 82.Sokol H, Galperine T, Kapel N, et al. Faecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infection: Recommendations from the French Group of Faecal Microbiota Transplantation. *Dig Liver Dis* 2016;48:242–7.
- 83.Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1183–9.
- 84.Solari PR, Fairchild PG, Noa LJ, et al. Tempered enthusiasm for fecal transplant. *Clin Infect Dis* 2014;59:319.
- 85.Surawicz CM, Alexander J. Treatment of refractory and recurrent *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:330–9.
- 86.Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol* 2013;108:478–98.
- 87.Suskind DL, Singh N, Nielson H, et al. Fecal microbial transplant via nasogastric tube for active pediatric ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60:27–9.
- 88.Trubiano JA, Cheng AC, Korman TM, et al. Australasian Society of Infectious Diseases updated guidelines for the management of *Clostridium difficile* infection in adults and children in Australia and New Zealand. *Intern Med J* 2016;46:479–93.
- 89.van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;368:407–15.
- 90.Varier RU, Biltaji E, Smith KJ, et al. Cost-effectiveness analysis of fecal microbiota transplantation for recurrent *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015;36:438–44.
- 91.Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;143:913–16.
- 92.Wadhwa A, Al Nahhas MF, Dierkhising RA, et al. High risk of post-infectious irritable bowel syndrome in patients with *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;44:576–82.
- 93.Waye A, Atkins K, Kao D. Cost averted with timely fecal microbiota transplantation in the management of recurrent *Clostridium difficile* infection in Alberta, Canada. *J Clin Gastroenterol* 2016;50:747–53.
- 94.Weingarden AR, Hamilton MJ, Sadowsky MJ, et al. Resolution of severe *Clostridium difficile* infection following sequential fecal microbiota transplantation. *J Clin Gastroenterol* 2013;47:735–7.
- 95.www.who.int/tdr/publications/documents/gclp-web.pdf (accessed 31 Aug 2016).
- 96.Youngster I, Russell GH, Pindar C, et al. Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection. *JAMA* 2014;5:1772–8.
- 97.Youngster I, Sauk J, Pindar C, et al. Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clin Infect Dis* 2014;58:1515–22.
- 98.Zabana Y, Van Domselaar M, Garcia-Planella E, et al. Perianal disease in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *J Crohns Colitis* 2011;5:338–41.
- 99.Zipursky JS, Sidorsky TI, Freedman CA, et al. Patient attitudes toward the use of fecal microbiota transplantation in the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2012;55:1652–8.

Programma Nazionale sul Trapianto di Microbiota Fecale umano (FMT) – aspetti regolatori, clinici e organizzativi

Premessa

In considerazione dei risultati ottenuti dall'applicazione del FMT per il trattamento di pazienti adulti affetti da infezioni ricorrenti causate da *Clostridium difficile* (*C. difficile*) refrattari alla antibiotico terapia standard e considerato che per l'applicazione del FMT da parte delle Regioni e Province autonome è necessario il completamento del quadro regolatorio, anche attraverso la definizione dell'Accordo Stato Regioni sui requisiti minimi organizzativi, tecnologici e strutturali, è auspicabile che possa essere avviato un programma nazionale al fine di acquisire dati utili a definire standard di qualità relativi all'assistenza dei pazienti. In tale ottica si è predisposto il presente documento recante il Programma nazionale che, con il coordinamento del Centro Nazionale Trapianti (CNT), è finalizzato all'applicazione del FMT presso strutture sanitarie con idonee caratteristiche clinico organizzative e che prevede le indicazioni procedurali per l'adesione al programma e metodologiche per l'esecuzione del FMT.

1. Introduzione

Il trapianto di microbiota fecale umano (FMT) consiste nella somministrazione del materiale fecale di un donatore sano nell'intestino di un soggetto malato per il trattamento di specifiche patologie correlate a uno squilibrio del microbiota intestinale.

Il FMT è stato recentemente proposto come opzione terapeutica in casi di infezione ricorrente da *C. difficile* resistente alla terapia antibiotica nell'adulto.

