



UNIVERSITÀ DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE
CICLO XXIX**

**UROLITIASI CALCICA IDIOPATICA E MICROBIOTA
INTESTINALE: QUALE RELAZIONE?
RISULTATI DI UNO STUDIO OSSERVAZIONALE
CONDOTTO CON TECNICHE METAGENOMICHE DI
ULTIMA GENERAZIONE**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. RICCARDO BONADONNA

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa TIZIANA MESCHI

Dottorando: Dr. ANDREA TICINESI

ANNI 2014-2017

INDICE

RIASSUNTO	5
INTRODUZIONE	8
Il microbiota intestinale nella ricerca biomedica	8
Fisiologia del microbiota intestinale dell’adulto	11
Il microbiota intestinale nelle patologie dell’adulto	18
Generalità sulla calcolosi renale	28
Calcolosi renale e microbiota	34
IPOTESI E OBIETTIVI DELLO STUDIO	43
DISEGNO E SETTING DELLO STUDIO	45
MATERIALI E METODI	46
Popolazione dello studio	46
Procedure cliniche	49
Analisi del microbiota fecale	51
Analisi statistiche	54
Aspetti etici	55
RISULTATI	56
Caratteristiche cliniche dei calcolotici e dei controlli	56
Composizione del microbiota fecale	57
DISCUSSIONE	62
CONCLUSIONI	67
TABELLE E FIGURE	68
BIBLIOGRAFIA	95

RIASSUNTO

Background – Negli ultimi anni specifiche alterazioni della composizione del microbiota intestinale umano sono state messe in relazione a numerose patologie, non solo del tratto gastroenterico. Tra queste si annovera anche la calcolosi renale calcica idiopatica. Alcuni studi, condotti con tecniche microbiologiche specie-specifiche, hanno suggerito che i soggetti con calcolosi calcica abbiano una minor rappresentazione intestinale di *Oxalobacter formigenes*, un batterio con spiccata capacità di degradazione dell'ossalato. Tuttavia, nessuno studio ha analizzato in modo approfondito, utilizzando tecniche non-colturali di ultima generazione, la composizione globale del microbiota fecale di soggetti calcolotici, anche alla luce del fatto che altri batteri, oltre ad *Oxalobacter*, potrebbero essere coinvolti nella degradazione dell'ossalato.

Obiettivo della tesi – L'obiettivo primario di questa tesi è quello di confrontare la composizione del microbiota fecale di un gruppo di soggetti con calcolosi calcica idiopatica e un gruppo di controlli non calcolotici, utilizzando tecniche metagenomiche di ultima generazione (16S rRNA microbial profiling e shotgun metagenomics).

Materiali e metodi – Sono stati arruolati 52 soggetti affetti da calcolosi calcica idiopatica recidivante (31 M, 21 F, età 48 ± 11) e 48 controlli non calcolotici (28 M, 20 F, età 47 ± 13). Ogni soggetto è stato sottoposto a valutazione clinico-anamnestica, profilo di rischio litogeno urinario su urine delle 24 ore (18 parametri urinari, tra cui calciuria e ossaluria) e valutazione delle abitudini alimentari mediante questionario food-frequency EPIC. Inoltre, ogni partecipante ha fornito un campione di feci che è stato successivamente analizzato mediante 16S rRNA microbial profiling per la determinazione di biodiversità e variabilità inter-individuale, identificazione tassonomica dei batteri presenti a livello di genere e, quando possibile, di specie, e determinazione della loro abbondanza relativa. Su 10 campioni fecali selezionati casualmente (5 calcolotici e 5 controlli) è stata poi effettuata un'analisi di deep shotgun metagenomics sequencing, per verificare l'espressione nel microbiota fecale delle principali classi di geni batterici, con un particolare focus

sui geni codificanti per enzimi degradanti l'ossalato. I parametri clinici, laboratoristici urinari, nutrizionali e microbiologici (alfa-diversità, abbondanza relativa di singoli taxa, espressione di geni o gruppi di geni batterici) sono stati confrontati tra calcolotici e controlli con i test di Mann-Whitney, covarianza ed analisi della varianza. Le variabili cliniche, laboratoristiche urinarie e nutrizionali significativamente diverse tra calcolotici e controlli sono state considerate come fattori di confondimento nei modelli multivariati di analisi della varianza applicati ai parametri microbiologici. Infine, la correlazione tra parametri microbiologici e escrezione urinaria di ossalato è stata testata mediante il test di Pearson.

Risultati – Dal punto di vista clinico-laboratoristico e nutrizionale, i 52 calcolotici hanno mostrato avere una maggiore escrezione urinaria di calcio (262 ± 111 vs 169 ± 85 mg/24 h, $p < 0.001$) e ossalato (29 ± 11 vs 25 ± 8 mg/24 h, $p = 0.049$), un maggior volume urinario, una minore escrezione urinaria di fosfato e un minor intake dietetico di calcio rispetto ai 48 controlli. A livello del microbiota intestinale, i calcolotici hanno mostrato avere una minore biodiversità (numero di Operational Taxonomic Units 1460 ± 363 vs 1658 ± 297 , $p = 0.046$ corretta per età, sesso e parametri urinari e nutrizionali diversi tra i due gruppi), mentre la variabilità inter-individuale è risultata simile tra i due gruppi, senza evidenti cluster nella composizione del microbiota. I calcolotici hanno mostrato, rispetto ai controlli, una maggiore deplezione di numerosi taxa, tra cui *Klebsiella*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*. Tuttavia, ad un'analisi multivariata, tale deplezione è risultata indipendente dalle covariate solo per 6 taxa (*Actinomyces*, *Dorea*, *Enterobacter*, *Faecalibacterium*, *Howardella*, *Succinivibrio*). Viceversa, il microbiota dei calcolotici è risultato significativamente più ricco di *Bacteroides* e *Acidaminococcus*. L'abbondanza relativa di 13 taxa è risultata significativamente correlata all'escrezione urinaria di ossalato. Infine, l'analisi di deep shotgun metagenomics sequencing ha evidenziato come nei soggetti calcolotici, rispetto ai controlli, esista un'espressione significativamente inferiore, a livello del microbiota intestinale, di geni coinvolti nella degradazione dell'ossalato. L'espressione di questi geni, e l'abbondanza relativa dei

batteri che li esprimono, è risultata correlata in modo significativo con l'escrezione urinaria di ossalato.

Conclusioni – Rispetto ai controlli non calcolotici, i soggetti affetti da calcolosi calcica idiopatica sembrano presentare una maggiore disbiosi a livello del microbiota fecale, con minore espressione di batteri che esprimono geni coinvolti nella degradazione dell'ossalato, in modo indipendente da parametri metabolici urinari e nutrizionali. Il microbiota intestinale potrebbe quindi essere implicato nella fisiopatologia della calcolosi renale in modo più complesso rispetto alla semplice azione ossalato-degradante del solo *Oxalobacter formigenes*.

INTRODUZIONE

IL MICROBIOTA INTESTINALE NELLA RICERCA BIOMEDICA

Il microbioma intestinale umano è l'insieme dei microorganismi (in prevalenza batteri, ma anche virus, miceti, protozoi e Archaea) che fisiologicamente vivono in simbiosi con l'ospite a livello del tubo digerente [1]. Il termine microbioma viene spesso utilizzato in modo intercambiabile con microbiota, che invece, a livello puramente semantico, identifica l'insieme delle proteine sintetizzate da tali microorganismi [1].

Anche se esiste un crescente interesse verso lo studio dei miceti e dei virus simbiotici intestinali (i cosiddetti “micoma” e “viroma”), di fatto la maggior parte degli studi ha analizzato la componente batterica del microbioma intestinale. Pertanto, nel linguaggio scientifico comune, quando si parla di “microbiota” o “microbioma”, si intende sostanzialmente l'insieme dei batteri intestinali, che in passato venivano designati con i termini impropri di “flora microbica” o “flora batterica residente” [2].

Si tratta di una comunità microbica estremamente complessa, dalle caratteristiche ecologiche non ancora completamente studiate e comprese, che include un cospicuo numero di specie batteriche (almeno 1100, ma in alcuni studi si è ipotizzato che tale numero superi 2000) [3-4]. In termini assoluti, il microbiota intestinale di un uomo sano può contenere sino a 10^{14} batteri, con un patrimonio genetico che è circa 150 volte più grande, in termini numerici, rispetto a quello dell'organismo ospite [3-4]. Si è stimato che l'intero microbiota intestinale umano contribuisca al peso corporeo per una quota variabile da 175 g a 1,5 kg [5].

La concentrazione di batteri nel lume intestinale e la tipologia degli stessi varia a seconda del segmento del tubo digerente considerato. In generale, la densità batterica aumenta dai tratti prossimali (duodeno, intestino tenue) a quelli distali (cieco, colon, sigma). I batteri maggiormente

rappresentati sono gli anaerobi obbligati o facoltativi, specialmente a livello del colon. Si considera comunque che il microbiota fecale rappresenti una stima affidabile del microbiota effettivamente presente a livello del lume del tubo digerente, anche se recentemente sono state messe a punto tecniche per la determinazione, su campioni di biopsia intestinale, del microbiota associato alla mucosa (*mucosa-associated microbiota*) [6]. Queste tecniche hanno il grande vantaggio di esaminare il microbiota presente in uno specifico segmento dell'intestino e quindi di verificare le sue eventuali interazioni con la mucosa, ma richiedono evidentemente manovre invasive (gastroscopia, colonscopia operativa) per la raccolta del campione. Anche per questo motivo, la maggior parte degli studi sul microbiota intestinale umano è stata condotta su campioni fecali.

Poiché una percentuale variabile dal 60% all'80% di batteri intestinali non è coltivabile, la complessità e la diversità delle specie contenute nel microbiota intestinale umano sono state comprese in tempi solamente molto recenti, grazie all'avvento di tecniche di identificazione dei batteri indipendenti dai mezzi di coltura (*culture-independent*) e non specie-specifiche [7]. Le tecniche microbiologiche "classiche", applicate ancora al giorno d'oggi in tutti i laboratori di microbiologia clinica del mondo, hanno infatti il grande limite di essere parzialmente o totalmente specie-specifiche, per cui, in un campione biologico ad alta concentrazione microbica come può essere un campione di feci, riescono ad identificare solamente una singola specie, per la quale viene posto un quesito clinico, oppure un gruppo di *taxa* batterici che condividono determinate caratteristiche biochimiche e metaboliche [7].

Le tecniche microbiologiche *culture-independent*, sviluppate nel corso dell'ultima decade, permettono invece di identificare virtualmente tutte le specie batteriche presenti all'interno di un ecosistema complesso, grazie al sequenziamento *high-throughput* del DNA batterico, all'identificazione dei polimorfismi genetici di alcuni geni comuni a tutti i procarioti e al successivo confronto con database genomici per l'identificazione tassonomica [8-9]. Queste tecniche, complessivamente definite "metagenomiche", sono basate in particolare sull'identificazione dei polimorfismi del gene batterico che codifica per il 16S rRNA (*16S rRNA microbial profiling*). Sulla

base del grado di omologia del gene sequenziato con sequenze geniche note è quindi possibile, con analisi bioinformatiche, assegnare ogni unità tassonomica (*operational taxonomic unit*, OTU) identificata dall'analisi metagenomica, ad un determinato *taxa* o, in caso di mancata corrispondenza, a un livello tassonomico superiore [8-9]. Esse garantiscono quindi considerevoli vantaggi nello studio del microbiota umano [9]:

1. permettono l'identificazione contemporanea di un grande numero di *taxa* che consente di cogliere la complessità e la diversità del microbiota intestinale umano meglio di qualsiasi altra tecnica attualmente conosciuta;
2. permettono di identificare anche specie batteriche normalmente non coltivabili o difficilmente coltivabili, superando quindi molti limiti delle tecniche microbiologiche classiche;
3. permettono di identificare nel microbiota umano *taxa* batterici precedentemente sconosciuti e di assegnarli tassonomicamente ad un ordine o famiglia con un elevato grado di precisione;
4. consentono di stimare l'abbondanza relativa dei singoli *taxa*, fornendo informazioni quantitative molto importanti per comprendere la struttura del microbiota.

Queste tecniche hanno quindi consentito di chiarire una lunga serie di aspetti, precedentemente sconosciuti, sulla fisiologia del microbiota intestinale umano, sulle sue interazioni con la mucosa dell'apparato digerente e con gli altri organi, sulle sue alterazioni in corso di patologie acute o croniche, sul suo possibile ruolo nell'eziopatogenesi di una lunga serie di patologie, non solo gastrointestinali [10-11]. Inoltre, si sono iniziate a sviluppare tecniche di “nuova generazione” per la manipolazione del microbiota intestinale umano [12-13], con lo scopo di verificare gli effetti sullo sviluppo e l'andamento di alcune patologie, raggiungendo in alcuni casi, come l'enterocolite da *Clostridium difficile*, risultati estremamente significativi dal punto di vista biologico e clinico [14].

Lo studio del microbiota intestinale umano rappresenta quindi una “frontiera” della ricerca biomedica traslazionale e un argomento di grande attualità nella comunità scientifica internazionale. Al 14/11/2016, sulla banca dati internazionale PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) erano presenti 6843 pubblicazioni scientifiche, tra cui 2668 review, identificate attraverso la chiave di ricerca “human gut microbiota”. Di queste pubblicazioni, solo 266 (3.8%) erano antecedenti all’anno 2008 e ben 1743 (25.5%) risalivano al solo anno 2015.

Nonostante questo, esistono ancora numerose aree di incertezza e la comprensione del ruolo del microbiota intestinale nella patologia umana è ancora molto lontano dall’essere sufficiente per incidere in modo significativo sulla pratica clinica, con probabilmente l’unica eccezione dell’enterocolite da *Clostridium difficile* [13]. In particolare, esistono ancora diverse incertezze sulla definizione del microbiota “normale” e nella conseguente interpretazione clinica di un certo profilo microbico intestinale. Inoltre, per molte patologie croniche, tra cui la calcolosi renale, il coinvolgimento del microbiota nella fisiopatologia e nell’eziopatogenesi non è ancora completamente chiaro, nonostante esso sia pienamente ipotizzabile alla luce delle esistenti evidenze.

FISIOLOGIA DEL MICROBIOTA INTESTINALE NELL’ADULTO

La prime conoscenze approfondite sulle caratteristiche e sulla composizione del microbiota intestinale umano normale sono state acquisite grazie allo *Human Microbiome Project*, uno studio di popolazione in cui è stata determinata la composizione del microbiota fecale di 242 adulti sani di età compresa tra 18 e 40 anni [14]. Questo studio ha permesso di chiarire che nel microbiota intestinale umano sono generalmente rappresentati 10 *phyla*, anche se la gran parte dei batteri identificati appartengono a due di essi: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Generalmente esiste una relazione inversa tra l’abbondanza relativa dei batteri appartenenti all’uno o all’altro *phylum*, per cui

i soggetti che hanno un microbiota ricco di *Firmicutes* hanno una rappresentazione ridotta di *Bacteroidetes* e viceversa [14]. Questo progetto ha inoltre permesso di chiarire altri concetti molto importanti nella fisiologia del microbiota dell'adulto [14]:

- anche se, nella complessità della popolazione microbica, esiste un'elevata variabilità inter-individuale, i *taxa* maggiormente rappresentati nei campioni fecali della popolazione sana sono un numero relativamente piccolo e costituiscono il cosiddetto “*core microbiota*”;
- esiste un numero molto elevato di *taxa*, la cui presenza è incostante nei vari individui, che, anche se poco rappresentati in termini assoluti (“*minor players*”), potrebbero svolgere ruoli metabolici e fisiopatologici importanti;
- la composizione del microbiota di ogni singolo individuo rimane stabile nel tempo.

Analizzando la composizione del microbiota fecale di 39 adulti sani, Arumugam e colleghi hanno in seguito confermato la presenza di un'elevata variabilità inter-individuale, identificando tuttavia la presenza di alcuni “enterotipi” che si caratterizzano per la presenza di un *core microbiota* molto simile tra i soggetti che ne fanno parte. In particolare, l'enterotipo 1 è ricco di *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides* spp., l'enterotipo 2 è caratterizzato da un'elevata abbondanza relativa di *Prevotella* spp. e *Desulfovibrio* spp., e l'enterotipo 3 è ricco di batteri con capacità di degradazione della mucina, come *Ruminococcus* spp. e *Akkermansia* spp. [15]. I fattori che condizionano la presenza dell'uno o dell'altro enterotipo rimangono per larga parte sconosciuti, in quanto le abitudini alimentari non sembrano avere un ruolo predominante se non per l'enterotipo 2, dove l'abbondanza di *Prevotella* spp. può essere correlata positivamente al consumo di fibre e negativamente al consumo di proteine animali [15].

La dieta e il luogo di residenza rimangono comunque due fattori importanti nel determinare la composizione del microbiota intestinale [16-17]. Yatsunenkov e colleghi [16] hanno mostrato significative differenze nella composizione del *core microbiota* tra due gruppi di soggetti, uno residente nel Malawi e l'altro negli Stati Uniti d'America, ipotizzando la presenza di fattori

ambientali (dieta, metodi di conservazione del cibo, esposizione agli animali, igiene domestica) alla base di queste differenze.

Una dieta ricca di proteine animali può aumentare l'abbondanza relativa di batteri che tollerano l'esposizione ad elevate concentrazioni di acidi biliari (*Bacteroides*, *Alistipes*, *Bilophila*) e diminuire l'abbondanza relativa di batteri del *phylum Firmicutes* che metabolizzano i polisaccaridi dei vegetali (*Roseburia*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*) [17]. Una dieta prevalentemente vegetariana o vegana si associa invece a una maggiore abbondanza del genere *Prevotella*, che dipende in modo statisticamente significativo dall'introito di fibre [17]. Inoltre, una dieta ad elevato contenuto di proteine animali si associa generalmente a una ridotta complessità del microbiota intestinale, e quindi a una ridotta diversità microbica [18]. Infine, Wu e colleghi hanno dimostrato che gli enterotipi, o quantomeno la presenza di un enterotipo *Bacteroides* rispetto a un enterotipo *Prevotella*, sono significativamente correlati alle abitudini alimentari sul lungo periodo e non all'introito di nutrienti nei giorni o settimane che precedono l'analisi del microbiota [19]. Questi risultati in parte smentiscono l'iniziale conclusione di Arumugam e colleghi secondo cui la dieta influenza solo marginalmente il *core microbiota* e gli enterotipi [15].

Altri studi hanno analizzato il rapporto tra dieta e microbiota intestinale umano concentrandosi soltanto su specifici composti o nutrienti, senza raggiungere evidenze conclusive [20]. Per esempio, una dieta ricca di cere non digeribili si associa a un incremento nell'abbondanza relativa di batteri capaci di degradare tali composti, come *Eubacterium rectale* e *Oscillobacter* spp. [21]. Un elevato consumo alimentare di inulina, una fibra presente in alcune verdure, e di frutto-oligosaccaridi si associa all'incremento dei batteri del genere *Bifidobacterium* [22-23], mentre una dieta ricca di acidi grassi polinsaturi è associata a un incremento dell'abbondanza relativa di *Eubacterium rectale* e *Clostridium coccooides* [24]. Si tratta di modificazioni generalmente di scarso rilievo in termini quantitativi assoluti, che riguardano prevalentemente dei “*minor players*” nel microbiota, ma che potrebbero assumere una grande importanza dal punto di vista metabolico e funzionale [20].

Infatti, un microbiota intestinale caratterizzato da un'elevata diversità (“*species richness*”) è generalmente considerato un marker di buona salute e si associa a una minore adiposità corporea, a una maggiore tendenza al mantenimento del peso corporeo nel tempo e a un migliore profilo metabolico con ridotta insulino-resistenza [25]. Nei soggetti in sovrappeso infatti è spesso possibile riscontrare una riduzione della diversità microbica rispetto ai soggetti normopeso, probabilmente per diverse abitudini alimentari e diversi stili di vita [25].

Tra gli altri fattori riconducibili allo stile di vita, anche l'esercizio fisico sembrerebbe essere un determinante della composizione del microbiota intestinale nell'adulto sano. Clarke e colleghi hanno dimostrato che la pratica sportiva agonistica si associa, a parità di BMI e di introito calorico con la dieta, a una maggiore diversità microbica intestinale rispetto a uno stile di vita sedentario [18]. Inoltre, il picco di consumo di ossigeno sotto sforzo, indice di fitness cardiorespiratorio, è stato correlato alla diversità microbica del microbiota intestinale in un gruppo di giovani adulti canadesi [26]. Risultati simili sono stati ottenuti anche su studi condotti sul modello animale [27-29], consentendo di ipotizzare che almeno una parte dei benefici dell'esercizio fisico per lo stato di salute siano mediati dall'induzione di un maggiore grado di diversità microbica a livello intestinale [30].

Anche gli eventi dell'età infantile, e in particolare il tipo di parto e di allattamento e l'età del svezzamento, possono avere riflessi significativi sulla composizione del microbiota dell'adulto. Infatti, alla nascita si ritiene che il microbiota intestinale sia sostanzialmente assente oppure caratterizzato da un'estrema semplicità con bassa carica batterica. L'intestino si contamina quindi con la flora microbica presente nel canale del parto (per i nati da parto eutocico) o con quella presente sulla cute materna (per i nati da parto cesareo). Pertanto, nel neonato il microbiota intestinale è dominato da *Lactobacillus* spp. se il parto è stato eutocico oppure da *Staphylococcus* spp. se il parto è stato cesareo [31]. Con l'allattamento, parte del microbiota presente sulla cute del seno della madre e del microbiota del latte materno viene trasmesso all'infante, contribuendo ad aumentare la complessità microbica intestinale [32]. Con il svezzamento, si assiste quindi a un

notevole aumento della diversità microbica, con progressiva riduzione di *taxa* come *Lactobacillus* e *Staphylococcus* e incremento di quei *taxa* che costituiscono il *core microbiota* dell'adulto, come *Bacteroides* e *Prevotella* [33]. All'età di 3 anni circa il microbiota raggiunge quindi una composizione che, dal punto di vista sia quantitativo che qualitativo, è molto simile a quella dell'adulto [16]. Tuttavia, eventi particolari che intercorrono nell'età infantile, come malattie e/o esposizione a farmaci tra cui gli antibiotici, possono indurre modificazioni significative nel microbiota intestinale in fase di sviluppo, che si mantengono nel tempo anche nell'età adolescenziale ed adulta [34]. Allo stesso modo, anche la prematurità può comportare alterazioni nello sviluppo del microbiota che si mantengono nella successiva vita adulta [34].

La tipologia di ambiente di vita nell'infanzia ha inoltre un ruolo importante nel plasmare il microbiota intestinale. La presenza di fratelli o sorelle [35] e di animali domestici [36] è infatti capace di influenzare le popolazioni microbiche presenti nel microbiota dei bambini. E' stato anche dimostrato che le persone che convivono nello stesso ambiente domestico, indipendentemente dall'età, e addirittura i loro animali, condividono alcune caratteristiche comuni nel proprio microbiota [37].

E' stato inoltre ipotizzato che fattori genetici dell'ospite possano influenzare la tipologia di microbiota intestinale durante le fasi dello sviluppo. Lo studio di Yatsunenkov e colleghi [16] sembra smentire questa ipotesi, poiché ha riscontrato differenze significative nella composizione del microbiota intestinale di gemelli mono- e dizigotici di diversa provenienza geografica. Bonder e colleghi [38] hanno invece recentemente dimostrato attraverso una *genome-wide analysis*, condotta su 1514 adulti sani, che alcuni *loci* dell'ospite sono correlati all'abbondanza relativa di alcuni *taxa* intestinali come *Bifidobacterium*. Tali *loci* sono correlati alla funzione del sistema immunitario e ad alcuni recettori o molecole di adesione espressi dall'epitelio intestinale.

Due caratteristiche fondamentali del microbiota intestinale dell'adulto sano sono la stabilità nel tempo e la resilienza. E' infatti noto che, se non intervengono fattori perturbativi, la composizione del microbiota si può stimare come costante dall'età adolescenziale sino all'età di 60-65 anni [39].

Si instaurano infatti equilibri molto complessi nell'abbondanza relativa dei singoli componenti del microbiota, che dipendono dalla disponibilità dei substrati metabolici, dalle abitudini alimentari, dalla funzione della mucosa intestinale e dall'attività del sistema immunitario locale [11]. In questi equilibri, alcuni *taxa* si espandono andando a costituire il *core microbiota*, mentre altri rimangono confinati in alcune nicchie ecologiche, per cui presentano un'abbondanza relativa minore (*minor players*). Questi equilibri sono in una certa misura prevedibili attraverso complessi modelli matematici che si rifanno alla legge degli equilibri di Nash [40].

Quando interviene un fattore perturbativo dell'equilibrio, come una patologia acuta, un'infezione, una terapia antibiotica, un repentino cambio di dieta e di abitudini di vita, l'equilibrio si modifica in virtù del nuovo fattore [41-42]. Per esempio, in uno studio condotto su 10 volontari sani, il rapido cambiamento di dieta (da iperproteica a vegetariana e viceversa) determina modificazioni significative nell'abbondanza relativa di alcuni *taxa*, che tuttavia si annullano, con un altrettanto rapido ritorno allo *steady state* nel momento in cui il fattore perturbativo (dieta restrittiva) viene meno [17]. Questo fenomeno, per cui la composizione globale del microbiota tende a ritornare spontaneamente all'equilibrio pre-esistente, viene denominato resilienza ed è una caratteristica fondamentale del microbiota intestinale dell'adulto sano [41-42].

In virtù di tale resilienza, l'età non è generalmente un fattore che influenza la composizione del microbiota intestinale nella fascia che va dai 10/15 ai 60/65 anni [39]. Nel soggetto anziano tuttavia avvengono alcune modificazioni fisiologiche che possono avere rilevanza biologica e clinica. Gran parte delle conoscenze attuali sul microbiota intestinale dell'anziano provengono dallo studio di Claesson e colleghi, pubblicato su *Nature* nel 2012 [43], che ha analizzato il microbiota intestinale di un gruppo di 178 anziani irlandesi, istituzionalizzati e non, seguiti nel tempo per 1 anno. In sostanza, questi autori hanno dimostrato che, al di sopra dei 65 anni d'età, aumenta la variabilità inter-individuale e si riduce la diversità microbica, e quindi il numero di specie presenti nel microbiota intestinale. Queste modificazioni, che potrebbero in parte derivare da modificazioni delle abitudini dietetiche, sono più marcate nei soggetti che esibiscono un minore grado di

autonomia funzionale, e in particolare nei soggetti che vivono in strutture sanitarie [43]. Il dato più interessante di questo studio è il fatto che la riduzione della diversità microbica e quindi le alterazioni nella composizione globale del microbiota non dipendono tanto dall'età anagrafica, quanto piuttosto dall'età "biologica" ovvero dalla performance funzionale del soggetto anziano e quindi, in ultima analisi, dalla fragilità [44] intesa come alterazione legata all'invecchiamento che precede la disabilità e quindi la dipendenza funzionale [45].

Ulteriori studi hanno evidenziato che nel soggetto anziano sano il *core microbiota* tende ad essere mantenuto sia a livello qualitativo che quantitativo; viceversa, nel soggetto anziano fragile o istituzionalizzato si verifica, indipendentemente dallo stato di malattia, una riduzione quantitativa dei batteri che costituiscono il *core microbiota* e un contemporaneo incremento di *taxa* come *Anerotruncus*, *Desulfovibrio* e *Coprobacillus*, che sono stati proposti come biomarker di fragilità e istituzionalizzazione [46]. Queste modificazioni, che avvengono lentamente nel tempo, si accompagnano ad un equilibrio più labile, che quindi è più sensibile ad eventuali fattori perturbativi e quindi, in ultima analisi, a una minore resilienza [47]. Similmente, in un gruppo di 728 donne anziane, l'indice di fragilità (*Frailty Index*) è risultato positivamente correlato all'abbondanza relativa di specie come *Eggerthella lenta* e *Eubacterium dolicum* e inversamente correlato a *Faecalibacterium prausnitzii* nel microbiota intestinale [47]. L'invecchiamento si traduce poi in una ridotta abbondanza relativa di una serie di batteri le cui attività metaboliche sono state definite come *health-promoting* [48] e quindi benefiche per la salute, tra cui i bifidobatteri [49]. Queste alterazioni possono riflettersi in un ridotto cross-talk tra il microbiota e la mucosa intestinale, con maggiore attivazione della risposta infiammatoria locale e sistemica e minore funzionalità delle cellule del sistema immunitario innato, con effetti negativi non solo sull'apparato digerente ma anche a livello sistemico [50].

Alcuni studi sul microbiota intestinale di centenari e supercentenari hanno evidenziato che l'estrema longevità, pur accompagnandosi a una riduzione della diversità microbica intestinale, è associata all'espansione della rappresentazione di *taxa* batterici con attività *health-promoting*, come

Eggerthella, *Anaerotruncus*, *Bilophila* e *Akkermansia*, e di *taxa* con attività ancora poco chiare, come *Oscillospira*, *Odoribacter* e *Butyricimonas*, a scapito di altri batteri con attività metaboliche benefiche come *Faecalibacterium prausnitzii* [51-53]. Questi risultati consentono quantomeno di ipotizzare un ruolo attivo del microbiota intestinale nei fenomeni di invecchiamento e nella promozione della longevità, anche attraverso la modulazione dell'inflammatione [51].

Una sintesi dei principali fattori coinvolti nella modulazione della composizione del microbiota intestinale nel soggetto adulto è riportata nella Tabella 1.

IL MICROBIOTA INTESTINALE NELLE PATOLOGIE DELL'ADULTO

La disbiosi, i fattori che la promuovono e le sue conseguenze

Accanto alla definizione del microbiota intestinale umano “normale” e dei fattori che possono condizionarne la composizione, la ricerca biomedica ha negli ultimi anni fatto un enorme sforzo per cercare di identificare eventuali “anomalie” della composizione del microbiota associate a diverse patologie acute e croniche, e di stabilire eventuali nessi di causa-effetto [10]. In alcuni casi si è effettivamente dimostrato un contributo clinicamente significativo del microbiota nella patogenesi e nell'andamento clinico di una patologia. Se da un lato questo è abbastanza intuitivo per le patologie che coinvolgono primitivamente l'intestino, come le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD, *Inflammatory Bowel Diseases*) e l'enterocolite da *Clostridium difficile*, dall'altro lo è sicuramente di meno per patologie che coinvolgono organi anatomicamente molto distanti dall'intestino. Tuttavia, questo ha permesso di ipotizzare e, in alcuni casi, di dimostrare la presenza di meccanismi metabolici, endocrini e sistemici tramite i quali il microbiota può, attraverso l'intestino, influenzare la fisiopatologia di tutto l'organismo [10-11].

Le alterazioni patologiche del microbiota intestinale umano possono essere generalizzate, quando riguardano l'equilibrio della popolazione microbica nel suo complesso, oppure limitate ad un solo o

a un gruppo ristretto di *minor players*, che, grazie ad attività metaboliche particolari o a un alto potenziale patogenico, possono da soli influenzare l'insorgenza di una malattia, sia in negativo (assenza di un batterio con attività protettiva) che in positivo (presenza di un batterio patogeno o con attività dannosa) [10-11]. Quando l'alterazione del microbiota intestinale è generalizzata, si parla in genere di *disbiosi*, intendendo con questo termine una generica variazione nella composizione globale della popolazione microbica, con aumento dell'abbondanza relativa di alcuni *taxa* e riduzione dell'abbondanza relativa di altri. La disbiosi si associa generalmente a un ridotto numero di specie microbiche presente nel microbioma e quindi a una minore complessità dello stesso [54-55]. Si tratta in ogni caso di un concetto che non è uniformemente condiviso da tutta la comunità scientifica, e le cui implicazioni cliniche sono ancora poco chiare. In sostanza, da un punto di vista medico, la disbiosi non rappresenta né una malattia né un sintomo, ma una condizione che si associa a determinate malattie o che può farne aumentare il rischio. Peraltro, i confini tra disbiosi e variabilità individuale normale nella composizione del microbiota sono ancora indefiniti, e quindi risulta a volte particolarmente difficile stabilire se un determinato profilo di microbiota è affetto da disbiosi oppure no [54-55].

La cause della disbiosi sono generalmente ignote. E' opinione comune nella comunità scientifica che gli stessi fattori che modulano il microbiota normale (Tabella 1) possano, in determinate condizioni, essere promotori o concause di una disbiosi [55].

Accanto a questi, esistono anche alcuni fattori patologici accertati (Tabella 1). L'esposizione agli antibiotici, sia diretta (terapie assunte dal soggetto) che indiretta (esposizione ad antibiotici che contaminano l'ambiente e i cibi), è sicuramente uno dei principali fattori che alterano l'equilibrio del microbiota sano e condizionano l'insorgenza della disbiosi [55]. Per esempio, Buffie e colleghi hanno dimostrato che l'assunzione di una singola dose di clindamicina può alterare significativamente la composizione del microbiota intestinale umano [56]. Questi risultati sono stati confermati da altri studi metagenomici, che hanno peraltro evidenziato come la disbiosi indotta da antibiotici abbia caratteristiche che dipendono strettamente dallo spettro di azione del farmaco o dei

farmaci assunti e come la sua durata nel tempo, anche dopo la sospensione della terapia antibiotica, sia direttamente proporzionale alla durata del ciclo di terapia stessa [57-59]. Al termine del trattamento antibiotico, in genere si osserva un ripristino dell'equilibrio preesistente, con tempistiche che tuttavia dipendono dalla durata dell'esposizione all'antibiotico [60]. Nei trattamenti di lunga durata le modificazioni indotte nell'equilibrio del microbiota potrebbero anche mantenersi nel tempo e diventare una caratteristica costante della composizione microbica [60]. L'esposizione agli antibiotici potrebbe essere alla base anche della ridotta diversità microbica che si osserva nei soggetti sani che provengono da paesi industrializzati rispetto a soggetti sani che vivono in zone rurali di paesi in via di sviluppo [61].

Gli effetti degli antibiotici sul microbiota umano e il loro ruolo causale nella disbiosi sono però ancora lontani dall'essere pienamente compresi [2]. Esistono alcuni antibiotici, tra cui la rifaximina, che sembrerebbero modificare la composizione del microbiota preservando quelle popolazioni microbiche che possiedono effetti benefici per l'organismo [62]. Questo effetto è stato definito "eubiotico" e può comportare dei vantaggi prevenendo l'insorgenza di una disbiosi [63]. In alcuni studi metagenomici condotti sull'uomo, l'esposizione a breve termine agli antibiotici (β -lattami, fluorochinoloni) non ha determinato alterazioni rilevanti nella composizione globale del microbiota, se non per alcune specie "bersaglio", e ha determinato un aumento "paradosso" del numero di specie presenti e della carica batterica complessiva [64-65].

D'altro canto, è stato recentemente dimostrato che, in soggetti anziani ospedalizzati, una popolazione già di per sé ad elevato rischio di disbiosi, l'esposizione ad antibiotici non si associa a significative alterazioni del profilo generale del microbiota, che risulta quindi simile a quello di anziani ospedalizzati non esposti ad antibiotici [66]. Infine, in alcuni studi condotti su modelli murini, l'esposizione agli antibiotici ha comportato soltanto alterazioni di secondo piano nella composizione globale del microbiota, lasciando invece relativamente costante il cosiddetto *core microbiota* [67].

Gli effetti di altri farmaci sul microbiota intestinale sono stati invece poco studiati. Tuttavia, è plausibile che molti di essi possano causare, o quantomeno contribuire all'insorgenza di una disbiosi [54]. I dati più solidi presenti in letteratura riguardano la chemioterapia antitumorale, che è un noto fattore causale della disbiosi, determinando un calo dell'abbondanza relativa dei *Firmicutes* e un incremento di batteri potenzialmente patogeni come *Enterococcus* spp. [68-69].

Infine, è plausibile che gli stessi fattori che causano malattie acute e croniche, come per esempio le alterazioni del sistema immunitario e l'infiammazione, agiscano come promotori delle alterazioni del microbiota intestinale e quindi della disbiosi [70]. Questi concetti sono stati dimostrati in particolare nella patogenesi delle IBD: le alterazioni geneticamente determinate o acquisite dell'epitelio intestinale, delle cellule di Paneth e delle cellule del sistema immunitario enterico, attivando l'infiammazione locale e sistemica e favorendo l'adesione di alcuni *taxa* batterici alla mucosa, possono selezionare alcune popolazioni microbiche a discapito di altre e quindi promuovere la disbiosi [71-72]. Allo stesso modo la disbiosi può contribuire ad attivare ulteriormente la risposta infiammatoria locale, instaurando un circolo vizioso per cui la disbiosi risulta essere sia causa che conseguenza del processo patologico in corso [70].

Qualunque ne sia la causa, la disbiosi comporta generalmente la riduzione dell'abbondanza relativa di uno o più *taxa* batterici. Questo fenomeno generalmente rende disponibili alcune sostanze nutritive e "libera" una o più nicchie ecologiche, che vengono occupate da *taxa* batterici normalmente poco rappresentati nel microbiota, che quindi vanno incontro ad un'espansione. Questo fenomeno è noto con il nome di *blooming* [73].

Esso si accompagna a modifiche nella concentrazione e nella tipologia delle sostanze prodotte e metabolizzate dal microbiota, le quali influenzano sia la composizione del microbiota stesso che il metabolismo dell'ospite [74-76]. Infatti, se da un lato alcuni prodotti del metabolismo microbico durante la disbiosi antibiotico-indotta possono facilitare l'espansione dei batteri patogeni opportunisti [74], dall'altro un microbiota intestinale con ridotta complessità può favorire, fra

l'altro, la produzione in loco, e quindi l'assorbimento, di acidi grassi a catena corta che influenzano una maggiore insulino-resistenza e uno stato pro-infiammatorio [75].

Il microbiota quindi esercita un'azione sistemica attraverso dei mediatori metabolici che vengono rilasciati direttamente dai batteri oppure attraverso il metabolismo batterico di sostanze introdotte con la dieta [76]. Tra i mediatori intrinsecamente prodotti dai batteri del microbiota, hanno grande rilevanza il lipopolisaccaride (LPS) e il peptidoglicano, che, assorbiti in piccole quantità con i chilomicroni, sono capaci di promuovere l'infiammazione cronica, l'insulino-resistenza e quindi la tendenza all'obesità [77], e l'indolo-3-aldeide che, prodotto generalmente dai *Lactobacilli*, può modulare l'infiammazione attraverso la promozione della sintesi della citochina anti-infiammatoria IL-22 [78].

Tra i mediatori prodotti dall'interazione microbiota-dieta rivestono grande importanza gli acidi grassi a catena corta, come butirrato, propionato ed acetato, che, oltre alle azioni metaboliche sopra menzionate [75], potrebbero anche influenzare effetti benefici a livello cerebrale, come un aumento della sintesi del neurotrasmettitore serotonina [79]. Similmente, alcuni acidi biliari metabolizzati da specifici componenti del microbiota potrebbero influenzare il metabolismo epatico attraverso l'attivazione del recettore farnesoide X [80].

Accanto a questi, sono stati ipotizzati numerosi altri possibili mediatori del rapporto tra microbiota intestinale e patologia umana, per i quali il livello di evidenza scientifica è tuttavia più basso [76].

Il microbiota intestinale può quindi influenzare la patologia umana a diversi livelli e le sue alterazioni possono essere sia causa che conseguenza di uno stato di malattia. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno cercato di identificare le principali anomalie del microbiota intestinale associate ad una lunga serie di malattie umane, acute e croniche, e di chiarire in che modo tali anomalie possano essere legate alla patogenesi delle malattie stesse. Di seguito si riporta un overview sintetico, lungi dall'essere esaustivo, sui principali risultati di tali studi [10]. Una sintesi è riportata anche in Tabella 2.

Rassegna delle alterazioni del microbiota associate alle principali malattie umane

Malattie infiammatorie croniche intestinali. Nelle IBD si osserva generalmente una riduzione dei *Firmicutes*, in particolare della specie con attività antinfiammatoria *Faecalibacterium prausnitzii*, e un incremento dell'abbondanza relativa dei *Bacteroidetes*, in particolare della specie *Bacteroides fragilis* [81-82]. Si osserva anche un incremento dei *Proteobacteria*, e in particolare un *blooming* delle *Enterobacteriaceae*, tra cui i patogeni opportunisti *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, che contribuiscono a sostenere l'infiammazione della mucosa e a incrementare il rischio di infezioni [83]. Complessivamente questo quadro determina una forte disbiosi, con riduzione della diversità microbica, del numero di batteri e della loro attività metabolica [84]. Tecniche di manipolazione del microbiota, come la somministrazione di probiotici e la *fecal microbiota transplantation* possono determinare conseguenze cliniche benefiche sull'andamento della malattia [85-86].

Malattia celiaca. Il microbiota fecale dei soggetti con malattia celiaca attiva si associa ad una maggiore diversità microbica rispetto al soggetto sano, con espansione dei *taxa Bacteroides*, *Prevotella*, *Clostridium* e *Staphylococcus* e un significativo calo di batteri con attività antinfiammatoria e di protezione della mucosa come *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. E' stato proposto che questa disbiosi possa avere un ruolo nella sensibilizzazione al glutine e nella successiva infiammazione [87].