L'infezione da *C. difficile* si può manifestare con un quadro di colite grave soprattutto in pazienti anziani e ospedalizzati, potendo dar luogo a complicanze severe come megacolon, perforazione intestinale, shock. La patologia, tipicamente associata a uno stato di alterazione del microbiota intestinale, molto spesso causato dall'assunzione di antibiotici, è legata alla produzione di tossine che danneggiano la mucosa intestinale e determinano infiammazione e diarrea. Il trattamento standard dell'infezione da *C. difficile* prevede l'utilizzo di vancomicina o fidaxomicina come terapia di prima linea, ma si assiste in molti casi alla ricorrenza dell'infezione con ricomparsa dei sintomi e di positività delle tossine nelle feci. Il fenomeno sembra essere correlato al persistere dello stato di alterazione del microbiota intestinale causata dall'uso degli antibiotici stessi. La comparsa di ceppi nosocomiali resistenti a certi antibiotici e dotati di maggiore virulenza ha recentemente aumentato la numerosità dei casi e la loro severità. Il tasso di incidenza e la mortalità delle infezioni da *C. difficile* è notevolmente aumentato negli ultimi decenni soprattutto in ambiente ospedaliero e comunitario.

Alla luce dell'elevato tasso di efficacia nella cura dell'infezione ricorrente da *C. difficile* (92-94%) e di un numero molto basso di effetti collaterali (la maggioranza di lieve entità) dimostrato da

review sistematiche e metanalisi, comprendenti anche molti studi clinici randomizzati e controllati, il FMT risulta essere un'arma terapeutica molto efficace per il trattamento di pazienti affetti da infezione ricorrente da *C. difficile* refrattari alla antibiotico terapia standard (rCDI). Linee guida americane ed europee raccomandano il FMT quale opzione terapeutica consolidata per il trattamento della forma ricorrente dell'infezione.

Infine, durante la “European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice”, tenutasi a luglio 2017 a Roma, è stato evidenziato che il FMT comporta un notevole risparmio economico per il sistema sanitario rispetto alle cure mediche attualmente disponibili.

2. Inquadramento regolatorio

Dal punto di vista dell'inquadramento regolatorio, considerata la peculiarità della composizione, il microbiota fecale umano (MFU) destinato ad applicazioni sull'uomo, non rientra in un ambito normativo ben definito quale quello dei medicinali o quello del trapianto di tessuti e cellule. Secondo il parere legale della SANTE della Commissione europea, il MFU è da considerarsi “flora batterica” nella quale le eventuali cellule non esercitano un'azione terapeutica primaria. La presenza nel microbiota di flora batterica e di cellule di origine umana può determinare la trasmissione di agenti patogeni dal donatore al ricevente e pertanto i requisiti previsti dalle norme sui trapianti di cellule e tessuti (Direttiva europea 2004/23/CE e successive direttive di attuazione) possono considerarsi adeguati per assicurare la qualità e sicurezza del FMT. La Commissione europea ha lasciato agli Stati Membri la decisione di applicare tali requisiti.

Il Consiglio Superiore di Sanità, sentito anche il parere dell'Agenzia Italiana del Farmaco, ha concluso, nella seduta del 12 maggio 2015, che “nelle more di una specifica regolamentazione, al momento si possa condividere la proposta di inquadramento della procedura in questione nei termini prospettati dalla Direzione generale della prevenzione sanitaria e dal CNT e che pertanto, si possa far riferimento ai principali requisiti di qualità e sicurezza previsti dal d.lgs. 191/2007³ e dal d.lgs. 16/2010⁴”.

Dall'applicazione delle norme su tessuti e cellule e, in particolare, in relazione agli istituti dei tessuti (banche) di cui all'articolo 3, comma 1, lett. q) del decreto legislativo 191/2007, ne consegue che la preparazione e la conservazione del MFU debbano essere effettuate in una “banca” che, come previsto dal decreto legislativo citato (art.6), sia specificatamente autorizzata/accreditata allo svolgimento di tali attività. L'autorizzazione/accreditamento viene rilasciata dalla regione o provincia autonoma che, avvalendosi del supporto del CNT effettua come previsto dal decreto legislativo 191/2007 (art.7), i controlli ispettivi periodici al fine di verificare il

³ Decreto legislativo 6 novembre 2007, n 191 recante “Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani”

⁴ Decreto legislativo 25 gennaio 2010, n 16 recante “Attuazione delle direttive tecniche 2006/17/CE e 2006/86/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani”.

possesso dei principi e requisiti di cui ai decreti legislativi 191/2007 e 16/2010.

Come previsto dall'art. 6, del decreto legislativo 191/2007, con Accordo Stato Regioni potranno essere successivamente stabiliti i requisiti minimi organizzativi, tecnologici e strutturali per l'autorizzazione/accreditamento delle banche di MFU, anche sulla base dei risultati dell'applicazione del presente programma.

3. Obiettivi del programma

Sulla base dei risultati ottenuti dall'applicazione del FMT quale opzione terapeutica per il trattamento di pazienti adulti affetti da infezioni ricorrenti causate da *C. difficile*, refrattari alla antibiotico terapia standard (rCDI), il Consiglio Superiore di Sanità, nell'ambito del gruppo di lavoro costituito ad hoc sul MFU, sta finalizzando una linea guida comprendente oltre al protocollo clinico per il trattamento e il follow up del pazienti, anche le indicazioni per la selezione dei donatori, i criteri di idoneità dei laboratori e le metodiche standard per la caratterizzazione del MFU, i requisiti tecnici per la sua preparazione e conservazione, le caratteristiche dei centri clinici idonei al fine di rendere possibile l'esecuzione del FMT sul territorio nazionale.

Nelle more della definizione dell'Accordo Stato Regioni sopra menzionato per la definizione dei requisiti minimi organizzativi, tecnologici e strutturali e dell'applicazione della suddetta linea guida, al fine di poter effettuare il trattamento quale terapia consolidata per le infezioni ricorrenti causate da *C. difficile* e di acquisire ulteriori dati utili a definire standard di qualità relativi all'assistenza dei pazienti, si ritiene necessario avviare il presente Programma a livello nazionale, come fase post-sperimentale, con la partecipazione di strutture sanitarie che presentino le caratteristiche clinico-organizzative indicate nel presente documento. Il presente Programma Nazionale prevede che il MFU sia applicato facendo riferimento ai requisiti del decreto legislativo 191/2007 relativamente alle sole fasi di donazione, approvvigionamento, controllo, lavorazione e distribuzione, per quanto applicabili.

4. Caratteristiche del Programma nazionale

- Durata

Il programma prevede uno sviluppo in 2 anni.

- Indicazione terapeutica e somministrazione di MFU

L'unica indicazione clinica prevista è il FMT in pazienti adulti affetti da infezioni ricorrenti causate da *C. difficile* refrattarie alla antibiotico terapia standard (rCDI). L'infusione deve essere effettuata tramite l'utilizzo a fresco del microbiota donato con clistere o colonscopia, quest'ultima come via preferita di somministrazione. In condizioni cliniche particolari, qualora non sia possibile utilizzare la suddetta via di somministrazione si può ricorrere alla somministrazione attraverso il tratto digerente superiore. L'allegato 1 rappresenta il protocollo clinico (metodologia) per il trattamento e il follow up dei pazienti e comprende anche i criteri per la selezione dei donatori.

- *Preparazione del materiale fecale per il trapianto*

La lavorazione del materiale donato deve essere effettuata in un laboratorio che possiede i requisiti indicati successivamente. L'allegato 2 descrive le modalità di preparazione dell'MFU a fresco per il trapianto.

- *Strutture partecipanti*

Il programma prevede la partecipazione di Centri Clinici e di Laboratori di Microbiologia in possesso dei rispettivi specifici requisiti previsti dal presente documento.

Al momento è escluso dal presente Programma Nazionale il FMT in pazienti pediatriche e in tutte le indicazioni terapeutiche diverse dal rCDI, per le quali è necessario effettuare studi sperimentali condotti secondo le norme previste per la sperimentazione clinica sul trapianto⁵. Sulla base dei risultati ottenuti sarà predisposto un analogo programma nazionale che regolamenti il trapianto nei pazienti pediatriche.

5. Coordinamento del programma

Il Programma nazionale per il FMT è coordinato dal CNT che valuta le richieste di adesione e il possesso dei requisiti previsti per i Centri Clinici e i Laboratori di Microbiologia che intendono partecipare.