Infezione da *Clostridium difficile*. La suscettibilità all'infezione da *Clostridium difficile* dipende generalmente da una disbiosi molto pronunciata, con riduzione del numero di specie del microbiota e della complessità microbica e profonde alterazioni nella composizione globale dello stesso [66,88-89]. Generalmente si assiste a una deplezione sia dei batteri che fanno parte del *core microbiota* che di *minor players* come batteri che producono acidi grassi a catena corta, clostridi non patogeni, *Alistipes* e *Bilophila*, che possono avere un ruolo centrale nell'impedire la colonizzazione dell'intestino da parte di *C. difficile* [66,88-89]. Queste alterazioni sono generalmente causate da terapie antibiotiche protratte e sono più pronunciate nel soggetto anziano con multimorbidità [66].

La *fecal microbiota transplatation*, contrastando l'estrema disbiosi intestinale associata all'infezione, è in grado di prevenire in modo clinicamente significativo le recidive [13].

Neoplasie intestinali. Alterazioni del microbiota intestinale potrebbero avere un ruolo di promozione della tumorigenesi a livello del colon [10]. Si tratterebbe comunque di modificazioni minori, confinate ad alcune specie con proprietà patogene e capacità di invadere localmente la mucosa intestinale, pur senza causare patologie infettive acute. Tra queste modificazioni, l'espansione di *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis* e *Streptococcus gallolyticus* potrebbe avere la maggiore rilevanza [90]. Alcuni prodotti metabolici del genere *Salmonella* sono peraltro in grado di attivare il *signaling* intracellulare della β -catenina che promuove la proliferazione epiteliale [91]. Inoltre, la deplezione di batteri produttori di acido butirrico [92] e l'interazione tra le variazioni di dieta e l'enterotipo *Prevotella* [93] potrebbero promuovere l'accumulo di metaboliti con potenziale oncogeno nel lume intestinale.

Epatopatie. La funzione epatica risente fortemente del metabolismo del microbiota intestinale e dei fenomeni di *endotossinemia*, ovvero di assorbimento del lipopolisaccaride prodotto dal microbiota da parte della mucosa intestinale [94-95]. Nella steatosi epatica non alcolica è stato dimostrato un certo grado di disbiosi, con ridotta rappresentazione di batteri produttori di butirrato, come *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerotruncus colihominis* e *Butyrivibrio crossotus*, e aumento della rappresentazione di batteri come *Ruminococcus*, *Campylobacter* e *Shigella*, alcuni dei quali producono il metabolita acetato, che è un substrato lipogenico [25]. Nell'epatopatia alcolica si osserva invece una profonda disbiosi, con deplezione dei *Bacteroidetes* e incremento delle *Enterobacteriaceae*, legata all'effetto dell'alcol sulla mucosa intestinale, con aumento della permeabilità e perturbazione della funzione immunitaria [94]. Simili alterazioni del microbiota intestinale avvengono anche nella cirrosi epatica non alcolica, dove si osserva anche una colonizzazione intestinale da parte dei batteri normalmente presenti nel microbiota della cavità orale [96]. Inoltre, nelle fasi di scompenso della cirrosi, la maggior parte delle complicanze (peritonite

batterica spontanea, encefalopatia epatica) sono legate al microbiota intestinale e all'alterazione della permeabilità della mucosa intestinale [94].

Diabete, obesità e sindrome metabolica. L'obesità è correlata a un incremento nell'abbondanza relativa dei *Firmicutes* e a una riduzione nell'abbondanza relativa dei *Bacteroidetes*, che è proporzionale al peso corporeo. La riduzione del peso corporeo si accompagna a modificazioni di segno opposto sul microbiota [97]. I batteri produttori di butirrato (*Faecalibacterium*, *Anaerotruncus*, *Butyrivibrio*) e *Akkermansia muciniphila* hanno effetti positivi sull'insulino-sensibilità e una loro elevata rappresentazione nel microbiota è associata a un ridotto rischio di diabete mellito tipo 2 e di obesità [98-99]. Il trattamento con il farmaco ipoglicemizzante orale metformina esercita, almeno in parte, la propria funzione metabolica modulando il microbiota intestinale e favorendo un aumento della rappresentazione di questi *taxa* [99]. Infine, nei soggetti obesi, un'aumentata diversità microbica, e in particolare la rappresentazione di *Akkermansia muciniphila*, si associa a un migliore profilo metabolico con migliore controllo glicemico e insulino-sensibilità [10,100]. La disbiosi intestinale potrebbe quindi avere un ruolo fisiopatologico importante nella sindrome metabolica, mediato sia da alcuni metaboliti prodotti dal microbiota (butirrato, acetato), sia da prodotti batterici come il lipopolisaccaride che, con la sua attività pro-infiammatoria, può condizionare un aumento dell'insulino-resistenza [10].

Infezioni extraintestinali. E' generalmente accettato dalla comunità scientifica internazionale che la disbiosi intestinale possa essere causa di infezioni sistemiche, attraverso un aumento della rappresentazione delle specie patogene opportuniste, specialmente se concomita un'alterazione della barriera mucosa [101]. Inoltre, un aumento delle *Enterobacteriaceae* nel microbiota può rappresentare un importante fattore di rischio per le infezioni delle vie urinarie, specialmente nella donna [102]. Tuttavia, pochissimi studi hanno verificato le alterazioni del microbiota intestinale associate alle infezioni [101]. La disbiosi che si osserva nella sepsi, con ridotta diversità microbica e aumento delle specie patogene, è generalmente ritenuta una conseguenza dell'infezione e della patologia acuta, e non una delle concause, anche se può contribuire all'insorgenza di complicanze

[103]. Tuttavia, studi su modelli animali hanno mostrato come la disbiosi potrebbe influenzare il rischio di infezioni sistemiche inducendo immunosoppressione e favorendo quindi la traslocazione dei batteri patogeni dal lume intestinale al circolo [104]. In ogni caso, alcune delle alterazioni del microbiota che si osservano in corso di infezione sistemica potrebbero essere legate allo stato infiammatorio acuto di per sé, che limita la disponibilità di alcune sostanze nutrienti per i batteri [105].

Malattie autoimmuni e allergiche. La disbiosi intestinale potrebbe giocare un ruolo importante nella perdita della tolleranza immunitaria e quindi nella patogenesi delle malattie autoimmuni sistemiche. In effetti un certo grado di disbiosi è stato riscontrato nei campioni fecali di soggetti affetti da artrite reumatoide e lupus eritematoso sistemico [106]. In particolare, nei pazienti con lupus eritematoso sistemico si osserva una minore rappresentazione di *Firmicutes* e un aumento di *Bacteroidetes* rispetto ai soggetti sani. Queste alterazioni si associano a una sovrarappresentazione di geni batterici correlati al metabolismo dei glucani e alla fosforilazione ossidativa, la cui funzione potrebbe influenzare l'autoimmunità e l'infiammazione [107]. Anche in alcune patologie allergiche una minore rappresentazione fecale di batteri del genere *Clostridium* potrebbe giocare un ruolo fisiopatologico importante [108].

Malattie respiratorie. Nel bambino, una ridotta diversità del microbiota intestinale si associa ad un aumento del rischio di asma atopico. Similmente, anche nell'adulto una ridotta rappresentazione nel microbiota intestinale di batteri che producono acidi grassi a catena corta (tra cui i già citati *Faecalibacterium* e *Anaerotruncus*) può associarsi a un aumento del rischio di asma influenzando la tipologia e intensità delle risposte immunitarie sistemiche. Il microbiota intestinale può anche competere per la disponibilità di nutrienti con il microbiota delle vie aeree, e in questo modo influenzarne la composizione e quindi le risposte immunitarie locali della mucosa respiratoria. E' possibile che il microbiota intestinale influenzi anche la suscettibilità alle polmoniti da stafilococco e enterobatteri e alla tubercolosi, ma nessuno studio ha mai verificato queste ipotesi sull'uomo sinora [109].

Malattie muscolari. E' stato ipotizzato che il microbiota intestinale possa esercitare un ruolo nella fisiopatologia della sarcopenia nell'anziano [110]. In particolare, un'aumentata diversità microbica, modulando l'infiammazione sistemica, potrebbe esercitare un effetto anticatabolico e quindi di prevenzione della deplezione di massa muscolare. Allo stesso modo, la produzione di acidi grassi a catena corta da parte del microbiota intestinale sano e la ridotta produzione di lipopolisaccaride potrebbero favorire l'insulino-sensibilità e quindi la salute del muscolo scheletrico. Questo "asse intestino-muscolo" è stato tuttavia solamente ipotizzato e deve ancora essere pienamente studiato nell'anziano sano e sarcopenico [110].

Malattie nervose e psichiatriche. Recenti studi metagenomici hanno dimostrato che i soggetti affetti da malattia di Parkinson presentano disbiosi intestinale [111], con minore rappresentazione delle *Prevotellaceae* e maggiore rappresentazione delle *Lactobacillaceae* rispetto ai controlli sani [112]. Inoltre, i soggetti con fenotipo tremorigeno della malattia di Parkinson hanno minore rappresentazione delle *Enterobacteriaceae* nel microbiota rispetto ai soggetti con fenotipo rigido [113]. Recentemente è stato dimostrato che i soggetti affetti da sclerosi multipla hanno un profilo di microbiota intestinale significativamente diverso rispetto ai soggetti sani, con maggiore rappresentazione di *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Dorea* e *Blautia* e minore rappresentazione di *Parabacteroides*, *Adlerkreutzia* e *Prevotella*, con possibili effetti pro-infiammatori sistemici [114]. Infine, vi sono dati anche riguardo al disturbo depressivo maggiore, secondo i quali il microbiota intestinale dei pazienti clusterizza in modo significativamente diverso rispetto a quello dei controlli sani, con minor rappresentazione di *Bacteroidetes* e espansione degli *Actinobacteria* [115]. Il trapianto di microbiota fecale dai soggetti umani affetti da depressione maggiore a modelli murini è in grado di indurre nel topo comportamenti coerenti con uno stato depressivo [115]. Tutte queste evidenze hanno permesso di ipotizzare la presenza di un "gut-brain axis" che, attraverso l'assorbimento intestinale di lipopolisaccaride batterico, acidi grassi a catena breve e altre sostanze sconosciute, influenzerebbe i fenomeni di neuroinfiammazione e l'equilibrio nella produzione di neurotrasmettitori come la serotonina e la dopamina [111].

Insufficienza renale cronica. Nelle fasi avanzate, l'insufficienza renale cronica si associa ad una profonda disbiosi intestinale, con espansione significativa di quei *taxa* che si comportano da patobionti, in particolare le *Enterobacteriaceae* [116]. Queste modificazioni vengono generalmente interpretate come una conseguenza delle alterazioni emodinamiche (ischemia intestinale cronica) e metaboliche (acidosi, ritenzione di tossine) dell'uremia [117]. Esse possono tuttavia influenzare il decorso clinico della malattia, favorendo la traslocazione batterica e l'assorbimento in circolo di prodotti pro-infiammatori e quindi promuovendo la progressione dell'insufficienza renale e l'insorgenza di complicanze vascolari e infettive [117]. Recenti studi hanno inoltre permesso di ipotizzare che il microbiota intestinale abbia una funzione di regolatore della funzione renale anche in una situazione normale, e non solo nell'ambito di una nefropatia cronica avanzata. Infatti, gli acidi grassi a catena breve prodotti dal microbiota (acetato, propionato, butirrato) potrebbero attivare vie metaboliche cellulari coinvolte nella regolazione della pressione arteriosa e dell'emodinamica intrarenale. In quest'ottica, i *taxa* batterici che li producono, tra cui i già citati *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerotruncus* spp e *Butyrivibrio* spp, potrebbero avere un ruolo nefroprotettivo, andando a costituire un vero e proprio “*gut-kidney axis*” [118].

GENERALITA' SULLA CALCOLOSI RENALE

La calcolosi renale (o urolitiasi o nefrolitiasi) è una patologia cronica ad alta prevalenza nella popolazione generale, caratterizzata da un'elevata tendenza alla recidiva. Ne è affetto circa l'11% della popolazione maschile e il 6% della popolazione femminile occidentale. I gruppi etnici maggiormente colpiti sono i Caucasici, gli Ispanici e gli Arabi, mentre la prevalenza tra gli Africani e gli Asiatici è generalmente inferiore. Il picco di incidenza si ha tra i 25 e i 40 anni d'età oppure dopo i 50-55 anni, con un trend in aumento più marcato nel genere femminile [119-120]. Una

recente survey italiana condotta in Toscana ha stimato una prevalenza dell'8,5% nei maschi e del 6,6% nelle femmine, con il picco massimo di incidenza a 55 anni [121].

I calcoli sono più frequentemente (80% dei casi) di composizione calcica (calcio ossalato o calcio fosfato); meno frequentemente di composizione uratica (acido urico) o mista (acido urico + calcio ossalato/fosfato <80%). Esistono anche forme più rare legate a patologie genetiche (cistina, xantina) oppure a infezioni delle vie urinarie da germi ureasi-produttori (struvite) [120]. Le varie tipologie di calcolosi renale e le loro relative frequenze nella popolazione italiana sono elencate in Tabella 3. Solo in una minoranza (circa il 10%) dei casi di calcolosi calcica è possibile identificare un'anomalia anatomica o metabolica predisponente la formazione dei calcoli. Queste condizioni, recentemente indicate da una Consensus Conference [122], configurano la cosiddetta *calcolosi calcica secondaria* e includono le malattie infiammatorie croniche intestinali, gli esiti di chirurgia bariatrica, l'iperparatiroidismo primitivo, la sindrome del giunto pieloureterale e la spina bifida, soltanto per citare le più frequenti. Tutte le altre forme di calcolosi calcica (circa il 70% del totale dei casi di nefrolitiasi) configurano la cosiddetta *calcolosi calcica idiopatica*, nella quale non è chiaramente identificabile una patologia predisponente la formazione dei calcoli [122]. I calcoli di calcio ossalato sono presenti nell'80% circa dei pazienti con calcolosi calcica idiopatica, mentre la restante parte dei pazienti forma calcoli di calcio fosfato. Questi ultimi, poiché i cristalli di calcio fosfato hanno un optimum per la precipitazione a un pH urinario >6.5, sono tipici dei soggetti con infezioni urinarie da germi ureasi-produttori oppure con dieta particolarmente alcalina [119].

La patogenesi dei calcoli calcici è molto complessa. Essa implica la precipitazione urinaria di cristalli di calcio ossalato e/o calcio fosfato in seguito a un meccanismo di sovrasaturazione. Successivamente, i cristalli si aggregano, mediante fenomeni di nucleazione, attorno a una matrice proteica costituita da proteine secrete dalle cellule uroteliali (tra cui la proteina di Tamm-Horsfall) o da proteine prodotte da batteri in caso di concomitante infezione [123]. Nel processo di nucleazione sembrerebbe centrale anche la deposizione di cristalli, prevalentemente di idrossiapatite, a livello dell'interstizio papillare renale, nelle cosiddette placche di Randall. Questi depositi potrebbero

essere la base per la successiva apposizione di cristalli di calcio ossalato a livello delle papille renali, con conseguente crescita del calcolo [123].

Questi fenomeni fisiopatologici sono condizionati da un complesso equilibrio di fattori urinari (volume, pH, escrezione di sostanze prolitogene ed antilitogene) che risente di fattori sia genetici che ambientali, tra cui assume un ruolo preponderante la dieta [122]. A livello urinario, i principali fattori pro-litogeni sono l'insufficiente idratazione, l'ipercalciuria, l'iperuricuria, l'iperossaluria, l'iperfosfaturia e un'insufficiente escrezione urinaria di inibitori della cristallizzazione come citrato, magnesio e potassio [124-125].

Tra queste anomalie, nella calcolosi calcica idiopatica hanno la massima rilevanza l'ipercalciuria e l'iperossaluria, oltre all'insufficiente idratazione per la quale viene sempre raccomandato al paziente calcolotico di aumentare l'introito idrico [124].

L'**ipercalciuria** è definita come escrezione urinaria di calcio >250 mg/24 h nella femmina e >300 mg/24 h nel maschio, oppure come escrezione urinaria di calcio >4 mg/kg/24 h in entrambi i sessi, durante una dieta ad apporto calcico controllato [126]. Poiché è molto difficile mantenere un apporto calcico controllato durante la fase diagnostica, queste definizioni vengono impropriamente impiegate anche quando la misurazione della calciuria sulle urine delle 24 ore viene effettuata in dieta libera, anche se in questo caso è stato dimostrato che il rischio litogeno aumenta linearmente all'aumentare della calciuria e quindi non ha un effetto-soglia [127].

Nelle forme secondarie di calcolosi calcica l'ipercalciuria riconosce cause ben precise, come la mobilizzazione del calcio osseo. Nella calcolosi calcica idiopatica invece le cause dell'ipercalciuria sono spesso ignote, anche se fisiopatologicamente riconducibili a quattro diversi meccanismi: a) iperassorbimento intestinale di calcio mediato dalla vitamina D; b) iperassorbimento intestinale di calcio non mediato dalla vitamina D; c) insufficiente riassorbimento tubulare di calcio (*renal leak*); d) eccessiva mobilizzazione (o riassorbimento) di calcio dall'osso [126]. Queste distinzioni fisiopatologiche hanno tuttavia scarso rilievo nella pratica clinica, dove in genere si distinguono due forme di ipercalciuria: tipo 1, non responsiva al trattamento dietetico, e tipo 2, molto frequente nella

popolazione italiana, responsiva alla dieta iposodica ipoproteica [126]. Infatti, un elevato introito dietetico di sale e proteine animali può condizionare un incremento della calciuria [128] e, di converso, una dieta che limita l'apporto di questi nutrienti abbassa il rischio litogeno e si associa a un minor numero di recidive [129-130].

L'**iperossaluria**, definita come escrezione urinaria di ossalato >40 mg/24 h, è presente in circa il 20% dei soggetti con calcolosi calcica idiopatica ed è generalmente responsiva ad una riduzione dell'introito di ossalato con la dieta [131-132]. Poiché l'ossalato assorbito a livello intestinale non viene generalmente metabolizzato dall'organismo [133], l'escrezione urinaria di ossalato è in genere ritenuta strettamente dipendente dall'introito dietetico di questa sostanza [134].

Tra gli alimenti più ricchi di ossalato nella dieta occidentale si ricordano il cioccolato, la frutta secca, le bevande industriali gassate e in particolare la cola, il pomodoro, gli spinaci, la crusca [135]. Una dieta libera può contenere una quantità di ossalato variabile da 44 a 351 mg/24 h, che sembrerebbe dipendere dall'abitudine al consumo degli alimenti sopra menzionati [136].

Gli studi di Taylor e Curhan hanno però evidenziato, su una popolazione di soggetti non calcolotici, che l'escrezione urinaria di ossalato è solo marginalmente influenzata dall'abitudine al consumo degli alimenti ricchi di ossalato [137]. Tale abitudine può comunque determinare un incremento del rischio di sviluppare calcoli sul lungo periodo [138].

In realtà il metabolismo dell'ossalato è molto più complesso e la sua escrezione urinaria non dipende solamente dall'assorbimento intestinale, ma anche da una certa quota di produzione endogena che deriva dal catabolismo dell'acido ascorbico, dal catabolismo delle proteine del collagene ricche di idrossiprolina (sia endogene che introdotte con la dieta), dal catabolismo dell'uracile e dell'acido orotico [139-142]. Anche l'assorbimento intestinale dell'ossalato non è sempre direttamente proporzionale all'introito dietetico, in quanto dipende in modo inverso dalla disponibilità di calcio e magnesio [143-145]. Una dieta ricca di calcio determina un calo della biodisponibilità dell'ossalato in quanto le due sostanze si chelano a livello intestinale. Pertanto, una dieta ricca di latte e latticini annulla gli effetti urinari di una dieta ad elevato contenuto di ossalato.

Viceversa, una dieta povera di calcio esalta la biodisponibilità intestinale dell'ossalato, che quindi viene assorbito in modo molto efficace dall'intestino e quindi si traduce in iperossaluria [146-147].

Pertanto, i determinanti dell'escrezione urinaria di ossalato sono [133,148]:

- l'introito dietetico di ossalato e in particolare l'abitudine al consumo di cibi ricchi in ossalato;
- l'introito dietetico di calcio e magnesio (in modo inverso);
- l'introito dietetico e la produzione endogena di idrossiprolina;
- l'introito dietetico di pirimidine e quindi di carni;
- il catabolismo endogeno delle pirimidine;
- l'introito dietetico e la produzione endogena di acido ascorbico;
- il peso corporeo;
- la predisposizione genetica all'iperossaluria;
- il malassorbimento di grassi (iperossaluria enterica, frequentemente riscontrabile nelle calcolosi calciche secondarie);
- l'abbondanza a livello intestinale di batteri degradanti l'ossalato (che verrà discussa nel paragrafo successivo).