Il CNT cura la raccolta dei dati relativi ai trattamenti ed effettua la sorveglianza e la registrazione dei dati derivati dall'attuazione del Programma Nazionale. L'analisi dei risultati sarà condivisa con il Ministero e il Consiglio Superiore di Sanità.

6. Procedura di adesione

Le Regioni e le Province autonome trasmettono il presente Programma alle Aziende sanitarie che, verificato il possesso dei requisiti previsti, possono, previa approvazione da parte della propria Direzione generale, fare richiesta di adesione al programma stesso inviando la domanda al CNT.

Verificata la conformità dei Centri richiedenti ai requisiti previsti dal presente documento, e se necessario anche attraverso una verifica in loco, il CNT autorizza la partecipazione dei Centri Clinici al Programma, provvedendo a informare il Ministero della salute sui Centri aderenti e sulle fasi di inizio e svolgimento del Programma.

REQUISITI PER UN CENTRO DI FMT

Le Aziende sanitarie ospedaliere, Aziende ospedaliero/universitarie, Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico – IRCCS, Presidi di grandi dimensioni della Azienda sanitaria locale – ASL e

⁵ Accordo tra il Ministro della Salute, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente i requisiti delle strutture idonee ad effettuare trapianti di organi e tessuti sugli standard minimi di attività di cui all'art. 16, comma 1, della legge 1° aprile 1999, n. 91, recante: "Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e di tessuti", sancito in sede di Conferenza Stato-Regioni il 14 febbraio 2002 (Rep atti n 1388/CSR)

Aziende sanitarie private accreditate con SSN, devono identificare un Centro di FMT, con un compito di governo clinico per la gestione del programma di FMT e che coordini un team multidisciplinare costituito almeno da gastroenterologi, microbiologi e infettivologi.

Il Centro di FMT è identificato presso una struttura clinica, un reparto di gastroenterologia o medicina interna specializzata in malattie dell'apparato gastrointestinale, ed è responsabile della selezione dei pazienti e dei donatori, di tutte le procedure per la somministrazione di FMT, del follow up dei pazienti e dell'invio al CNT dei dati relativi ai trattamenti di cui sopra, incluse le segnalazioni di reazioni/eventi avversi verificatisi nei pazienti.

È necessario inoltre che all'interno dell'Azienda siano presenti un servizio di endoscopia, un locale dedicato alla preparazione di MFU, un laboratorio di microbiologia responsabile della preparazione e del rilascio del MFU per la procedura di FMT e che sia assicurata una consulenza infettivologica o l'accesso a un reparto di malattie infettive.

1. Requisiti della struttura clinica

Devono essere identificate stanze di degenza o ambulatoriali per la somministrazione di MFU.

Deve essere disponibile un'attività ambulatoriale dedicata per la gestione clinica dei donatori e dei riceventi.

Il centro di FMT deve documentare i trattamenti di trapianto effettuati attraverso la registrazione delle procedure, comprensive dei dati relativi ai pazienti/donatori, alla preparazione del MFU e alla qualità del prodotto finale e i risultati in termini di efficacia e di sicurezza del trattamento.

2. Requisiti del laboratorio di microbiologia

Il laboratorio di microbiologia deve assicurare:

- 2..1. la gestione in qualità del processo di laboratorio relativo allo screening infettivologico sul donatore e sul materiale da infondere, comprensivo delle tecniche convenzionali e dei test rapidi per l'individuazione dei più importanti patogeni trasmissibili;
- 2..2. la partecipazione a controlli di qualità interni ed esterni (VEQ), con esito positivo, e l'implementazione di un sistema di gestione della qualità a garanzia del massimo grado di sicurezza e qualità microbiologica del prodotto;
- 2..3. la possibilità di effettuare una analisi del MFU mediante metodiche di Next generation sequencing (NGS).

3. Requisiti del locale per la preparazione di FMT

- 3..1. Il Centro di FMT deve disporre di un locale/area dedicato al controllo, alla lavorazione e alla distribuzione del MFU nel rispetto dei requisiti di qualità e sicurezza previsti dal d.lgs. 3..2. 191/07 per le suddette fasi.
- 3..3. Le attività di preparazione del MFU devono essere condotte in conformità con quanto descritto nell'allegato 2 sotto il controllo del laboratorio di microbiologia.
- 3..4. L'area deve possedere i requisiti previsti per un laboratorio BSL2.

“Criteri e metodologia clinica per il trattamento dei pazienti affetti da infezioni da *Clostridium Difficile* ricorrenti (rCDI) e refrattarie al trattamento antibiotico standard.

PAZIENTI

Criteri di inclusione pazienti

- età \geq 18 anni
- diagnosi confermata di infezione di CDI multipla ricorrente a partire dal primo episodio di ricorrenza, con diarrea definita come 3 o più movimenti intestinali diarroici in 24 ore per almeno 2 giorni, con nessun'altra causa, da 8 settimane dall'ultima terapia antibiotica standard con vancomicina o fidaxomicina per 10 giorni
- immunoassay enzimatico (EIA) positivo per la tossina di CD o test molecolare per il gene (gene locus) della tossina di CD nelle feci
- sottoscrizione del consenso informato

Criteri di esclusione pazienti

- età inferiore a 18 anni
- gastroenterite attiva dovuta a patogeni diversi dal CD
- neutropenia $\leq 0,5 \times 10^9/L$
- evidenza radiologica di megacolon tossico o perforazione intestinale (ecografia o radiografia addominale (abdominal CT scan or X-ray))
- presenza di colostomia
- controindicazioni alla colonscopia
- qualsiasi condizione per la quale, secondo il medico, il trapianto di MFU metta a rischio la salute del paziente
- gravidanza
- storia di ipersensibilità al macrogol contenuto nelle preparazioni coloscopiche

DONATORI

Selezione del donatore

Numerose evidenze dimostrano come non ci sia differenza fra donatori consanguinei e donatori non consanguinei in termini di efficacia e sicurezza, almeno quando il MFU è utilizzato per trattare l'infezione da *C. difficile*.

Prima della donazione è necessario fornire adeguate informazioni al donatore e deve essere acquisito il consenso informato del donatore e il suo consenso al trattamento dei dati personali come previsto dalla normativa vigente sulla privacy.

Prima della donazione di MFU è necessario un accurato screening del soggetto per evitare la trasmissione di malattie ai pazienti. Esso consiste di tre procedure fondamentali:

1. Screening iniziale tramite questionario preliminare
2. Screening tramite esami bioumorali (siero e feci) dei soggetti risultati idonei al questionario
3. Valutazione finale tramite questionario e test molecolare rapido per i principali patogeni enterici sul campione fecale il giorno stesso della donazione

È fortemente consigliato lo screening del profilo di microbiota fecale e comparazione del profilo tra donatore e ricevente.

1. Screening iniziale tramite questionario preliminare

Il questionario preliminare deve investigare tre principali aspetti:

- a. storia nota o fattori di rischio per malattie infettive;
- b. storia di malattie gastrointestinali, metaboliche, neurologiche;
- c. utilizzo di farmaci/sostanze che possono alterare il microbiota intestinale.

1a) storia nota o fattori di rischio per malattie infettive

Storia nota o esposizione a HIV, HBV o HCV, sifilide, virus umano T-linfotropico I e II, malaria, tripanosomiasi, tubercolosi

- Infezione sistemica nota non controllata al momento della donazione
- Uso di droghe e/o sostanze illegali
- Comportamenti sessuali a rischio (rapporti/contatti sessuali occasionali/anonimi, comportamenti sessuali ad alto rischio con prostitute, tossicodipendenti, soggetti positivi per HIV, epatiti, sifilide; prostituzione; storia di malattia sessualmente trasmissibile)
- Soggetto sottoposto a trapianto di tessuti / organi
- Precedente (<12 mesi) trasfusione di sangue/emocomponenti o somministrazione di emoderivati
- Recente (<6 mesi) puntura accidentale con siringhe
- Recente (<6 mesi) esecuzione di tatuaggi, piercing, agopuntura
- Recente trattamento medico in condizioni di scarsa igiene (es. ospedali da campo, trattamenti medici in condizioni di fortuna, trattamenti medici non standardizzati)
- Rischio di trasmissione di malattie causate da prioni (Encefalopatie spongiformi trasmissibili) (Presenza di anamnesi familiare per TSE e altri fattori di rischio)
- Recenti (<6 mesi) infezioni batteriche, virali, fungine o parassitarie con implicazione gastrointestinale
- Recenti viaggi (<6 mesi) in paesi tropicali, paesi ad alto rischio di malattie trasmissibili o diarrea del viaggiatore
- Recente (<6 mesi) storia di vaccinazione con virus attenuato vivo, se c'è un rischio di trasmissione
- Lavoro come operatore sanitario