Vanno infine considerati anche fattori renali intrinseci, per cui, nei pazienti con calcolosi calcica idiopatica ed iperossaluria, esiste evidenza di un'aumentata secrezione attiva di ossalato a livello del nefrone rispetto a controlli sani [149].

In un quadro di tale complessità, poiché la calcolosi renale è una patologia con elevato rischio di recidive, è fondamentale un corretto inquadramento dietetico-metabolico dei pazienti al fine di impostare trattamenti farmacologici e/o dietetici personalizzati sulla base dei fattori di rischio effettivamente presenti [122,146]. Lo strumento che consente tale inquadramento, oltre all'anamnesi, all'esame obiettivo e alla prescrizione di esami di laboratorio e strumentali finalizzati ad escludere le cause secondarie di calcolosi calcica, è il cosiddetto profilo di rischio litogeno

urinario. Si tratta di un pannello di esami, condotti su un campione urinario delle 24 ore, che rappresentano i principali fattori coinvolti nella litogenesi, e possono quindi stimare il rischio di recidiva [150-151].

Tale profilo, di cui alcuni esempi sono illustrati nelle Figure 1 e 2, consiste nella determinazione, su urine delle 24 ore, dei seguenti parametri:

- Dosaggio dei promotori della cristallizzazione (calcio, fosforo, acido urico, ossalato);
- Dosaggio degli inibitori della cristallizzazione (citrato, magnesio, potassio);
- Dosaggio di marcatori dietetici (sodio e cloro, indici del consumo di sale; solfato, indice del consumo di proteine animali; ammonio, indice del carico acido della dieta; creatinina ed urea, indici del consumo di proteine e marcatori della correttezza della raccolta delle urine);
- Volume urinario (indice di idratazione);
- pH urinario (da cui dipende la propensione alla precipitazione di vari tipi di cristalli);
- Calcolo degli indici di sovrasaturazione per i principali sali litogeni (calcio ossalato, calcio fosfato, acido urico, struvite), espressione del rischio di precipitazione dei vari cristalli, ottenuto attraverso il software Equil® [152].

La terapia della calcolosi calcica idiopatica, sulla base dei risultati della valutazione clinico-laboratoristica, è quindi personalizzata e si avvale di interventi dietetico-comportamentali mirati ai vari fattori di rischio urinari (aumento dell'introito di fluidi, riduzione del consumo di sale e proteine animali, aumento del consumo di frutta e verdura) oppure di trattamenti farmacologici, specialmente nei casi non responsivi all'intervento nutrizionale [122,146]. Tra questi trattamenti farmacologici, i principali sono il citrato di potassio (nei casi in cui vi è un insufficiente apporto dietetico di frutta e verdura oppure è presente un deficit di inibitori della litogenesi), i diuretici tiazidici o tiazido-simili (nelle forme di ipercalciuria non dipendente dalla dieta), l'allopurinolo (nei casi di iperuricuria), la vitamina B₆ (nei casi di iperossaluria scarsamente responsiva al trattamento dietetico) [153-154].

Il follow-up clinico avviene con una periodica valutazione dietetico-metabolica, generalmente annuale oppure al momento di eventuali recidive, finalizzata sia a valutare la compliance ai trattamenti prescritti che l'andamento del rischio litogeno nel tempo [155].

CALCOLOSI RENALE E MICROBIOTA

La scoperta di *Oxalobacter formigenes*

Come discusso nella sezione precedente, l'intestino è un organo importantissimo nella fisiopatologia della calcolosi renale calcica, in quanto l'escrezione urinaria dei due principali fattori prolitogeni, calcio e ossalato, dipende in larga parte da fenomeni di assorbimento intestinale. E' quindi plausibile ipotizzare che il microbiota giochi un ruolo nel metabolismo di queste sostanze nel lume intestinale e quindi possa influenzarne l'assorbimento.

Nel 1980 un gruppo di microbiologi americani del Dipartimento di Stato per l'Agricoltura, guidato da Milton Allison, ha isolato dal materiale estratto dal rumine di alcuni mammiferi un ceppo batterico caratterizzato da una spiccata attività metabolica di degradazione dell'ossalato [156]. Tale batterio è stato successivamente isolato anche dall'intestino di altri mammiferi tra cui la cavia domestica (*Cavia porcellus*). Questi isolamenti hanno permesso di elaborare metodiche di coltura del ceppo batterico stesso, che è stato in seguito classificato a livello tassonomico come una nuova specie, denominata, in virtù della sua attività metabolica, *Oxalobacter formigenes* [157].

Le caratteristiche biologiche e metaboliche di questa nuova specie sono state successivamente studiate con tecniche sempre più raffinate. *Oxalobacter formigenes* è un batterio Gram-negativo, anaerobio obbligato, che trae l'energia necessaria per la propria sopravvivenza proprio dalla degradazione dell'ossalato grazie alla presenza di vie enzimatiche dedicate. Gli enzimi coinvolti sono l'ossalil-CoA decarbossilasi e la formil-CoA transferasi, i cui geni sono altamente espressi da *Oxalobacter*, rendendo questo batterio il più efficiente sistema biologico di degradazione

dell'ossalato a tutt'oggi conosciuto [158]. Recentemente, analisi del genoma di *Oxalobacter* hanno permesso di identificare due diversi ceppi (Gruppo 1 e Gruppo 2), le cui differenze in termini metabolici sono però ancora poco chiare [159].

L'interesse medico verso questa specie batterica è aumentato in seguito al suo isolamento, ottenuto tramite metodiche colturali, da campioni di feci umane [160]. E' stato peraltro dimostrato che le cariche batteriche di *Oxalobacter* erano significativamente inferiori in un gruppo di soggetti sottoposti a chirurgia bariatrica, e quindi predisposti allo sviluppo di iperossaluria, rispetto a controlli sani [160]. Questa osservazione ha fatto ipotizzare un coinvolgimento di questo batterio nella fisiopatologia della calcolosi renale da calcio ossalato. Già alla fine degli anni Ottanta, lo stesso gruppo di ricercatori responsabili del primo isolamento ha dimostrato che, nella cavia domestica, l'assorbimento intestinale di ossalato è inversamente proporzionale alla carica batterica dell'*Oxalobacter* [161].

Poiché *Oxalobacter* è presente nel microbiota intestinale umano con cariche microbiche molto basse, rappresentando quindi un “*minor player*” in un ecosistema così complesso, il suo isolamento con tecniche microbiologiche classiche è molto difficile. Questo ha ostacolato per parecchi anni la ricerca scientifica su questo argomento. Alla fine degli anni Novanta tuttavia un gruppo di microbiologi americani, comprendente anche lo “scopritore” Allison, ha messo a punto una metodica di identificazione e quantificazione dell'*Oxalobacter* su campioni di feci umane tramite *Polymerase-Chain Reaction* (PCR) del gene *oxc* (ossalil-CoA decarbossilasi) [162]. Questa metodica, anche se specie-specifica, ha fornito un nuovo impulso alla ricerca sull'*Oxalobacter* e rinnovato l'interesse della comunità medica, soprattutto per le sue potenziali implicazioni nel trattamento della calcolosi renale.

La presenza di *Oxalobacter formigenes* non è costante nel microbiota intestinale umano, ma si stima che vari dal 30 al 70% dei soggetti adulti. Nei soggetti in cui è presente tuttavia *Oxalobacter* tende a permanere nel tempo. I fattori che influenzano la colonizzazione intestinale da parte di questo batterio sono sconosciuti [163]. Si ipotizza comunque che le terapie antibiotiche possano

agire da modulatori negativi, favorendo la scomparsa di questa specie nel microbiota intestinale di soggetti precedentemente colonizzati [164-165].

La rappresentazione di *Oxalobacter* nel microbiota intestinale generalmente aumenta dopo una dieta ad alto contenuto di ossalato, in quanto la sua crescita è strettamente dipendente dalla disponibilità del substrato energetico [163]. D'altra parte, la presenza di *Oxalobacter* nel microbiota è in grado di ridurre l'assorbimento frazionale dell'ossalato introdotto con la dieta [163]. Esso rappresenta quindi potenzialmente un fattore molto importante nella regolazione del metabolismo corporeo dell'ossalato e nella fisiopatologia dell'iperossaluria [133,148].

***Oxalobacter* e calcolosi renale: studi osservazionali**

Il concetto che la mancata colonizzazione intestinale da parte di *Oxalobacter formigenes* rappresenti un fattore di rischio per la calcolosi calcica idiopatica è condiviso dalla comunità scientifica internazionale [164-165]. Gli studi osservazionali che supportano questo concetto sono sintetizzati nella Tabella 4.

Il primo importante contributo clinico per chiarire questo concetto è stato dato dagli studi di Sidhu ed Hesse. In un gruppo di 145 pazienti con calcolosi idiopatica da calcio ossalato questi autori hanno dimostrato che esiste una correlazione inversa tra i livelli di colonizzazione intestinale di *Oxalobacter* e il numero di episodi di colica renale [166-167]. Inoltre, in un sottogruppo di tali soggetti è stato dimostrato che l'escrezione urinaria di ossalato è maggiore nei soggetti colonizzati da *Oxalobacter* rispetto ai soggetti non colonizzati [166-167]. Similmente, in pazienti con IBD e con fibrosi cistica, ad alto rischio di iperossaluria per fenomeni di malassorbimento, è stata osservata una colonizzazione intestinale da parte di *Oxalobacter* significativamente inferiore rispetto a soggetti sani [166-168]. Questo fenomeno può spiegare almeno in parte perché i pazienti affetti da queste patologie hanno un elevato rischio di sviluppare forme secondarie di calcolosi renale [167-168]. Infine, gli stessi ricercatori hanno verificato che la presenza di *Oxalobacter* nel

microbiota intestinale del topo è inversamente correlata all'escrezione urinaria di ossalato durante una dieta ad apporto controllato del nutriente stesso [167].

Kaufman e colleghi hanno verificato, in uno studio caso-controllo condotto su 247 calcolotici calcici e 259 controlli non calcolotici, che la prevalenza di colonizzazione da *Oxalobacter* era significativamente inferiore nei pazienti (17%) rispetto ai controlli (38%) e rappresentava un fattore protettivo indipendente per lo sviluppo di calcolosi renale. Tuttavia, essi non hanno dimostrato nessuna correlazione statisticamente significativa tra carica batterica di *Oxalobacter*, determinata attraverso metodiche colturali, e ossaluria, sia nei calcolotici che nei controlli [169].

Siener e colleghi hanno recentemente dimostrato che la presenza di *Oxalobacter* nei campioni fecali, determinata attraverso PCR, si associa in modo inverso all'escrezione urinaria di ossalato nei soggetti con calcolosi calcica idiopatica solamente durante un regime dietetico ad apporto controllato di ossalato. Viceversa, questa associazione non è stata dimostrata quando l'ossaluria è stata misurata mentre i partecipanti allo studio seguivano una dieta libera. Infatti, l'ossaluria media di 11 calcolotici colonizzati da *Oxalobacter* è risultata significativamente inferiore a quella di 26 calcolotici non colonizzati da *Oxalobacter* sotto dieta controllata ($28,6 \pm 6,6$ vs $40,9 \pm 17,5$ mg/24 h, $p=0.003$), ma non in dieta libera ($27,6 \pm 9,2$ vs $35,9 \pm 11,9$ mg/24 h, $p=0.06$) [170]. E' possibile che queste differenze non siano esclusivamente dovute alla capacità dell'*Oxalobacter* di degradare l'ossalato introdotto con la dieta, ma che dipendano anche dall'interazione tra il batterio stesso e la mucosa, con stimolazione della secrezione attiva di ossalato nel lume intestinale da parte dell'epitelio [171]. Bassi tassi di colonizzazione con *Oxalobacter* sono stati confermati anche in gruppi di soggetti con IBD e in grandi obesi [172-173].

Le ragioni per cui i calcolotici hanno una minore prevalenza di colonizzazione intestinale con *Oxalobacter* sono poco note. Siener & Hesse hanno ipotizzato che questa differenza tra calcolotici e controlli sia dovuta a una maggiore esposizione alle terapie antibiotiche come conseguenza di una diversa prevalenza di infezioni delle vie urinarie. Hanno infatti dimostrato che, in un gruppo di 57 donne calcolotiche con storia personale di infezioni delle vie urinarie ricorrenti, l'escrezione

urinaria di ossalato è significativamente maggiore rispetto a un gruppo di 78 donne calcolotiche con anamnesi negativa per tali infezioni ($33,6 \pm 2,0$ vs $27,7 \pm 1,5$ mg/24 h, $p=0.04$) [174]. Nessun altro studio ha ulteriormente verificato questa ipotesi, misurando le effettive prevalenze di colonizzazione con *Oxalobacter* e le relative cariche batteriche.

***Oxalobacter* e calcolosi renale: studi di intervento**

La ricerca sui rapporti tra *Oxalobacter* e calcolosi renale si è fin dai primi studi concentrata sulle possibili implicazioni terapeutiche. Infatti, se questo batterio è in grado di degradare l'ossalato, la somministrazione di un probiotico che lo contiene dovrebbe essere teoricamente in grado di ridurre l'assorbimento intestinale di ossalato, l'ossaluria e quindi anche il rischio litogeno [175-177]. L'interesse verso il potenziale terapeutico dell'*Oxalobacter* è nato anche dalla relativa scarsità di farmaci capaci di agire sulla regolazione del metabolismo dell'ossalato, e quindi dall'assenza di una vera alternativa alla dieta ipossalica [175-177].

Nel primo studio di intervento, pubblicato nel 2001, la somministrazione di un probiotico a base di *Oxalobacter formigenes* a un gruppo di topi sottoposti a una dieta ad elevato contenuto di ossalato ha determinato un significativo calo dell'escrezione urinaria di ossalato, con riduzione del rischio litogeno [178]. In seguito, lo stesso probiotico è stato somministrato ad un gruppo di volontari umani sani, determinando una riduzione dell'ossaluria stabile nel tempo e una persistente colonizzazione fecale da parte del batterio [179]. Recentemente, *Oxalobacter* è stato somministrato come probiotico (Oxabact®) a soggetti in età pediatrica affetti da iperossaluria primitiva, una patologia genetica caratterizzata da un difetto nel sistema di manipolazione renale dell'ossalato e caratterizzata dall'insorgenza di una forma molto grave di calcolosi calcica secondaria e nefropatia cronica in età pediatrica. I risultati sono stati tuttavia negativi, poiché la preparazione non si è dimostrata capace di influenzare significativamente l'ossaluria [180].

Non sono tuttavia presenti in letteratura altri studi nei quali *Oxalobacter formigenes* sia stato direttamente somministrato come probiotico per modificare il rischio litogeno.

L'interesse della comunità scientifica si è infatti concentrato su altre formulazioni di probiotici, già presenti in commercio, con attività, almeno teorica, di degradazione dell'ossalato. Infatti, alcuni batteri del genere *Bifidobacterium* e del genere *Lactobacillus* (in particolare *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*) hanno mostrato attività ossalato-degradante in vitro [181]. Tutti gli studi di intervento successivi si sono quindi concentrati sugli effetti clinici e urinari della somministrazione di probiotici a base di uno o più di questi *taxa*.

Campieri e colleghi hanno per la prima volta dimostrato, nel 2001, su 6 calcolotici calcici con iperossaluria, che la somministrazione di probiotici a base di lattobacilli è in grado di ridurre in modo significativo, e persistente nel tempo dopo la cessazione del trattamento, i livelli di escrezione urinaria di ossalato ($33,5 \pm 15,9$ mg/24 h dopo il trattamento vs $55,5 \pm 19,6$ mg/24 h prima del trattamento, $p < 0.05$) [182].

Lieske e colleghi hanno invece studiato le possibili applicazioni dello stesso probiotico (Oxadrop®) su 10 pazienti con iperossaluria secondaria a malassorbimento, evidenziando cali significativi dell'escrezione urinaria di ossalato (-19%), anche se meno marcati rispetto a quelli osservati da Campieri in soggetti con calcolosi calcica idiopatica [183]. La somministrazione di un probiotico a composizione simile, VSL#3, a piccoli gruppi di volontari sani ha indotto simili modificazioni metaboliche, con riduzione dell'assorbimento intestinale di ossalato e dell'ossaluria [184-185].

Tuttavia, nell'unico trial randomizzato controllato con placebo presente in letteratura, condotto su 20 calcolotici calcici con iperossaluria, la somministrazione per 4 settimane di probiotici a base di lattobacilli (Oxadrop®) non ha determinato significative variazioni nell'escrezione urinaria di ossalato [186]. Similmente, in un altro studio cross-over condotto su 20 volontari sani sotto dieta ad elevato contenuto di ossalato, la somministrazione di Oxadrop® non si è associata a significative variazioni dell'ossaluria [187].

Pertanto, anche se alcuni autori hanno proposto che i lattobacilli possano esercitare azioni protettive nei confronti della calcolosi renale indipendentemente dall'attività di degradazione dell'ossalato

[188], l'iniziale entusiasmo nei confronti dei probiotici quali possibili modulatori del rischio litogeno nella calcolosi calcica idiopatica [189] è attualmente mitigato [190]. Recentemente è stato inoltre dimostrato che le formulazioni di probiotici contenenti lattobacilli hanno una scarsa attività di degradazione dell'ossalato in vitro, per cui attualmente il loro utilizzo non è raccomandato nella gestione clinica dei pazienti calcolotici con iperossaluria [191].

Una sintesi dei risultati dei principali studi di intervento sul rapporto tra microbiota intestinale e rischio di calcolosi renale è riportata nella Tabella 5.

Secondo alcuni studiosi, una delle frontiere del trattamento della calcolosi renale calcica idiopatica non sarebbe più quindi la somministrazione di probiotici con attività ossalato-degradanti, ma di farmaci contenenti l'enzima ossalil-CoA decarbossilasi, per ridurre l'assorbimento intestinale di ossalato e, possibilmente, ridurre le dimensioni di calcoli preesistenti [192]. Questa idea, già presente fin dai tempi della scoperta dell'*Oxalobacter formigenes* [193], non è tuttavia mai stata verificata in studi clinici.

Calcolosi renale e metagenomica: non solo *Oxalobacter*

Gli studi, sopra citati, che hanno investigato il ruolo del microbiota intestinale nella calcolosi renale si sono tutti focalizzati esclusivamente su *Oxalobacter formigenes*, identificato nelle feci tramite metodiche microbiologiche colturali o genomiche (PCR), ma comunque specie-specifiche. Come delineato in precedenza, la metagenomica fornisce al giorno d'oggi tutti gli strumenti per superare i limiti di queste tecniche, realizzando un vero e proprio *microbial profiling* dei *taxa* che compongono il microbiota intestinale.

Questo approccio permetterebbe di comprendere meglio il ruolo dei batteri ossalato-degradanti nel microbiota intestinale e nella fisiopatologia della calcolosi renale calcica. Infatti, recenti studi hanno evidenziato come, tra i componenti del microbiota intestinale umano, *Oxalobacter formigenes* non sia l'unico batterio in grado di degradare l'ossalato (Tabella 6) [194]. Tra i batteri ossalato-degradanti sono infatti comprese anche specie come *Eggerthella lenta*, *Enterococcus faecalis*,

Providencia rettgeri, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, che sono generalmente presenti con abbondanza relativa maggiore di *Oxalobacter formigenes* [194]. Pertanto, esiste la possibilità che *Oxalobacter* rappresenti solamente un componente, indubbiamente il più efficiente ma non il più abbondante, di un sistema microbico intestinale complesso deputato alla degradazione dell'ossalato e dunque alla regolazione del suo assorbimento in circolo.

Ad oggi, un solo studio pubblicato nella letteratura scientifica ha confrontato la composizione del microbiota intestinale tra calcolotici e controlli con tecniche metagenomiche [195]. In questo studio, Stern e colleghi [195] hanno confrontato la composizione del microbiota intestinale di 29 calcolotici (di qualunque tipo, quindi non solo calcici) e 6 controlli, evidenziando un'abbondanza relativa di *Bacteroides* significativamente maggiore nei calcolotici e di *Prevotella* significativamente maggiore nei controlli. In un sottogruppo di 11 calcolotici, gli stessi autori hanno inoltre dimostrato una correlazione inversa tra i livelli di ossaluria e l'abbondanza relativa di *Eubacterium*, un genere che possiede capacità di degradazione dell'ossalato in vitro [196].

Questo studio pilota presenta molti limiti legati al basso numero di soggetti arruolati, in particolare di controlli, all'eterogeneità dei soggetti calcolotici partecipanti, e anche alla bassa accuratezza delle tecniche metagenomiche utilizzate, capaci di identificare solamente un numero relativamente basso di *taxa* (178 contro le alcune migliaia delle tecniche più moderne). Esso quindi non consente di trarre informazioni rilevanti sull'interazione tra microbiota intestinale e calcolosi renale calcica, anche se contribuisce a rafforzare l'ipotesi che il metabolismo intestinale dell'ossalato non sia legato al solo *Oxalobacter*.

Recentemente, Barnett e colleghi hanno analizzato, con tecniche metagenomiche, il microbiota intestinale di 94 giovani adulti non calcolotici partecipanti allo *Human Microbiome Project* per verificare la prevalenza di colonizzazione con *Oxalobacter formigenes*, riuscendo a stimarla tra il 17 e il 31%. Essi inoltre hanno dimostrato che, quando presente, *Oxalobacter* ha un'abbondanza relativa molto bassa, pari allo 0.015% circa dell'intero microbiota [197]. Questo studio rappresenta

un ulteriore esempio di applicazione delle tecniche metagenomiche all'ambito della calcolosi renale, anche se è stato realizzato esclusivamente su controlli sani.

IPOTESI E OBIETTIVI DELLO STUDIO

Come evidenziato nella parte introduttiva, la maggioranza degli studi, che hanno confrontato la composizione del microbiota intestinale tra soggetti con calcolosi calcica idiopatica e soggetti non calcolotici, ha impiegato tecniche microbiologiche classiche, di tipo colturale o comunque specie-specifico. Essi si sono inoltre focalizzati prevalentemente su una specie, *Oxalobacter formigenes*, senza considerare il fatto che numerosi altri componenti del microbiota intestinale possono essere coinvolti nella degradazione dell'ossalato e quindi nel processo di assorbimento intestinale di ossalato e di calcio. E' quindi plausibile che questi studi non abbiano colto la complessità nelle relazioni tra microbiota intestinale e litogenesi renale. Le nuove tecniche metagenomiche (16S rRNA microbial profiling) potrebbero dare un grande contributo in questo senso.

Su queste basi, si ipotizza pertanto che il microbiota intestinale di pazienti affetti da forme severe e recidivanti di calcolosi calcica idiopatica sia significativamente diverso, nella sua composizione, rispetto al microbiota intestinale di soggetti non calcolotici. In particolare, si ipotizza che la rappresentazione delle specie con capacità metabolica di degradazione dell'ossalato sia inferiore nei soggetti calcolotici rispetto ai controlli.

L'obiettivo primario di questo studio è quindi quello di confrontare la composizione del microbiota fecale di un gruppo di soggetti con calcolosi calcica idiopatica recidivante e un gruppo di controlli non calcolotici, sia in termini di alfa- e beta-diversità che in termini di abbondanza relativa di singoli taxa, utilizzando tecniche metagenomiche di ultima generazione (16S rRNA microbial profiling). Obiettivi secondari di questo studio sono quelli di: a) verificare le differenze nelle abitudini nutrizionali tra calcolotici e controlli, e valutare il loro impatto sulla composizione del microbiota; b) verificare le differenze nella rappresentazione di *Oxalobacter formigenes* e altre specie ossalato-degradanti tra calcolotici e controlli; c) valutare le differenze nell'espressione di

diverse vie metaboliche batteriche nel microbiota fecale tra calcolotici e controlli, utilizzando tecniche di shotgun metagenomics di ultima generazione.

DISEGNO E SETTING DELLO STUDIO

Si tratta di uno studio osservazionale prospettico caso-controllo, di carattere no-profit e non sponsorizzato.

La parte clinica dello studio è stata condotta presso il Centro Calcolosi Renale e Infezioni delle Vie Urinarie dell'Ospedale Maggiore di Parma. Tale centro, afferente all'U.O. Medicina Interna e Lungodegenza Critica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e al Dipartimento di Medicina e Chirurgia dell'Università di Parma, rappresenta un hub di terzo livello per il trattamento medico e la prevenzione delle recidive di calcolosi renale, ponendosi da oltre 30 anni come centro di riferimento regionale ed extra-regionale. Infatti, si tratta dell'unico centro pubblico della Regione Emilia-Romagna e uno dei pochi in Italia a realizzare un profilo di rischio litogeno dietetico-metabolico urinario completo, grazie al quale è possibile impostare un trattamento personalizzato sui fattori di rischio individuali [151]. Il volume attuale di attività si attesta attorno alle 600 prime visite annuali con 1300 visite di follow-up ogni anno.

La parte laboratoristica dello studio (analisi del microbiota fecale) è stata condotta presso il Laboratorio di Probiogenomica del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale dell'Università di Parma. Tale struttura rappresenta un centro di riferimento nazionale ed internazionale per le analisi metagenomiche su campioni biologici, grazie anche ad alcuni protocolli di analisi dei campioni messi a punto ed implementati presso il Laboratorio stesso [9,66,198].

MATERIALI E METODI

POPOLAZIONE DELLO STUDIO

Pazienti calcolotici

Sono stati arruolati 55 soggetti affetti da calcolosi calcica idiopatica recidivante (33 M, 22 F), con età media di 48 ± 11 anni (range 24-70), afferiti in prima visita presso il Centro Calcolosi Renale e Infezioni delle Vie Urinarie dell'Ospedale Maggiore di Parma tra ottobre 2015 e settembre 2016.

I criteri di inclusione sono stati i seguenti:

- Età ≥ 18 anni
- Capacità di intendere e di volere e sottoscrizione di uno specifico modulo di consenso alla partecipazione allo studio e di un modulo per il consenso al trattamento dei dati personali
- Presenza di almeno due documentati episodi di colica renale nella storia personale
- Presenza di calcoli radio-opachi alla radiografia addominale in bianco ritenuti a livello renale oppure documentata espulsione, entro i 2 anni precedenti all'arruolamento, di calcoli con composizione prevalentemente calcica (calcio ossalato e/o calcio fosfato $\geq 80\%$)

I criteri di esclusione sono invece stati i seguenti:

- Gravi comorbidità croniche o acute con prognosi quoad vitam < 1 anno
- Insufficienza renale cronica con GFR < 50 ml/min oppure creatininemia basale > 1.4 mg/dl
- Nefrolitiasi calcica idiopatica al primo episodio (una sola colica renale nella storia personale oppure riscontro incidentale di calcoli ad esami di imaging addominale come ecografia, radiografia o TC)
- Calcolosi calcica di origine secondaria (per esempio, da acidosi tubulare renale, nefrocalcinosi, iperossaluria primitiva, malattie infiammatorie croniche intestinali, malassorbimento, esiti di chirurgia bariatrica, iperparatiroidismo primitivo, malattia di Paget ossea, ipertiroidismo, mieloma multiplo, metastasi osteolitiche, sarcoidosi, acromegalia,

sindrome da immobilizzazione protratta)

- Presenza di malformazioni urinarie o patologie favorenti il ristagno urinario, come stenosi del giunto pieloureterale, reflusso vescico-ureterale, doppio sistema escretore, rene a spugna midollare, vescica neurologica da traumi spinali o spina bifida
- Calcolosi mista (calcoli con composizione calcica <80% o tenuamente radio-opachi alla radiografia addominale in bianco)
- Calcolosi non calcica (acido urico o radio-trasparente, struvite, cistina)
- Presenza di infezioni acute, acute ricorrenti o croniche delle vie urinarie documentate da positività di una o più urinocolture o da necessità di effettuare periodici cicli di antibioticotераpia
- Soggetti monorene o portatori di trapianto renale
- Soggetti con esiti di chirurgia urologica o intestinale maggiore (per esempio, ricostruzioni vescicali, diversioni urinarie, resezioni intestinali >50 cm, emicolectomie, colectomie)
- Deterioramento cognitivo e/o incapacità di intendere e di volere
- Presenza di regimi dietetici non liberi, sia dietro prescrizione medica che volontari (per esempio, soggetti con celiachia, vegetariani, vegani)
- Assunzione di terapia antibiotica, per qualsiasi motivazione clinica, nei 30 giorni precedenti l'arruolamento

Sulla base di questi criteri, si è quindi selezionato un gruppo omogeneo di soggetti con calcolosi calcica idiopatica recidivante ad elevata attività metabolica (almeno 2 episodi di calcolosi nei 2 anni precedenti).

Controlli

Presso il Centro Calcolosi Renale e Infezioni delle Vie Urinarie dell'Ospedale Maggiore di Parma sono stati arruolati anche 53 soggetti non calcolotici (32 M, 21 F) con età media di 47 ± 13 anni

(range 22-74). L'arruolamento è avvenuto su base volontaria tra il mese di ottobre 2015 e il mese di settembre 2016. I soggetti sono stati contattati tramite annunci pubblici e non hanno ricevuto alcun compenso per la partecipazione allo studio.

I criteri di inclusione nello studio dei controlli sono stati i seguenti:

- Età ≥ 18 anni
- Capacità di intendere e di volere e sottoscrizione di uno specifico modulo di consenso alla partecipazione allo studio e di un modulo per il consenso al trattamento dei dati personali
- Assenza di calcolosi renale e/o episodi di colica renale, anche presunti e non documentati, nell'anamnesi patologica remota
- Assenza di calcoli ritenuti a livello renale in un esame ecografico dell'addome eseguito autonomamente dal soggetto nei 2 mesi precedenti all'arruolamento oppure effettuato presso il Centro Calcolosi Renale contestualmente alla visita di arruolamento nello studio

Dal gruppo dei controlli sono quindi stati esclusi tutti i soggetti con precedenti coliche renali o con ecografia addominale positiva per la presenza di coliche renali e/o renella. Sono inoltre stati esclusi tutti i soggetti con uno qualsiasi dei criteri di esclusione validi per il gruppo dei calcolotici.

Dimensioni del campione

Le attuali raccomandazioni scientifiche per gli studi osservazionali caso-controllo di metagenomica umana non prevedono un calcolo di numerosità campionaria su basi statistiche, essendo numerosissime le variabili outcome (alfa-diversità, beta-diversità, abbondanza relativa di centinaia di diversi taxa) [14]. D'altra parte, come esposto nella parte introduttiva, al momento non esistono studi metagenomici che rappresentino uno standard di riferimento nell'ambito della calcolosi renale. Tuttavia, è noto che fisiologicamente circa il 10% degli umani sani possiede una composizione particolare, o enterotipo, del microbiota ricco di batteri del genere *Prevotella* [15]. Sulla base di questa considerazione, per avere una probabilità maggiore del 95% di includere in ciascun gruppo studiato almeno un soggetto con questa composizione particolare del microbiota, è necessario

arruolare almeno 29 pazienti per gruppo [14-15]. Nello studio esposto in questa tesi si è deciso di arruolare un numero maggiore di soggetti, sia calcolotici che controlli, per meglio delineare le differenze nella composizione del microbiota intestinale tra i due gruppi.

PROCEDURE CLINICHE

Pazienti calcolotici

I soggetti calcolotici sono stati sottoposti al consueto percorso di inquadramento clinico-anamnestico effettuato di routine ai pazienti che afferiscono in prima visita al Centro Calcolosi Renale e Infezioni delle Vie Urinarie dell'Ospedale Maggiore di Parma. Tale percorso comprende una valutazione anamnestica e clinica completa, esami sieroematici ed urinari per la determinazione dei fattori di rischio litogeno, esami strumentali come ecografia addominale, radiografia dell'addome e TC addominale secondo il giudizio clinico del medico [151] e in accordo con i protocolli riportati nella letteratura internazionale [119]. Ad ogni paziente è stata data indicazione di non modificare le proprie abitudini e/o stili di vita sino al completamento del percorso diagnostico e delle procedure previste nello studio.

In particolare, tra gli esami sieroematici è stata dosata la creatininemia, la calcemia totale, la fosforemia e l'uricemia.

Ogni paziente ha poi effettuato una raccolta di urine di 24 ore per la determinazione del profilo di rischio litogeno urinario. La metodologia di raccolta delle urine ha seguito un protocollo consolidato presso il Centro Calcolosi di Parma [151], che prevede la suddivisione dell'urina espulsa ad ogni minzione in due metà, di cui una depositata in un contenitore contenente un'aliquota di HCl per consentirne l'acidificazione e una depositata in un contenitore non acidificato. La raccolta delle urine di 24 ore è stata effettuata di domenica e i campioni sono stati consegnati per l'analisi al lunedì mattina.

Per ogni campione di urina è stato calcolato il volume e, sulla metà non acidificata, è stato determinato il pH con un pHmetro. Sono poi stati determinati i seguenti parametri: creatinina

(metodo di Jaffé); sodio, potassio, calcio, magnesio (spettrofotometria ad assorbimento atomico); cloro (titolazione elettrochimica); acido urico (metodo dell'uricasi); solfato, fosfato, ossalato (cromatografia ionica); citrato (metodo della citrato liasi); urea (metodo dell'ureasi); ammonio (metodo colorimetrico di Berthelot). Sulla base dei valori di tali determinazioni, sono poi stati calcolati gli indici di sovrasaturazione urinaria per calcio ossalato, calcio fosfato, acido urico e struvite, utilizzando il software Equil™ secondo una metodologia ben consolidata dalla letteratura internazionale [152].

I pazienti sono stati quindi invitati a completare un questionario food-frequency sulle proprie abitudini alimentari riferite all'anno precedente la data di somministrazione. Tale questionario, di tipo semi-quantitativo, è stato somministrato da un biologo nutrizionista. E' stato utilizzato il questionario EPIC, validato nella popolazione italiana e precedentemente adottato in numerosi studi epidemiologici in ambito oncologico [199]. I dati raccolti (frequenza del consumo di vari alimenti e/o portate e delle quantità dichiarate) sono stati analizzati presso l'Istituto Europeo di Oncologia di Milano utilizzando un software dedicato, generando come output il consumo giornaliero medio di macro- e micro-nutrienti [199].

Infine, ad ogni paziente è stato consegnato un contenitore per la raccolta di un campione fecale ed è stato dato un appuntamento per la consegna del campione. I pazienti sono stati istruiti a raccogliere una piccola aliquota di feci (circa 2 grammi) nelle 12 ore precedenti alla consegna e a conservare tale campione in frigorifero. Al momento della consegna, i campioni sono stati refrigerati a -22°C e successivamente trasportati, in condizioni di refrigerazione, presso il Laboratorio di Probiogenomica dell'Università di Parma, sede dell'analisi di laboratorio per la determinazione della composizione del microbiota fecale. Le procedure di analisi del microbiota fecale sono dettagliate in un'apposita sezione.

Controlli

Al momento della visita di arruolamento, ogni controllo è stato sottoposto ad una valutazione

clinico-anamnestica completa, finalizzata essenzialmente a verificare l'effettiva eleggibilità del soggetto per l'inclusione nello studio. In particolare, tutti i soggetti con anamnesi negativa per coliche renali e senza esami di imaging addominale (ecografia, TC addome) eseguiti nei 2 mesi precedenti sono stati sottoposti ad un'ecografia addominale, finalizzata ad escludere eventuali forme silenti di calcolosi renale con presenza di calcoli e/o renella ritenuti. E' stato utilizzato un ecografo Siemens Acuson™ X300 5.0 (Siemens, Erlangen, Germania) dotato di sonda Convex CH5-2 Hanafy e di sonda lineare VF10-5. L'arruolamento dei soggetti è avvenuto solo nel caso in cui l'esame ecografico addominale fosse effettivamente negativo per presenza di calcoli e/o renella. A tal punto, in analogia con le procedure previste per i calcolotici, ogni controllo è stato sottoposto a:

- raccolta urinaria di 24 ore per la determinazione del profilo di rischio litogeno urinario (pH, volume, creatinina, sodio, potassio, calcio, magnesio, cloro, acido urico, solfato, fosfato, ossalato, citrato, urea, ammonio, sovrasaturazione urinaria per calcio ossalato, calcio fosfato, acido urico, struvite);
- somministrazione di questionario food-frequency EPIC da parte di un biologo nutrizionista;
- raccolta di un campione fecale per analisi metagenomiche del microbiota.

La metodologia di raccolta delle urine di 24 ore e del campione fecale, la metodologia delle analisi di laboratorio urinarie, e di somministrazione e analisi del questionario food frequency è stata identica a quella esposta sopra per i soggetti calcolotici.

ANALISI DEL MICROBIOTA FECALE

16S rRNA microbial profiling

I campioni fecali sono stati processati per l'estrazione del DNA batterico utilizzando il QIAamp DNA stool mini kit seguendo le indicazioni del produttore (Qiagen Ltd., Strasse, Germania). Le sequenze parziali del gene 16S rRNA del genoma batterico sono state quindi amplificate mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizzando le coppie di primer Probio_Uni e Probio_Rev, che

hanno come target le regioni V3 del gene 16S rRNA, seguendo una procedura elaborata e validata proprio presso il Laboratorio di Probiogenomica dell'Università di Parma [198].

Le condizioni della PCR usate sono state 5 minuti a 95°C, 35 cicli di 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 90 secondi a 72°C, seguiti da 10 minuti a 72°C. L'amplificazione è stata effettuata impiegando un Verity Thermocycler (Applied Biosystems). I PCR amplicons sono stati preparati seguendo il 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol [198]. L'integrità dei PCR amplicons è stata analizzata mediante elettroforesi sulla TapeStation (Agilent, USA).

I prodotti ottenuti in seguito all'amplificazione di specifiche regioni ipervariabili del gene 16S rRNA sono stati purificati prima mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% grazie a un Wizard SV Gen PCR Clean-Up System (Promega) e, in seguito, mediante purificazione magnetica con il kit Agencourt AMPure XP DNA purification beads (Beckman Coulter Genomics GmbH, Bernried, Germania), al fine di rimuovere i dimeri di primers. La concentrazione di DNA della libreria di sequenze purificate è stata quindi stimata attraverso il sistema di quantificazione fluorimetrica Qubit (Life Technologies). Gli amplicons sono stati diluiti alla concentrazione di 4 nM, e 5 µL di ogni soluzione di amplicon diluiti è stata utilizzata per preparare la libreria finale. Il sequenziamento è stato realizzato mediante un sequenziatore Illumina MiSeq utilizzando i reagenti del MiSeq Reagent kit v3.

Dopo il sequenziamento, le letture delle sequenze individuali sono state filtrate dal software PGM per rimuovere le sequenze di bassa qualità e le sequenze policlonali. Le reads di sequenza in formato fastq sono state processate grazie al software QIIME, secondo metodologie già riportate in letteratura [200-201]. Le paired-end reads sono state appaiate e il controllo di qualità ha fornito sequenze con una lunghezza fra 140 e 400 bp, quality score >25 e con interruzione della sequenza alla prima base se è stata individuata una finestra di 10 bp con bassa qualità. Le sequenze con mismatched forward o con primers inversi sono state omesse dall'analisi finale.

In questo modo, è stato determinato, per ogni campione di feci, l'indice di alfa-diversità (species richness). Il confronto tra campioni dello stesso gruppo (calcolotici vs controlli) ha inoltre permesso

di calcolare la variabilità inter-individuale, o beta diversità, tramite un'analisi UniFrac.

Le 16S rRNA Operational Taxonomic Units (OTUs) sono state definite da un valore di omologia di sequenza $\geq 99\%$. Tutte le OTUs sono state classificate alla collocazione tassonomica più bassa possibile utilizzando il database QIIME [200-201] e la software suite correlata SILVA [202]. Questo ha permesso una definizione qualitativa (presenza di determinati taxa nei campioni analizzati) e quantitativa (abbondanza relativa di ogni taxon identificato) della composizione del microbiota fecale, campione per campione.

Shotgun metagenomics

Su un totale di 10 campioni fecali selezionati casualmente (5 appartenenti al gruppo calcolotici e 5 appartenenti al gruppo dei controlli), sono state condotte analisi di deep shotgun metagenomics sequencing. Il DNA batterico è stato estratto dai campioni selezionati con procedure analoghe a quelle dettagliate sopra, utilizzando il QIAamp DNA Stool Mini kit secondo le istruzioni fornite dal produttore. Successivamente, il DNA batterico è stato frammentato in frammenti di 550-650 bp, utilizzando una BioRuptor machine (Diagenodo, Belgio). I campioni sono quindi stati preparati seguendo la TruSeq Nano DNA Sample Preparation Guide. E' stato quindi effettuato il sequenziamento tramite un sequenziatore Illumina NextSeq.

Sono stati così ottenuti dei file fastq, che sono stati quindi filtrati per le reads con qualità < 25 e presenza di DNA non batterico, e per le reads con lunghezza inferiore a 80 bp. Le basi sono state inoltre rimosse dal termine delle sequenze fino a che la qualità media in una finestra di 5 bp non è stata > 5 . Solo i dati accoppiati sono stati quindi analizzati.