- Lavoro a contatto con animali (per escludere il rischio di trasmissione di infezioni zoonotiche)
- Lavoro nel trattamento di depurazione delle acque reflue e nel trattamento di rifiuti organici, es. compostaggio.

1b) Patologie gastrointestinali, metaboliche, neurologiche

Storia di sindrome dell'intestino irritabile, malattie infiammatorie croniche intestinali, stipsi cronica funzionale, morbo celiaco, altri disturbi gastro intestinali cronici

- Storia di malattie autoimmuni croniche e sistemiche con coinvolgimento gastrointestinale
- Storia o rischio elevato di cancro gastrointestinale (incluse poliposi)
- Comparsa recente di diarrea o ematochezia
- Storia di patologie neurologiche o psichiatriche
- Sovrappeso e obesità (indice di massa corporea > 25)

1c) Farmaci

- Recente (<3 mesi) di esposizione ad antibiotici, immunosoppressori, chemioterapici
- Terapia occasionale o continuativa con inibitori della pompa protonica effettuata nei 3 mesi precedenti

I soggetti risultati idonei al suddetto questionario dovranno eseguire un pannello di esami bioumorali su siero e feci. La maggioranza di tali esami è consigliata per ogni potenziale donatore, mentre alcuni esami sono consigliati per condizioni specifiche, a giudizio del medico.

2. Screening tramite esami bioumorali (siero e feci) dei soggetti risultati idonei al questionario

Gli esami bioumorali dovrebbero essere eseguiti al massimo 4 settimane prima della donazione.

2a) Esami generali

Sangue

Sierologia per agenti infettivi (tutti gli esami devono essere negativi):

- HAV IgM
- HBsAg
- anti-HBcAg (totale e IgM)
- HCV Ab
- HIV-1 e HIV-2 Ab/Ag
- HEV IgM
- *Treponema pallidum* Ab
- CMV Ab IgM
- EBV Ab IgM
- *Entamoeba histolytica* Ab

Altri parametri: Emocromo, VES, PCR, glicemia, albumina, creatinina, elettroliti, transaminasi, bilirubina, γ GT, fosfatasi alcalina.

Feci (tutti i risultati devono essere negativi):

Patogeni batterici

- *C. difficile* tossinogenico (test molecolare)
- *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* (test colturale o molecolare)
- *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* VT-produttore, enteroaggregativo, enteropatogeno, enterotossigeno, *Vibrio cholera* (test molecolare)
- *Listeria monocytogenes* (test colturale)
- *H. pylori* (antigene fecale)
- patogeni multi-antibiotico-resistenti (Enterococchi vancomicina-resistenti, *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente, Gram negativi multiresistenti (Enterobatteri resistenti ai carbapenemi o produttori di ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* resistente ai carbapenemi, *Acinetobacter* resistente ai carbapenemi)) (test colturale)

Patogeni virali

- Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, Astrovirus e Sapovirus (test molecolare)

Altri patogeni

- *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis* (test molecolare)
- Uova, cisti e forme vitali di parassiti intestinali (esame coproparassitologico micro e macroscopico, con inclusione di *Isospora*, Microsporidi ed elminti)

Sangue occulto fecale

2b) Esami da effettuare in presenza di fattori di rischio

Sangue

- Sierologia per HTLV I e II
- Sierologia per *Strongyloides stercoralis*
- Sierologia per *Toxocara canis*

Feci

- Calprotectina fecale

3. Valutazione finale tramite questionario e test molecolare rapido per i principali patogeni enterici sul campione fecale il giorno stesso della donazione

3a) Questionario

Un ulteriore questionario viene somministrato ai donatori il giorno stesso della donazione, per sincerarsi che non siano intervenuti, nell'intervallo fra l'acquisizione dei risultati e la donazione, eventi che potrebbero inficiare la procedura. È suggerito che tale questionario identifichi i seguenti punti:

- Comparsa di diarrea, nausea, vomito, dolore addominale, ittero, altri sintomi gastrointestinali
- Insorgenza di malattia, oppure, in generale, di febbre, mal di gola, linfadenopatie
- Uso di antibiotici o altri farmaci che possano alterare il microbiota intestinale (compresi gli inibitori di pompa protonica)
- Assunzione di sostanze potenzialmente nocive
- Nuovi partner sessuali, comportamenti sessuali ad alto rischio, viaggi all'estero (in particolare in ambienti tropicali), contatti con sangue umano
- Comparsa di diarrea tra le persone con cui si è frequentemente a contatto nel quotidiano

3b) Test molecolare rapido

Il giorno stesso della donazione deve essere inoltre eseguito il test molecolare rapido sul campione fecale per i principali patogeni enterici.

I soggetti che hanno superato tutte le fasi di valutazione e di controllo (compresi gli esami bioumorali eseguiti al massimo 4 settimane prima della donazione) possono essere arruolati come donatori.

Per donazioni successive, se non vi sono cambiamenti nella salute dei donatori e non sono intervenuti accadimenti specifici, gli esami sul sangue e sulle feci possono essere considerati validi fino a 8 settimane dopo la prima donazione.

Dopo tale periodo tutte le analisi previste per la prima donazione vanno ripetute. La ripetizione di alcune analisi sierologico-infettivologiche potrebbe non essere necessaria in dipendenza dei risultati ottenuti nelle precedenti analisi. In ogni caso il test molecolare rapido va ripetuto a ogni donazione.

Prima della donazione, è necessario fornire adeguate informazioni al donatore e deve essere acquisito il consenso informato del donatore e il consenso al trattamento dei dati personali come previsto dalla normativa vigente sulla privacy.

METODOLOGIA PROCEDURALE E VIA DI SOMMINISTRAZIONE

Prima del trattamento è necessario che il paziente sia informato adeguatamente sulle procedure e che fornisca il suo consenso.

Terapia antibiotica pre-FMT

I pazienti con rCDI devono essere trattati con vancomicina o fidaxomicina almeno per 3 giorni

prima della procedura di trapianto. Tali antibiotici devono essere interrotti 12-48 ore prima dell'infusione fecale. In caso di emergenza, e in caso di pronta disponibilità del materiale fecale, tale terapia antibiotica può essere evitata.

Preparazione intestinale dei riceventi

I riceventi sono preparati con lavaggio intestinale con polietilen glicole (PEG) prima della procedura di trapianto, quando essa viene effettuata sia tramite colonscopia sia tramite il tratto digerente superiore.

Vie di somministrazione

Il materiale fecale deve essere infuso tramite clistere o colonscopia, quest'ultima come via preferita di somministrazione. In caso di infusione tramite clistere, il paziente deve essere istruito a trattenere il materiale infuso per almeno 30 minuti e mantenere la posizione supina al fine di ridurre al minimo l'impulso alla defecazione.

La colonscopia è capace di esplorare l'intero colon, e può quindi valutare le caratteristiche della patologia meglio dei clisteri. Tale aspetto è rilevante in particolare per l'identificazione della colite pseudomembranosa, segno endoscopico di colite severa, la quale è un fattore prognostico negativo per la risoluzione dell'infezione dopo infusione singola, pertanto dovrebbe essere trattata con infusioni fecali multiple.

In caso di somministrazione tramite colonscopia, il materiale fecale dovrebbe essere infuso nel colon destro; in caso di colite severa, le feci possono essere infuse anche nel colon sinistro, per motivi di sicurezza.

In condizioni cliniche particolari, qualora non sia possibile utilizzare la suddetta via di somministrazione si può ricorrere alla somministrazione tramite il tratto digerente superiore. In tal caso, i pazienti devono essere tenuti in posizione verticale a 45° rispetto al piano del letto per 4 ore dopo l'infusione per prevenire l'aspirazione del materiale fecale.

In caso di condizioni critiche del paziente, l'utilizzo di clisteri dovrebbe essere preferito.

Il campione finale di MFU da somministrare al paziente deve consistere di almeno 30g di feci diluiti in soluzione salina sterile.