La classificazione dei geni appartenenti alle varie vie metaboliche (orthologous groups) e l'identificazione di specifici geni correlati alla degradazione dell'ossalato sono stati realizzati utilizzando i custom scripts basati sul software RapSearch2 [203], sul database EggNOG [204] e su database personalizzati basati sugli enzimi di degradazione dell'ossalato. La classificazione delle reads codificanti per geni coinvolti nella degradazione dell'ossalato è stata realizzata per mezzo di

una versione modificata del software MEGAnnotator [205]. La rappresentazione media dei diversi geni è stata quindi confrontata tra i 5 campioni appartenenti al gruppo dei calcolotici e i 5 campioni appartenenti al gruppo dei controlli.

ANALISI STATISTICHE

Le variabili quantitative sono state espresse come media e deviazione standard in caso di distribuzione normale, mediana e range interquartile (IQR) in caso di distribuzione non normale e percentuale nel caso dell'abbondanza relativa di specifici taxa all'interno del microbiota fecale. Le variabili qualitative sono state espresse come percentuale.

Le variabili cliniche, nutrizionali e laboratoristiche sono state confrontate tra calcolotici e controlli utilizzando il test di Mann-Whitney corretto per età e sesso oppure con il test del chi-quadrato, quando appropriato. Le variabili cliniche, urinarie e nutrizionali per cui è stata dimostrata una differenza statisticamente significativa tra calcolotici e controlli sono state considerate come fattori di confondimento nel confronto delle variabili microbiologiche.

L'alfa-diversità media del microbiota fecale è stata confrontata fra i due gruppi mediante il test di Mann-Whitney corretto per età e sesso. E' stato quindi elaborato un modello multivariato di analisi della varianza per confrontare l'alfa diversità tra i due gruppi, selezionando le possibili covariate sulla base del criterio sopra esposto.

Il confronto delle variabilità inter-individuale (o beta-diversità) fra i calcolotici e i controlli è stato attuato mediante PERMANOVA e analisi di co-occurrence (Kendall tau rank).

Le abbondanze relative medie dei taxa più comuni (rappresentazione media in almeno uno dei due gruppi >0.001%) e dei batteri con proprietà di degradazione dell'ossalato, identificati secondo una lista pubblicata in letteratura [194], sono state confrontate fra calcolotici e controlli utilizzando covarianze e modelli univariati e multivariati di analisi della varianza. Per i modelli multivariati, i potenziali fattori di confondimento sono stati selezionati secondo il criterio sopra riportato.

Infine, la rappresentazione dei geni appartenenti a diversi pattern metabolici, e in particolare dei

geni coinvolti nella degradazione dell'ossalato, è stata confrontata tra i due gruppi di campioni selezionati per l'analisi di shotgun metagenomics mediante PERMANOVA ed analisi di co-occurrence.

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software SAS v. 9.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, Stati Uniti) e con il software IBM QSPSS (IBM Corporation, Armonk, New York, Stati Uniti). Valori di $p \leq 0.05$ sono stati considerati come statisticamente significativi.

ASPETTI ETICI

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico per Parma nella seduta del 15/7/2015 (prot. n. 27539) ed autorizzato dalla Direzione Sanitaria dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma in data 4/8/2015 (prot. 29157).

Tutti i partecipanti allo studio hanno sottoscritto un modulo di consenso informato alla partecipazione allo studio e un modulo di consenso al trattamento dei dati personali, secondo la normativa vigente. Nella conduzione dello studio, i ricercatori si sono attenuti ai principi della buona pratica clinica e ai principi espressi nella Dichiarazione di Helsinki e nei suoi successivi emendamenti.

RISULTATI

CARATTERISTICHE CLINICHE DEI CALCOLOTICI E DEI CONTROLLI

Sono stati arruolati 55 soggetti calcolotici (33 M, 22 F, età media 48 ± 11) e 53 controlli (32 M, 21 F, età media 47 ± 13). Un campione di feci per analisi metagenomica del microbiota fecale è stato ottenuto da tutti i soggetti, tuttavia 8 campioni (3 calcolotici, 5 controlli) sono stati esclusi a causa di scarsità del campione e/o alterazioni nella conservazione dello stesso prima delle procedure di analisi di laboratorio. Pertanto, l'analisi finale è stata condotta su 52 soggetti calcolotici (31 M, 21 F) e 48 controlli (28 M, 20 F).

Le caratteristiche clinico-laboratoristiche e nutrizionali dei due gruppi sono riassunte in Tabella 7. In particolare, ad un confronto tra calcolotici e controlli condotto con il test di Mann-Whitney e corretto per età e sesso, i calcolotici sono risultati avere un'escrezione urinaria significativamente maggiore di calcio (262 ± 111 vs 169 ± 85 mg/24 h, $p < 0.001$) e di ossalato (29 ± 11 vs 25 ± 8 mg/24 h, $p = 0.049$). Invece, l'escrezione urinaria di fosfato è risultata significativamente maggiore nei controlli (1272 ± 472 vs 1012 ± 332 mg/24 h, $p = 0.006$). Il volume urinario è risultato maggiore nei calcolotici (2.1 ± 0.8 vs 1.7 ± 0.7 L/24 h, $p = 0.006$). In accordo con queste differenze, la sovrassaturazione urinaria per calcio fosfato è risultata maggiore nei calcolotici (0.86 ± 0.61 vs 0.56 ± 0.47 , $p = 0.03$), così come quella per calcio ossalato, anche se al limite di significatività statistica (5.4 ± 2.9 vs 4.3 ± 2.7 , $p = 0.09$).

Dal punto di vista antropometrico, i due gruppi non differivano per BMI. Inoltre, dal punto di vista nutrizionale, dall'elaborazione dei dati raccolti con il questionario food frequency EPIC è emerso che l'intake energetico totale, dei macronutrienti e di sale non è risultato diverso tra calcolotici e controlli, mentre i calcolotici assumevano una quantità di calcio significativamente inferiore rispetto ai controlli (712 ± 275 vs 893 ± 374 mg/die, $p = 0.05$).

COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA FECALE

Biodiversità

La processazione dei 100 campioni fecali (52 calcolotici, 48 controlli) mediante 16S rRNA microbial profiling e il successivo sequenziamento degli amplicons ha portato ad ottenere un numero totale di 9933784 reads. Il successivo quality e chimera filtering ha condotto a un numero di 8236905 reads, con una media di 76268 per campione (Tabella 8).

L'indice medio di biodiversità Chao1, corrispondente al numero medio di OTUs presente nei vari campioni, è risultato significativamente diverso tra calcolotici (numero di OTUs 1460 ± 363) e controlli (numero di OTUs 1658 ± 297 , $p < 0.001$ aggiustata per età e sesso). Tale differenza, espressione di una minore biodiversità del microbiota fecale nei soggetti calcolotici, risulta evidente anche nella Figura 3, che mostra le curve di rarefazione medie all'aumentare della profondità del sequenziamento nei due gruppi di soggetti esaminati.

La minore biodiversità nel gruppo dei pazienti calcolotici si è confermata ($p = 0.046$) anche ad un'analisi corretta per i fattori clinico-laboratoristici urinari e nutrizionali diversi tra calcolotici e controlli (calcio urinario, fosforo urinario, ossalato urinario, volume urinario, intake di calcio).

Variabilità inter-individuale

Un'analisi di Principal Coordinate Analysis basata sulle matrici UniFrac ha permesso di valutare la variabilità inter-individuale della composizione globale del microbiota intestinale. I risultati di tale analisi sono rappresentati tridimensionalmente in Figura 4. Non è stato possibile identificare chiari cluster tipici dei calcolotici o dei controlli nella composizione del microbiota fecale, come ben evidenziato dalla distribuzione dei diversi colori nella Figura 4.

Analisi quali-quantitativa della composizione del microbiota

L'assegnazione delle OTUs a specifici taxa, a livello di genere e in alcuni casi anche a livello di specie, ha permesso di identificare la composizione specifica del microbiota intestinale campione

per campione, e di calcolare l'abbondanza relativa media della rappresentazione di ogni taxon. Il numero medio di taxa con un'abbondanza relativa media $> 0.001\%$ è stato di 112 nei calcolotici e 123 nei controlli. Una sintesi grafica della composizione del microbiota intestinale, campione per campione, è rappresentata nella Figura 5.

Abbondanza relativa di singoli taxa: confronto calcolotici vs controlli

Da un'analisi di covarianza, i cui risultati sono sintetizzati in Figura 6, è emerso che il microbiota fecale dei calcolotici presentava una maggiore abbondanza relativa di batteri appartenenti al phylum *Bacteroidetes* (+23.5%) e una minore abbondanza relativa di batteri appartenenti ai phyla *Firmicutes* (-30.9%) e *Tenericutes* (-238%) rispetto ai controlli non calcolotici. A livello di famiglia, i calcolotici hanno mostrato una minore rappresentazione di Enterococcaceae (-416%) rispetto ai controlli, risultando invece avere una maggiore rappresentazione di Bacteroidaceae e Promicromonosporaceae.

Tra i singoli generi e specie, quello risultato maggiormente depleto nei soggetti calcolotici è stato *Klebsiella* spp (-10882%), e in particolare la specie *Klebsiella variicola* (-1300%). Come emerge dalla Figura 6, numerosi altri taxa sono risultati meno rappresentati nel microbiota fecale dei soggetti calcolotici rispetto ai controlli; tra questi si segnalano *Enterococcus faecalis* (-2203%), *Bifidobacterium breve* (-1800%), *Citrobacter koseri* (-621%) e *Oribacterium parvum* (-173%). Di converso, il microbiota fecale dei soggetti calcolotici è risultato essere più ricco, rispetto ai controlli, di taxa come *Bacteroides uniformis* (+43%), *Acidaminococcus intestini* (+93%) e *Cellulosimicrobium cellulans*. Quest'ultima specie è risultata presente nel 15% dei campioni fecali dei calcolotici, mentre è risultata completamente assente nei campioni dei controlli.

L'abbondanza relativa media dei principali taxa identificati è stata quindi confrontata, tra calcolotici e controlli, con modelli di analisi della varianza aggiustati per età e sesso (modello 1) e per età, sesso, calciuria, fosfaturia, ossaluria, volume urinario, intake di calcio (modello 2). Le covariate selezionate per il modello 2 sono state scelte sulla base dei parametri significativamente diversi tra

calcolotici e controlli elencati in Tabella 7. I risultati di tali analisi sono riportati nella Tabella 9.

Al modello 1, aggiustato per età e sesso, 4 taxa sono risultati significativamente più rappresentati nei calcolotici (*Acidaminococcus*, *Bacteroides*, *Cellulosimicrobium* e *Sutterella*). La significatività della differenza si è confermata al modello 2 solamente per *Acidaminococcus* (0.92 ± 0.2 vs $0.12 \pm 0.3\%$, $p=0.05$) e *Bacteroides* (37.0 ± 19.7 vs $25.2 \pm 17.0\%$, $p=0.01$).

Viceversa, al modello 1 ben 29 taxa sono risultati significativamente meno rappresentati nei calcolotici rispetto ai controlli (Tabella 9). Solamente per 6 di essi la significatività si è confermata al modello 2 fully-adjusted: *Actinomyces* (0.002 ± 0.003 vs 0.004 ± 0.004 , $p=0.05$), *Dorea* (0.1 ± 0.1 vs $0.5 \pm 0.7\%$, $p=0.009$), *Enterobacter* (0.005 ± 0.001 vs $0.010 \pm 0.003\%$, $p=0.008$), *Faecalibacterium* (2.4 ± 2.8 vs $5.6 \pm 4.5\%$, $p=0.046$), *Howardella* (0.002 ± 0.007 vs $0.025 \pm 0.007\%$, $p=0.004$) e *Succinivibrio* (0.002 ± 0.001 vs $0.03 \pm 0.01\%$, $p=0.05$).

Focus sui batteri degradanti l'ossalato

E' stata confrontata, tra calcolotici e controlli, anche l'abbondanza relativa media dei batteri che esibiscono potenziale capacità di degradazione dell'ossalato, elencati in Tabella 6. Per nessuno di questi batteri, compreso il ben noto *Oxalobacter formigenes*, è stata riscontrata una differenza significativa tra i due gruppi. L'unica eccezione è rappresentata da *Enterococcus faecalis* che, ad un'analisi di covarianza non aggiustata per possibili fattori di confondimento (Figura 6), è risultato essere più rappresentato nei controlli rispetto ai calcolotici. Tuttavia, questa differenza non si è mostrata come statisticamente significativa ai modelli di analisi della varianza aggiustati per età, sesso ed altri possibili fattori di confondimento (Tabella 9).

Tuttavia, considerando calcolotici e controlli nel loro insieme, l'abbondanza relativa di ben 13 taxa, elencati in Tabella 10, è risultata significativamente correlata all'escrezione urinaria di ossalato nei 100 soggetti arruolati nello studio.

Analisi funzionale del microbiota in calcolotici e controlli: shotgun metagenomics

Su 10 campioni di feci selezionati casualmente (5 di soggetti calcolotici e 5 di controlli non calcolotici) è stata effettuata un'analisi funzionale del microbiota per valutare la rappresentazione dei geni batterici correlati alle principali vie metaboliche, con particolare attenzione verso le vie metaboliche coinvolte nella degradazione dell'ossalato.

Dalla shotgun metagenomics è stato ottenuto un totale di 55140894 reads filtrate, con un range compreso tra 2875020 e 7506701 per campione. La Tabella 11 riporta i dati di filtraggio delle reads. La classificazione funzionale dei geni batterici realizzata secondo il Cluster of Orthologous Genes (COG) ha evidenziato, tra i 5 calcolotici e i 5 controlli, una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0.05$) nell'espressione di 7 classi geniche funzionali COG. Tali differenze sono rappresentate nella Figura 7. In particolare, rispetto ai controlli, i calcolotici hanno mostrato una minor rappresentazione di geni batterici correlati alla trascrizione, alla replicazione, ricombinazione e riparo del DNA, e al controllo del ciclo cellulare. Viceversa, essi hanno mostrato una maggior rappresentazione di geni batterici correlati ai meccanismi di difesa, alla biogenesi della membrana e parete cellulare, al metabolismo e trasporto dei carboidrati e al metabolismo e trasporto degli ioni inorganici.

E' stata poi ricercata l'espressione di geni correlati al metabolismo dell'ossalato, in particolare la formil-CoA transferasi e l'ossalil-CoA decarbossilasi. I risultati di tale analisi, sintetizzati in Figura 8, hanno mostrato come i calcolotici abbiano una minor rappresentazione di questi geni nel loro microbiota fecale rispetto ai controlli (0.0021% del patrimonio genico batterico totale vs 0.0041%, $p < 0.01$ calcolata con ANOVA).

L'analisi di covarianza di Pearson ha poi mostrato che, nei 10 campioni analizzati tramite shotgun metagenomics sequencing, esiste una correlazione inversa tra l'espressione nel microbiota intestinale di formil-CoA transferasi e ossalil-CoA decarbossilasi e i livelli urinari di ossalato ($r = -0.87$, $p < 0.01$).

Grazie a uno script bioinformatico personalizzato, è stato poi possibile identificare, a livello

tassonomico, quali componenti del microbiota esprimevano i geni con capacità di degradazione dell'ossalato. I risultati sono raffigurati in Figura 10 e Figura 11. La maggiore espressione di tali geni è stata evidenziata a carico di alcuni Archaea e a carico di alcuni batteri, sia con attività ossalato-degradante precedentemente segnalata in letteratura (*Oxalobacter formigenes*) che con attività ossalato-degradante non conosciuta (*Escherichia coli*, *Eggerthella* spp, *Roseburia hominis*, *Bacteroides massiliensis*, *Clostridium citroniae*). Complessivamente, l'abbondanza relativa media dei taxa con espressione di geni ossalato-degradanti elencati in Figura 11 è risultata significativamente maggiore nei soggetti non calcolotici rispetto ai calcolotici ($p < 0.01$ con ANOVA), con una differenza dell'86%. Infine, il numero di taxa degradanti l'ossalato rappresentati in ciascuno dei 10 campioni sottoposti a deep shotgun metagenomics sequencing è risultato significativamente correlato in modo negativo all'escrezione urinaria di ossalato ($r = -0.85$, $p < 0.05$).

DISCUSSIONE

Questa tesi dimostra, per la prima volta nella letteratura internazionale, che la composizione globale del microbiota intestinale influenza la fisiopatologia della calcolosi renale calcica idiopatica in modo molto più marcato di singoli players microbici, per quanto importanti e studiati, come *Oxalobacter formigenes*. Infatti, dallo studio è emerso che:

- i soggetti calcolotici hanno, rispetto ai non calcolotici, un certo grado di disbiosi intestinale, con minore biodiversità e ridotta rappresentazione di numerosi taxa. Questo avviene nonostante che, a livello di variabilità inter-individuale, non sia possibile identificare specifici cluster di microbiota calcolosi-specifici;
- il microbiota fecale dei calcolotici ha un profilo di rappresentazione genica diverso rispetto a quello dei controlli non calcolotici, con una minore presenza di geni codificanti per enzimi di degradazione dell'ossalato;
- l'abbondanza relativa di alcuni taxa, che esprimono geni codificanti enzimi utili nella degradazione dell'ossalato, correla in modo negativo con l'escrezione urinaria di ossalato sia nei calcolotici che nei controlli;
- i taxa che esprimono tali geni sono diversi da quelli noti nella letteratura internazionale come ossalato-degradanti [194];
- le differenze nella composizione del microbiota intestinale tra calcolotici e controlli sono in larga parte indipendenti dal profilo metabolico urinario e dall'anamnesi nutrizionale.

Nell'unico studio metagenomico di confronto del microbiota intestinale tra calcolotici e controlli presente nella letteratura scientifica, pubblicato da Stern e colleghi nel 2016 [195], non è emersa la presenza di disbiosi intestinale nei campioni dei calcolotici. Tuttavia, alcuni risultati di questo studio, come la maggiore rappresentazione di batteri del genere *Bacteroides* nel microbiota intestinale dei calcolotici, sono in linea con quanto esposto in questa tesi. Lo studio di Stern era

però gravato da importanti limiti metodologici, tra cui la presenza di soggetti con calcolosi non calcica nel gruppo dei calcolotici, la bassa numerosità del gruppo dei controlli, e la relativamente scarsa accuratezza dell'analisi tassonomica sui campioni fecali.

La disbiosi intestinale è stata correlata a numerose patologie [1, 4], al punto da rappresentare, in alcuni casi, un marcatore aspecifico di malattia. Tuttavia, la presenza di disbiosi nel microbiota fecale dei calcolotici rafforza l'idea che sia presente un “gut-kidney axis” che, grazie a specifici mediatori prodotti dal microbiota e all'interazione tra microbiota e sistema immunitario, sia in grado di influenzare la manipolazione renale delle sostanze coinvolte nella litogenesi [133].

E' interessante notare come tra i batteri significativamente depleti nel microbiota fecale dei calcolotici rispetto ai controlli siano presenti generi come *Faecalibacterium* e *Succinivibrio*. Questi taxa sono infatti in grado di produrre mediatori come gli acidi grassi a catena corta (SCFA), che, una volta assorbiti dalla mucosa intestinale, possono influenzare notevolmente la fisiologia e il metabolismo di numerosi organi, tra cui il rene. Essi infatti contribuiscono a neutralizzare l'effetto pro-infiammatorio delle endotossine batteriche, a modulare il sistema immunitario e l'attivazione della risposta infiammatoria. Tutti questi effetti, a livello renale, si traducono in una riduzione del danno tubulo-interstiziale e quindi in una protezione nei confronti dell'acute kidney injury e della progressione dell'insufficienza renale cronica. Numerosi studi condotti su modelli murini hanno verificato come questi mediatori possano proteggere nei confronti della nefrotossicità da aminoglicosidi o da mezzi di contrasto iodati e nei confronti del danno da ischemia-riperfusion [206].

Anche se la calcolosi renale non è tradizionalmente considerata una patologia infiammatoria, esistono dati che indicano come, a livello tissutale nell'interstizio renale, fenomeni infiammatori possano essere coinvolti nella formazione delle placche di Randall, che rappresentano in molti casi il primo stadio nella formazione dei calcoli di calcio ossalato [207]. In questi processi, l'infiammazione potrebbe essere stimolata da un eccesso di specie reattive dell'ossigeno, come ipotizzabile sulla base dei dati provenienti da alcuni studi epidemiologici che hanno dimostrato una

carenza di antiossidanti nei pazienti calcolotici [208], e dal riscontro, all'interno della matrice dei calcoli renali, di proteine e mediatori coinvolti nella risposta infiammatoria [209]. La carenza nel microbiota intestinale di taxa produttori di SCFA potrebbe quindi accelerare questi processi e facilitare la formazione dei calcoli renali calcici.

In effetti, la carenza di *Faecalibacterium* e la sovraespressione di *Bacteroides*, entrambe caratteristiche rilevate nel microbiota intestinale dei calcolotici, sono state recentemente identificate come tratti distintivi della composizione del microbiota intestinale dei pazienti con insufficienza renale cronica [210], condizione per cui, secondo i risultati di una recente revisione sistematica della letteratura, la calcolosi renale rappresenta un importante fattore di rischio [211]. E' quindi possibile ipotizzare che il microbiota intestinale funga da "mediatore" del rischio di peggioramento della funzionalità renale nel paziente con calcolosi calcica.

I risultati di questa tesi inoltre ridimensionano fortemente il ruolo di *Oxalobacter formigenes* nella fisiopatologia della calcolosi renale. Se da un lato esso è il batterio con la maggiore efficacia nella capacità di degradazione dell'ossalato, dall'altro esso è presente solamente in un alcuni soggetti e con abbondanze relative medie molto basse. Pertanto, il suo effetto sul metabolismo intestinale dell'ossalato e sul suo assorbimento sistemico sembrerebbe essere poco rilevante, come peraltro suggerito da alcuni degli studi più recenti della letteratura internazionale sull'argomento [170, 173, 187]. I risultati ottenuti tuttavia danno grande importanza ad altri batteri con capacità di degradazione dell'ossalato, sia già noti in letteratura come *Enterococcus* e *Bifidobacterium* [194, 212], che precedentemente non noti, come la maggior parte di quelli elencati in Tabella 10 e in Figura 10. In effetti, i risultati ottenuti potrebbero contribuire a riscrivere e aggiornare la lista di batteri con capacità di degradazione dell'ossalato. Infatti, vi sono dati provenienti da analisi microbiologiche ambientali che consentono di ipotizzare che l'espressione dei geni codificanti per enzimi coinvolti della degradazione dell'ossalato sia molto diffusa a livello batterico, ed identificabile solamente con le tecniche di deep shotgun metagenomics sequencing utilizzate nello studio qui presentato [213].

La forte correlazione negativa, dimostrata sia nei calcolotici che nei controlli, tra abbondanza relativa media di batteri esprimanti geni coinvolti nel metabolismo dell'ossalato ed escrezione urinaria di ossalato, porta ad ipotizzare che il microbiota intestinale, nel suo complesso, sia in grado di influenzare fortemente il metabolismo dell'ossalato e quindi la formazione dei calcoli renali calcici, considerando che l'ossalato urinario rappresenta uno dei principali fattori prolitogeni.

E' inoltre interessante notare che questa relazione è in larga parte indipendente dalla dieta. Infatti, i calcolotici non hanno mostrato abitudini alimentari significativamente diverse rispetto ai controlli, se non per quanto riguarda l'intake di calcio. Questo dato è in parte in linea con quanto già evidenziato in letteratura in studi caso-controllo [214], e con grandi studi epidemiologici statunitensi, che hanno mostrato come un basso introito dietetico di calcio rappresenti uno dei principali fattori di rischio per calcolosi renale, sia nei maschi che nelle femmine [215-216], e che l'intake dietetico di ossalato non influenza il rischio di calcolosi [137-138].

Pertanto, la diversa composizione del microbiota fecale dei calcolotici rispetto ai controlli potrebbe dipendere solo in minima parte dalla dieta. I dati in nostro possesso non consentono di trarre delle conclusioni sulle cause di questa diversa composizione del microbiota. Anche se nei due gruppi studiati la prevalenza di infezioni delle vie urinarie ricorrenti era simile, è comunque possibile ipotizzare che la diversa composizione del microbiota nei calcolotici derivi da una maggiore esposizione a trattamenti antibiotici nel corso della vita, in grado quindi di dare una "forma" particolare al microbiota. In alternativa, tale diversa composizione potrebbe dipendere da eventi occorsi durante le prime fasi della vita, come la modalità del parto, la tipologia di allattamento, la tempistica e le modalità del svezzamento, le abitudini di vita acquisite. Infatti, come ribadito nella parte introduttiva di questa tesi, gli eventi della prima infanzia hanno una grande importanza nel modulare la composizione del microbiota intestinale, che successivamente si manterrà nell'età adulta.

Lo studio illustrato in questa tesi ha sicuramente alcuni limiti. Tra questi, la sua natura osservazionale, l'assenza di un follow-up, la mancanza di dati sulla composizione corporea possono

avere influenzato i risultati. Inoltre, le indagini nutrizionali effettuate, per quanto condotte da personale addestrato con uno strumento (questionario EPIC) validato nella popolazione italiana, potrebbero non riflettere fedelmente le abitudini alimentari e lo stile di vita dei partecipanti. Anche gli esami di laboratorio urinari, in quanto effettuati dopo una prima visita presso il Centro Calcolosi Renale dell'Ospedale di Parma, potrebbero essere stati influenzati dall'effetto Hawthorne, per cui i partecipanti, specialmente calcolotici, potrebbero avere modificato le proprie abitudini alimentari inconsapevolmente a causa della necessità di effettuare l'esame. In quest'ottica si può spiegare il riscontro di un volume urinario significativamente maggiore nei soggetti calcolotici rispetto ai controlli, dato che contrasta con quanto ormai consolidato in letteratura [124].

Infine, dal punto di vista delle analisi sul microbiota fecale, occorre considerare il fatto che il shotgun metagenomics sequencing consente solamente di rilevare la presenza di determinati geni all'interno del genoma batterico, ma non dà informazioni sulla loro effettiva espressione. Pertanto, l'effettiva capacità di degradazione dell'ossalato dei vari batteri esprimenti i geni per formil-CoA transferasi e ossalil-CoA decarbossilasi è stata solamente supposta e non misurata.

Nonostante ciò, i risultati di questo studio potrebbero aprire nuovi scenari nella comprensione della fisiopatologia della calcolosi renale calcica, enfatizzando il ruolo del microbiota intestinale. Potrebbero inoltre stimolare nuovi studi sugli effetti metabolici e clinici della manipolazione del microbiota intestinale, tramite probiotici, nei soggetti con calcolosi renale calcica.

CONCLUSIONI

Rispetto a un gruppo di controlli non calcolotici, pazienti affetti da calcolosi calcica idiopatica hanno presentato una maggiore disbiosi a livello del microbiota fecale, con minore espressione di batteri che coinvolti nella degradazione dell'ossalato, in modo indipendente da parametri metabolici urinari e nutrizionali. Il microbiota intestinale potrebbe quindi essere implicato nella fisiopatologia della calcolosi renale in modo più complesso rispetto alla semplice azione ossalato-degradante del solo *Oxalobacter formigenes*. Sono necessari ulteriori studi per chiarire il funzionamento del cosiddetto “gut-kidney axis” e per identificare gli effetti clinici e metabolici della somministrazione di probiotici nei soggetti con calcolosi calcica idiopatica.

TABELLE

E

FIGURE

TABELLA 1

Fattori fisiologici e patologici che influenzano la composizione del microbiota intestinale dell'adulto.

FATTORE COINVOLTO	COMMENTO
Fattori fisiologici	
Abitudini alimentari	– Influenza sull'enterotipo – Influenza sulla diversità microbica – Influenza sull'abbondanza relativa di alcuni <i>taxa</i> con substrati metabolici particolari (es. cere, fibre) o sensibili alle diverse concentrazioni di acidi biliari
Provenienza geografica	– Influenza mediata da abitudini alimentari, metodi di conservazione del cibo, esposizione agli animali, igiene domestica
Esercizio fisico	– Determina un aumento della diversità microbica e della concentrazione di batteri <i>health-promoting</i>
Tipo di parto e di allattamento ed età del divezzamento	– Possono influenzare la composizione globale del microbiota nell'età infantile lasciando un <i>fingerprint</i> anche nell'età adulta
Presenza di conviventi e di animali domestici	– Nel lungo periodo il microbiota delle persone o animali che vivono a stretto contatto tende ad assomigliarsi nella composizione globale
Fattori genetici	– La presenza di alcuni <i>taxa</i> dipende dalle tipologie di recettori espresse dalle cellule epiteliali della mucosa
Ambiente di vita (casa vs istituto)	– Riduzione della complessità microbica con alta variabilità inter-individuale nei soggetti istituzionalizzati
Età	– Il microbiota è stabile nell'età adulta fino ai 65-70 anni – In seguito si verifica un aumento della variabilità inter-individuale con ridotto numero di specie e tendenza alla disbiosi
Fattori patologici	
Esposizione diretta (terapia) o indiretta (contaminazione ambientale) agli antibiotici	– E' causa di disbiosi con profonde alterazioni nella composizione del microbiota che non necessariamente si associano a calo del numero di batteri – La disbiosi dipende dal tipo di antibiotico assunto, dalla dose e dalla durata della terapia
Terapie farmacologiche croniche	– Le maggiori evidenze si hanno per la chemioterapia antitumorale
Alterazioni immunologiche locali e sistemiche	– L'immunosoppressione favorisce la crescita di ceppi patogeni

TABELLA 2

Composizione del microbiota intestinale umano nelle principali patologie acute e croniche sinora studiate in letteratura: overview.

PATOLOGIA	PRINCIPALI ALTERAZIONI
Malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD)	– Riduzione diversità microbica – Calo dei <i>Firmicutes</i> e aumento dei <i>Bacteroidetes</i> – Calo di <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> – Incremento delle <i>Enterobacteriaceae</i>
Malattia celiaca	– Aumento della diversità microbica – Espansione di <i>Bacteroides</i>, <i>Prevotella</i>, <i>Clostridium</i>, <i>Staphylococcus</i> – Calo di bifidobatteri e lattobacilli
Enterocolite da <i>Clostridium difficile</i>	– Severa disbiosi con riduzione della diversità microbica – Riduzione di produttori di acidi grassi a catena corta e clostridi non patogeni – Incremento delle <i>Enterobacteriaceae</i>
Neoplasie intestinali	– Espansione di <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Bacteroides fragilis</i> e <i>Streptococcus gallolyticus</i> – Deplezione di batteri produttori di acido butirrico
Steatoepatite non alcolica	– Incremento di <i>Ruminococcus</i>, <i>Shigella</i> e <i>Campylobacter</i> e batteri produttori di acetato – Deplezione di batteri produttori di acido butirrico
Epatopatia alcolica	– Estrema disbiosi con riduzione della diversità microbica, deplezione dei <i>Bacteroidetes</i> ed espansione delle <i>Enterobacteriaceae</i>
Cirrosi epatica non alcolica	– Estrema disbiosi con riduzione della diversità microbica, deplezione dei <i>Bacteroidetes</i> ed espansione delle <i>Enterobacteriaceae</i> – Colonizzazione intestinale da parte di batteri presenti nel microbiota della cavità orale
Obesità	– Aumento dei <i>Firmicutes</i> e calo dei <i>Bacteroidetes</i> – Deplezione di batteri produttori di acido butirrico – Deplezione di <i>Akkermansia muciniphila</i>
Diabete mellito di tipo 2 e sindrome metabolica	– L'abbondanza relativa di <i>Faecalibacterium</i>, <i>Anaerotruncus</i>, <i>Butyrivibrio</i> e <i>Akkermansia</i> è significativamente associata all'insulino-sensibilità
Infezioni extraintestinali	– Calo della diversità microbica – Espansione delle <i>Enterobacteriaceae</i> e di altri germi patogeni opportunisti
Lupus eritematoso sistemico	– Calo dei <i>Firmicutes</i> e incremento dei <i>Bacteroidetes</i> con maggiore rappresentazione di geni correlati al metabolismo dei glucani e alla fosforilazione ossidativa

(continua)

PATOLOGIA	PRINCIPALI ALTERAZIONI
	(segue)
Allergie alimentari	– Ridotta rappresentazione del genere <i>Clostridium</i>
Asma atopico	– Ridotta rappresentazione di batteri produttori di acidi grassi a catena corta (in particolare <i>Faecalibacterium</i> e <i>Anaerotruncus</i>) – Alterazioni della composizione del microbiota delle vie aeree
Sarcopenia dell’anziano	– Ridotta rappresentazione di batteri con attività anti-infiammatoria e produttori di sostanze anti-cataboliche, come <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (meccanismo supposto)
Malattia di Parkinson	– Ridotta rappresentazione delle <i>Prevotellaceae</i> e maggiore rappresentazione delle <i>Lactobacillaceae</i> – Ridotta rappresentazione delle <i>Enterobacteriaceae</i> nei soggetti con fenotipo tremorigeno
Sclerosi multipla	– Maggiore rappresentazione di <i>Pseudomonas</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Blautia</i> – Deplezione di <i>Prevotella</i> , <i>Parabacteroides</i> e <i>Adlerkreutzia</i>
Depressione maggiore	– Deplezione di <i>Bacteroides</i> ed espansione degli <i>Actinobacteria</i> con cluster tipici e riconoscibili rispetto ai soggetti sani
Insufficienza renale cronica	– Severa disbiosi negli stadi avanzati, con riduzione del numero di specie presenti – Espansione significativa dei patobionti, in particolare delle <i>Enterobacteriaceae</i> – Deplezione di batteri produttori di acidi grassi a catena corta, tra cui <i>Faecalibacterium</i> , <i>Butyrivibrio</i> e <i>Anaerotruncus</i>

TABELLA 3

Classificazione delle principali forme di calcolosi renale con le relative frequenze nella popolazione europea.

TIPOLOGIA DI CALCOLOSI	FREQUENZA ASSOLUTA
Calcolosi calcica idiopatica (con o senza ipercalciuria)	75%
Calcolosi da acido urico	5-6%
Calcolosi calcica secondaria (da iperparatiroidismo primario, patologie gastrointestinali, iperossaluria primitiva, malattie ossee associate a ipercalcemia)	3-4%
Calcolosi infetta (da germi produttori di ureasi)	3%
Calcolosi da anomalie anatomo-funzionali delle vie urinarie	3%
Cistinuria	1%
Xantinuria	Rarissima
Calcolosi da farmaci o tossici (es. indinavir, melamina, topiramato)	Rara
Calcolosi di origine indeterminata	8%

Dati tratti da Osther PJS. Epidemiology of kidney stones in the European Union. In: Talati JJ, Tiselius HG, Albala DM, Ye Z. Urolithiasis – Basic science and clinical practice. Springer, London 2012, pp. 3-12.

TABELLA 4

Sintesi dei principali studi osservazionali condotti sull'uomo sul rapporto tra calcolosi renale e colonizzazione intestinale da parte di *Oxalobacter formigenes*.

AUTORE, ANNO [REF.]	METODO MICRO- BIOLOGICO	SOGGETTI STUDIATI	RISULTATI OTTENUTI	NOTE
Sidhu H et al., 1998 [168]	Colturale + genomico (PCR) se esame colturale negativo	43 bambini con fibrosi cistica, 21 volontari sani coetanei	Prevalenza di colonizzazione 16% nei malati e 71% nei sani; presente iperossaluria nei malati non colonizzati	Tutti i soggetti non erano calcolotici.
Sidhu H et al. 1999 [167]	Coltura in mezzo ricco di ossalato + identificazione tramite PCR	51 calcolotici di calcio ossalato adulti, 44 volontari sani	Prevalenza di colonizzazione: 75% nei controlli, 80% nei calcolotici al primo episodio, 38% nei calcolotici con da 2 a 5 episodi, 13% nei calcolotici con >5 episodi	Diversa età tra calcolotici (media 49) e controlli (media 35), diversa provenienza geografica.
Kumar R, et al. 2004 [172]	Genomico (PCR)	37 pazienti con rettocolite ulcerosa, 11 con m. di Crohn, 87 calcolotici calcici, 48 controlli	Prevalenza di colonizzazione: 10% nei pazienti con IBD, 29% nei calcolotici, 56% nei controlli. L'ossaluria è risultata significativamente maggiore nei soggetti non colonizzati.	Questo studio ipotizza un ruolo di <i>Oxalobacter</i> nelle forme secondarie di calcolosi renale.
Kaufman DW, et al. 2008 [173]	Coltura in mezzo ricco di ossalato	247 calcolotici calcici, 259 controlli appaiati per età, sesso e provenienza	Prevalenza di colonizzazione: 17% nei calcolotici, 38% nei controlli. Nessuna relazione tra presenza di <i>Oxalobacter</i> e ossaluria.	Buon rigore metodologico; il limite principale è la metodica colturale di identificazione
Siener R, et al. 2013 [170]	Colturale + genomico (PCR)	37 calcolotici calcici	Prevalenza di colonizzazione: 30%. L'ossaluria è inferiore nei soggetti colonizzati solo sotto dieta controllata. L'assorbimento frazionale di ossalato non dipende dalla colonizzazione.	Unico studio che ha valutato il metabolismo dell'ossalato nel suo insieme con prove di assorbimento intestinale.

TABELLA 5

Sintesi dei principali studi di intervento con probiotici con attività di degradazione dell'ossalato, condotti sull'uomo al fine di verificare se la modulazione del microbiota intestinale può influire sul rischio litogeno.

AUTORE, ANNO [REF.]	PROBIOTICO	DISEGNO DI STUDIO (SOGETTI STUDIATI, FOLLOW-UP)	RISULTATI OTTENUTI	NOTE
Campieri C, et al. 2001 [182]	Lattobacilli (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>) + <i>Bifidobacterium infantis</i>	Prospettico di intervento (6 calcolotici calcici con iperossaluria, 4 settimane)	Calo dell'ossaluria in tutti i partecipanti (media 40%).	Prima dimostrazione dell'efficacia di un probiotico sul rischio litogeno.
Duncan SH, et al. 2002 [179]	<i>Oxalobacter formigenes</i> ceppo HC1 isolato da feci umane	Prospettico di intervento (2 volontari sani, 6 ore)	Calo dell'escrezione urinaria di ossalato dopo un carico dietetico.	Primo studio in cui è stato somministrato direttamente <i>Oxalobacter</i> .
Lieske JC, et al. 2005 [183]	Oxadrop® (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. infantis</i>)	Prospettico di intervento (10 calcolotici con malassorbimento intestinale, 1 mese)	Calo dell'escrezione urinaria di ossalato nel 70% dei partecipanti. Decremento medio del 19%.	Primo studio effettuato su soggetti con iperossaluria enterica (sindromi intestinali).
Goldfarb DS, et al. 2007 [186]	Oxadrop® (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. infantis</i>)	Trial randomizzato controllato (20 calcolotici calcici con iperossaluria, 4 settimane)	Nessuna variazione significativa dell'ossaluria dopo il trattamento.	Unico trial presente in letteratura su soggetti con calcolosi calcica idiopatica.
Okombo J, et al. 2010 [184]	VSL#3 (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>B. lactis</i>)	Prospettico di intervento (11 volontari non calcolotici, 4 settimane)	Calo dell'assorbimento frazionale di ossalato dopo un carico alimentare (dal 31% al 12%)	Non valutata l'ossaluria come outcome.
Hoppe B, et al. 2011 [180]	Oxabact® (<i>Oxalobacter formigenes</i>)	Trial randomizzato controllato (42 adolescenti con iperossaluria primitiva, 24 settimane)	Calo dell'ossaluria del 20% dimostrato sia nel gruppo di intervento che nel gruppo di controllo con placebo.	Studio condotto su soggetti con una patologia genetica rara (iperossaluria primitiva).

(continua)

(segue)

AUTORE, ANNO [REF.]	PROBIOTICO	DISEGNO DI STUDIO (SOGGETTI STUDIATI, FOLLOW-UP)	RISULTATI OTTENUTI	NOTE
Al-Wahsh I, et al. 2012 [185]	VSL#3 (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>B. lactis</i>)	Prospettico di intervento (11 volontari non calcolotici, 24 ore)	Calo dell'escrezione urinaria di ossalato dopo un carico alimentare della sostanza.	Studio condotto in condizioni sperimentali di laboratorio.
Siener R, et al. 2013 [187]	Oxadrop® (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. infantis</i>)	Prospettico cross- over (20 volontari non calcolotici sotto dieta ad alto contenuto di ossalato, 5 settimane)	Nessuna variazione significativa dell'ossaluria.	Ultimo studio con probiotici ossalato- degradanti.

TABELLA 6

Elenco delle principali specie batteriche ossalato-degradanti che si possono trovare nel microbiota umano. (Modificata da Miller SW & Dearing D. Pathogens 2013; 2: 636-652).