In caso di fallimento o di recidiva dopo infusione fecale, la procedura può essere ripetuta a giudizio del clinico.

FOLLOW-UP DEI PAZIENTI

Dai dati di letteratura, il FMT ha dimostrato di essere una procedura sicura, con un numero molto basso di effetti collaterali (e solitamente di lieve entità), anche nei pazienti immunocompromessi e nei pazienti critici. Gli eventi avversi a breve termine che accadono più comunemente dopo la procedura di trapianto di MFU sono: diarrea, dolori addominali, stipsi, febbre. Eventi avversi gravi, quali batteriemia, perforazione intestinale, morte, sono molto rari.

Il paziente deve essere seguito nell'immediato periodo post-trapianto per valutare l'insorgenza di

reazioni/eventi immediati. Successivamente il paziente deve essere seguito per almeno 8 settimane dopo la procedura di trapianto per valutare l'efficacia del trattamento e gli eventuali eventi avversi a breve termine.

Eventuali reazioni/eventi avversi gravi verificatisi nei pazienti devono essere segnalati al CNT da parte del centro FMT entro 48 ore.

Caso per caso deve essere valutata la frequenza dell'analisi del microbiota del paziente. Si ritiene utile una raccolta di campioni fecali a 7, 30 e 60 giorni dopo il trapianto per completare il follow-up clinico (diario sintomi, parametri di laboratorio), consentire la mappa (caratterizzazione) del microbiota intestinale del paziente e valutare l'attecchimento del microbiota donato.

PREPARAZIONE DEL MATERIALE FECALE

Il materiale fecale da utilizzare per il FMT deve provenire da donatori selezionati secondo quanto indicato nell'allegato 1.

Il tempo tra la donazione e il FMT non deve superare le 6 ore. È pertanto importante che le procedure di donazione, preparazione del MFU e FMT siano ben coordinate anche per consentire la definizione del profilo di microbiota del donatore e lo screening infettivologico sul donatore e sul materiale da infondere.

Le operazioni di preparazione del MFU dal ricevimento del materiale donato fino al rilascio del prodotto finale disponibile per il trapianto devono essere documentate. Il laboratorio che prepara il MFU deve accertarsi che il contenitore con il materiale donato abbia un'etichetta che riporti le seguenti informazioni: codice del donatore, data e ora della donazione, identificazione del paziente.

PREPARAZIONE DEL MATERIALE FECALE FRESCO

- Per la preparazione del MFU deve essere utilizzato uno spazio dedicato secondo quanto previsto dal Programma Nazionale sul Trapianto di Microbiota Fecale umano (FMT).
- Per proteggere i batteri anaerobi, il materiale deve essere lavorato il più velocemente possibile.
- Dal momento della raccolta al momento della preparazione, il materiale fecale può essere conservato a temperatura ambiente (20°C–30°C).
- Per ogni campione devono essere utilizzati un minimo di 30 g di feci diluiti in soluzione salina sterile. Un campione di 5 grammi ca. deve essere conservato a -80° per futuri esami.
- Il suddetto materiale fecale deve essere sospeso nella soluzione salina tramite agitatore o manualmente, e quindi filtrato attraverso garza sterile o analogo sistema di filtrazione (es. filtro di metallo sterilizzabile).
- Devono essere utilizzati strumenti e dispositivi sterili di qualità, convalidati o espressamente certificati, ove possibile, marcati CE.
- Durante la preparazione del campione, l'operatore deve indossare maschera facciale, guanti protettivi e camice come previsto. Le manipolazioni critiche devono essere effettuate sotto cappa a flusso laminare verticale.
- Il materiale di lavorazione incluse le sacche per confezionare il prodotto finale devono essere sterili.
- Il prodotto finale deve essere chiuso sigillato in un prima sacca munita di una etichetta che riporti le stesse informazioni del materiale pervenuto dalla donazione. A questi dati devono essere aggiunti la data e l'orario limite massimo per la somministrazione del prodotto e la temperatura di conservazione.
- Il trasporto del prodotto, collocato in una seconda sacca, deve avvenire in un contenitore esterno che possa evitare il danneggiamento della sacca e gli sbalzi termici.