GENERE E SPECIE	SEDE DI ISOLAMENTO	SIGNIFICATO DEL PROCESSO DI DEGRADAZIONE	EFFICIENZA DI DEGRADAZIONE (SE NOTA)
<i>Oxalobacter formigenes</i>	Feci di mammiferi	Metabolismo energetico	Circa 100%
<i>Eggerthella lenta</i>	Feci umane	Sconosciuto	-
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Feci di roditori	Detossificazione	-
<i>Enterococcus faecium</i>	Feci di cane	Sconosciuto	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	Feci umane	Metabolismo energetico	-
<i>Providencia rettgeri</i>	Feci umane	Sconosciuto	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Probiotici	Detossificazione	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Feci di gatto	Detossificazione	40%
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Feci di roditori	Detossificazione	68%
<i>Lactobacillus casei</i>	Probiotici	Detossificazione	68%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Feci umane	Detossificazione	54%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Probiotici	Detossificazione	23%
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Saliva umana	Detossificazione	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Feci di roditori	Detossificazione	-
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Probiotici	Detossificazione	-
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Feci umane	Detossificazione	27%
<i>Clostridium sporogenes</i>	Feci di roditori	Detossificazione	-
<i>Leuconostoc lactis</i>	Feci di cane	Sconosciuto	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Feci di cane	Sconosciuto	-

TABELLA 7

Confronto delle caratteristiche generali, laboratoristiche urinarie e nutrizionali tra i calcolotici (n=52) e i controlli (n=48) arruolati nello studio.

	CALCOLOTICI (N=52)	CONTROLLI (N=48)	p*
Parametri generali			
Età, anni	48 ± 11	47 ± 13	0.41
BMI, kg/m ²	24.1 ± 5.6	25.7 ± 3.4	0.11
Esami urinari			
pH urinario	6.0 ± 0.4	5.8 ± 0.5	0.14
Volume urinario, L/24 h	2.1 ± 0.7	1.7 ± 0.7	0.006
Calcio urinario, mg/24 h	262 ± 111	169 ± 85	<0.001
Fosforo urinario, mg/24 h	1013 ± 332	1272 ± 472	0.006
Ossalato urinario, mg/24 h	29 ± 11	25 ± 8	0.049
Acido urico urinario, mg/24 h	544 ± 165	556 ± 178	0.31
Sodio urinario, mEq/24 h	176 ± 86	160 ± 71	0.21
Cloro urinario, mEq/24 h	176 ± 88	157 ± 72	0.47
Ammonio urinario, mmol/24 h	37 ± 12	35 ± 12	0.18
Magnesio urinario, mg/24 h	90 ± 25	96 ± 32	0.42
Potassio urinario, mEq/24 h	57 ± 18	59 ± 19	0.51
Citrato urinario, mg/24 h	602 ± 224	636 ± 278	0.36
Solfato urinario, mmol/24 h	21 ± 7	20 ± 7	0.47
Urea urinaria, g/24 h	23 ± 7	22 ± 6	0.43
Creatinina urinaria, mg/24 h	1522 ± 400	1383 ± 386	0.37
SS Ca Ox	5.4 ± 2.9	4.3 ± 2.7	0.09
SS CaP	0.86 ± 0.61	0.56 ± 0.47	0.03
SS Acido Urico	1.50 ± 1.39	2.76 ± 2.17	0.002
SS Struvite	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.93
Parametri nutrizionali			
Intake energetico, Kcal/die	2128 ± 464	2201 ± 754	0.83
Intake proteico, g/die	74.7 ± 18.8	82.3 ± 29.3	0.38
Intake glucidico, g/die	96.5 ± 30.2	111.4 ± 37.4	0.15
Intake lipidico, g/die	83.7 ± 20.6	89.7 ± 35.4	0.55
Intake di calcio, mg/die	712 ± 275	893 ± 374	0.05
Intake di sale, g/die	10.2 ± 2.3	8.6 ± 2.0	0.10

*p calcolata con il test di Mann-Whitney, corretta per età e sesso. I valori di p≤0.05 sono indicati in grassetto. BMI= Body Mass Index. SS= Sovrasaturazione urinaria. CaOx= Calcio ossalato. CaP = Calcio fosfato.

TABELLA 8

Tabella di filtraggio di qualità dei dati ottenuti mediante 16S rRNA microbial profiling sui 100 campioni analizzati (HS= controlli, SF= calcolotici)

ID campione	Numero di reads appaiate con qualità media >20	Sequenze umane	Lunghezza oltre i bounds di 100 e 400	Basi ambigue	Qualità media <25	Omopolimeri > 7	Primers mismatching >1	Primer inverso non trovato	Numero finale di reads
1_HS	58980	1	0	0	0	2	1514	64	57399
2_HS	120575	0	43679	0	8587	152	6552	9088	52517
3_HS	81351	0	7504	0	9455	300	4508	11992	47591
4_HS	87725	0	12789	0	9173	346	3685	8152	53580
5_HS	150672	0	30499	0	13722	36	11313	11276	83826
6_HS	100028	6	0	0	0	48	2139	50	97785
7_HS	85798	157	0	0	0	2	1751	41	83847
8_HS	69296	3	0	0	0	11	1760	63	67459
9_HS	177327	0	57774	0	46135	633	3864	52078	16843
10_HS	138026	6	0	0	0	2	2542	69	135407
11_HS	111401	4	0	0	0	1	2289	32	109075
12_HS	108856	2	0	0	0	6	2157	52	106639
13_HS	115783	26	0	0	0	2	2299	41	113415
14_HS	133384	4	0	0	0	2322	2559	47	128452
15_HS	66390	13	0	0	0	4	2546	52	63775
16_HS	50418	3	0	0	0	1	2135	39	48240
17_HS	60113	3	0	0	0	2	2400	40	57668
18_HS	65493	13	0	0	0	4	2905	33	62538
19_HS	54937	1	0	0	0	19	1432	55	53430
20_HS	64178	14	0	0	0	1	2405	42	61716
21_HS	65463	3	0	0	0	6	1715	48	63691
22_HS	57742	5	0	0	0	2	1457	39	56239
23_HS	60219	6	0	0	0	3	2407	52	57751
24_HS	84989	164	0	0	0	3	1727	29	83066

ID campione	Numero di reads appaiate con qualità media >20	Sequenze umane	Lunghezza oltre i bounds di 100 e 400	Basi ambigue	Qualità media <25	Omopolimeri > 7	Primers mismatching >1	Primer inverso non trovato	Numero finale di reads
25_HS	94479	15	0	0	0	1	2200	41	92222
26_HS	89896	2	0	0	0	4	1994	35	87861
27_HS	116568	0	0	0	0	12	2761	50	113745
28_HS	67921	2	0	0	0	5	1647	29	66238
29_HS	101736	2	0	0	0	5	2215	36	99478
30_HS	159246	2	0	0	0	4	3387	35	155818
31_HS	146427	19	0	0	0	108	3542	64	142694
32_HS	110500	2	0	0	0	4	3211	222	107061
33_HS	93532	0	0	0	0	1	2577	149	90805
34_HS	45521	8	0	0	0	1	1491	38	43983
35_HS	37279	2	0	0	0	5	1533	80	35659
36_HS	42952	8	0	0	0	4	1240	48	41652
37_HS	48925	0	0	0	0	7	1259	67	47592
38_HS	44414	0	0	0	0	3	1736	60	42615
39_HS	44232	0	0	0	0	0	1212	57	42963
40_HS	47784	2	0	0	0	2	1616	40	46124
41_HS	51868	2	0	0	0	1	1697	61	50107
42_HS	121046	0	33997	0	10584	40	7941	17624	50860
43_HS	109206	0	39688	0	30967	47	2369	17385	18750
44_HS	105252	0	22918	0	9224	30	8331	9769	54980
45_HS	158844	0	42552	0	14603	214	9876	16419	75180
46_HS	74905	0	22175	0	5168	13	4078	6549	36922
47_HS	125684	0	33406	0	10286	669	12185	8767	60371
48_HS	140967	0	36065	0	13989	738	13298	12937	63940
1_SF	62286	61	0	0	0	537	1471	23	60194
2_SF	57385	4	0	0	0	11	3729	17	53624

ID campione	Numero di reads appaiate con qualità media >20	Sequenze umane	Lunghezza oltre i bounds di 100 e 400	Basi ambigue	Qualità media <25	Omopolimeri > 7	Primers mismatching >1	Primer inverso non trovato	Numero finale di reads
3_SF	49127	2	0	0	0	1	1083	22	48019
4_SF	80748	0	0	0	0	4	4835	34	75875
5_SF	56626	11	0	0	0	4	1307	26	55278
6_SF	116334	0	0	0	0	9	6706	33	109586
7_SF	112177	0	0	0	0	5	5313	50	106809
8_SF	115018	1	0	0	0	11	6591	38	108377
9_SF	80639	1	0	0	0	0	1366	47	79225
10_SF	79549	0	0	0	0	1	1243	45	78260
11_SF	95398	274	0	0	0	2	2613	52	92457
12_SF	95416	26	0	0	0	0	3166	39	92185
13_SF	80064	0	0	0	0	0	1309	29	78726
14_SF	19344	1	0	0	0	0	373	10	18960
15_SF	96157	4	0	0	0	2	3278	36	92837
16_SF	135469	257	0	0	0	26	4863	85	130238
17_SF	130851	35	0	0	0	4	4986	72	125754
18_SF	155312	2	0	0	0	6	5370	78	149856
19_SF	157285	2	0	0	0	10	3149	91	154033
20_SF	53215	15	0	0	0	1	1010	24	52165
21_SF	148843	1	0	0	0	18	5340	106	143378
22_SF	72858	0	0	0	0	1	1295	72	71490
23_SF	141887	23	0	0	0	2	4393	81	137388
24_SF	161416	6	0	0	0	0	5624	132	155654
25_SF	46786	0	14239	0	6253	1047	2310	6933	16004
26_SF	40106	0	10426	0	4817	80	2442	7640	14701
27_SF	47690	0	10124	0	6796	161	2161	8720	19728
28_SF	99978	0	20712	0	14328	451	4774	11729	47984

ID campione	Numero di reads appaiate con qualità media >20	Sequenze umane	Lunghezza oltre i bounds di 100 e 400	Basi ambigue	Qualità media <25	Omopolimeri > 7	Primers mismatching >1	Primer inverso non trovato	Numero finale di reads
29_SF	33976	0	8797	0	4760	44	1720	6372	12283
30_SF	85148	248	0	0	0	9	1795	47	83049
31_SF	126617	0	16736	0	10603	62	10907	15530	72779
32_SF	98170	0	16561	0	9942	194	7124	16099	48250
33_SF	109842	0	27767	0	7453	15	6568	9142	58897
34_SF	112932	37	0	0	0	460	2350	65	110019
35_SF	106882	0	21174	0	9645	50	9395	17295	49322
36_SF	88941	0	33785	0	12197	146	2571	5707	34535
37_SF	130143	55	0	0	0	5	2567	68	127448
38_SF	93450	0	0	0	0	4	1776	42	91628
39_SF	117462	6	0	0	0	8	2372	75	115001
40_SF	104115	5	0	0	0	4	2107	39	101960
41_SF	102834	165	0	0	0	4	2034	43	100588
42_SF	89470	3	0	0	0	2	1522	44	87899
43_SF	132296	0	74356	0	19032	569	2606	23645	12088
44_SF	127629	13	0	0	0	2	2504	61	125049
45_SF	108026	0	43007	0	22537	279	4561	26225	11417
46_SF	92896	4	0	0	0	113	1763	37	90979
47_SF	82036	3	0	0	0	2	1752	30	80249
48_SF	107713	0	0	0	0	7	2082	53	105571
49_SF	63697	25	0	0	0	10	2599	52	61011
50_SF	57453	850	0	0	0	3	1396	42	55162
51_SF	60761	17	0	0	0	1	1446	29	59268
52_SF	94360	2	0	0	0	3	2345	197	91813

TABELLA 9

Elenco dei taxa la cui abbondanza relativa nel microbiota fecale è risultata in media significativamente diversa tra calcolotici e controlli a modelli di analisi della varianza aggiustati per età e sesso (modello 1) e per altre variabili cliniche (modello 2). Il segno + indica maggiore abbondanza nei calcolotici, il segno – indica maggiore abbondanza nei controlli.

<i>Taxa</i>	Modello 1		Modello 2	
	Rappresentazione in calcolotici (n=52) vs controlli (n=48)	p*	Rappresentazione e in calcolotici (n=52) vs controlli (n=48)	p**
<i>Acidaminococcus</i>	+	0.008	+	0.05
<i>Actinomyces</i>	-	0.02	-	0.05
<i>Allisonella</i>	-	0.04		ns
<i>Bacteroides</i>	+	0.005	+	0.01
<i>Cellulosimicrobium</i>	+	0.05		ns
Christensenellaceae R-7 group	-	0.03		ns
<i>Coprococcus</i>	-	0.04		ns
<i>Dorea</i>	-	0.007	-	0.009
<i>Enterobacter</i>	-	0.02	-	0.008
<i>Enterohabdus</i>	-	0.02		ns
<i>Faecalibacterium</i>	-	0.002	-	0.046
Family XIII VCG-001	-	0.001		ns
<i>Fusicatenibacter</i>	-	0.05		ns
<i>Howardella</i>	-	0.01	-	0.04
<i>Klebsiella</i>	-	0.04		ns
Lachnospiraceae VCG-010	-	0.004		ns
Lachnospiraceae ND3007 group	-	0.006		ns
Lachnospiraceae NK4A136	-	0.04		ns
<i>Oribacterium</i>	-	0.02		ns
<i>Parabacteroides</i>	-	0.01		ns
<i>Propionibacterium</i>	-	0.04		ns
<i>Rothia</i>	-	0.01		ns
<i>Ruminiclostridium</i>	-	0.008		ns
Ruminococcaceae VCG-002	-	0.04		ns
Ruminococcaceae VCG-003	-	0.03		ns
Ruminococcaceae VCG-008	-	0.02		ns
Ruminococcaceae VCG-013	-	0.03		ns
Ruminococcaceae NK4A214 gr.	-	0.03		ns
<i>Slackia</i>	-	0.05		ns
<i>Streptococcus</i>	-	0.05		ns
<i>Succinivibrio</i>	-	0.05	-	0.05
<i>Sutterella</i>	+	0.02		ns
<i>Veillonella</i>	-	0.01		ns

*Aggiustata per età e sesso. **Aggiustata per età, sesso, calciuria, fosfaturia, ossaluria, volume urinario, intake di calcio.

TABELLA 10

Taxa batterici la cui abbondanza relativa nel microbiota fecale dei 100 soggetti arruolati nello studio (52 calcolotici e 48 controlli) è risultata essere significativamente correlata all'escrezione urinaria di ossalato ad un'analisi di correlazione di Pearson.

Taxa	Paerson covariance p-value	Paerson covariance
<i>Defluviitaleaceae</i> UCG-011	0.006	-0.272
<i>Ruminiclostridium</i> 5	0.008	-0.263
<i>Streptococcus</i>	0.018	-0.237
U. m. of <i>Peptococcaceae</i> family	0.021	-0.231
U. m. of <i>Ruminococcaceae</i> family	0.023	-0.227
<i>Catabacter</i>	0.027	-0.222
<i>Gordonibacter</i>	0.033	-0.213
<i>Butyricimonas</i>	0.040	-0.206
U. m. of <i>Erysipelotrichaceae</i> family	0.043	-0.203
<i>Anaerofilum</i>	0.049	-0.197
<i>Lachnospira</i>	0.048	0.199
<i>Sutterella</i>	0.021	0.23
<i>Peptococcus</i>	0.010	0.256

TABELLA 11

Tabella di filtraggio di qualità dei dati ottenuti mediante deep shotgun metagenomics sequencing su 10 campioni (5 HS= controlli, 5 SF= calcolotici).

Codice campione	Numero di reads appaiate con qualità media >20	Numero finale di reads
2_SF	5597956	5592780
3_SF	5989836	5983008
2_HS	5393956	5382963
21_SF	5160104	5094876
26_HS	7559319	7506701
31_SF	2921690	2875020
30_HS	6326494	6291398
31_HS	5660179	5624564
32_HS	5866910	5827769
52_SF	4962978	4961815

FIGURA 1

Esempio di profilo di rischio litogeno urinario. Paziente maschio con iperossaluria idiopatica ed ipocitraturia. In questo caso il rischio litogeno, espresso dai valori delle sovrasaturazioni urinarie, è mantenuto basso per la presenza di un elevato volume di diuresi.



FIGURA 2

Esempio di profilo di rischio litogeno urinario. Paziente femmina con ipercalciuria associata ad ipersodiuria e dunque di verosimile origine dietetica (eccesso di sale nella dieta). La presenza di un basso volume urinario determina, in queste condizioni, un elevato rischio litogeno, come espresso dalle sovrasaturazioni per ossalato di calcio e fosfato di calcio.

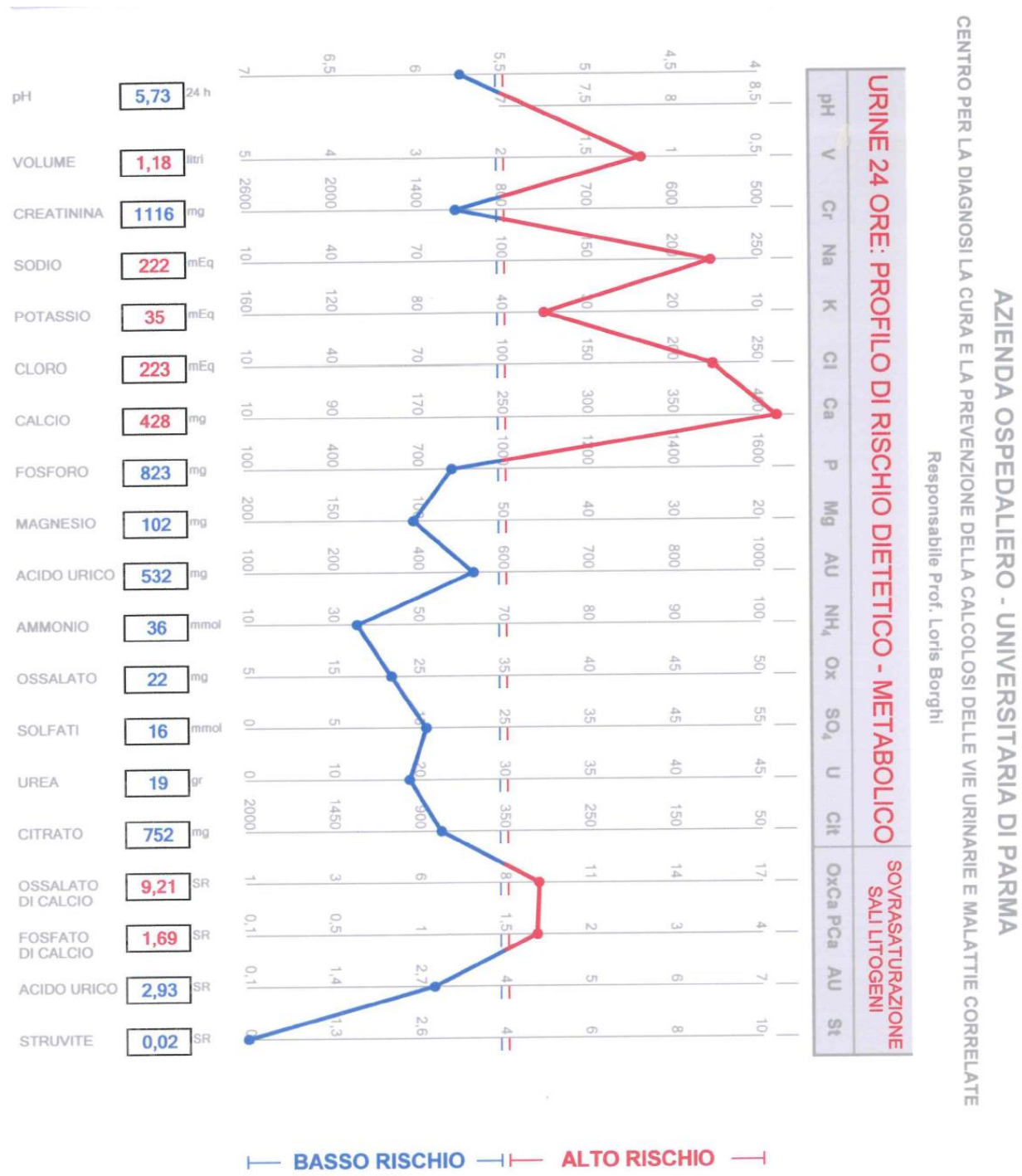


FIGURA 3

Confronto dell'alfa-diversità (biodiversità) batterica fecale media tra calcolotici (SF, n=52, in arancione) e controlli (HS, n=48, in blu). Il punto a) rappresenta le curve di rarefazione medie dell'indice Chao1 all'aumentare della profondità del sequenziamento, mentre il punto b) raffigura graficamente il confronto delle medie degli indici Chao1 tra controlli (blu) e calcolotici (arancione).

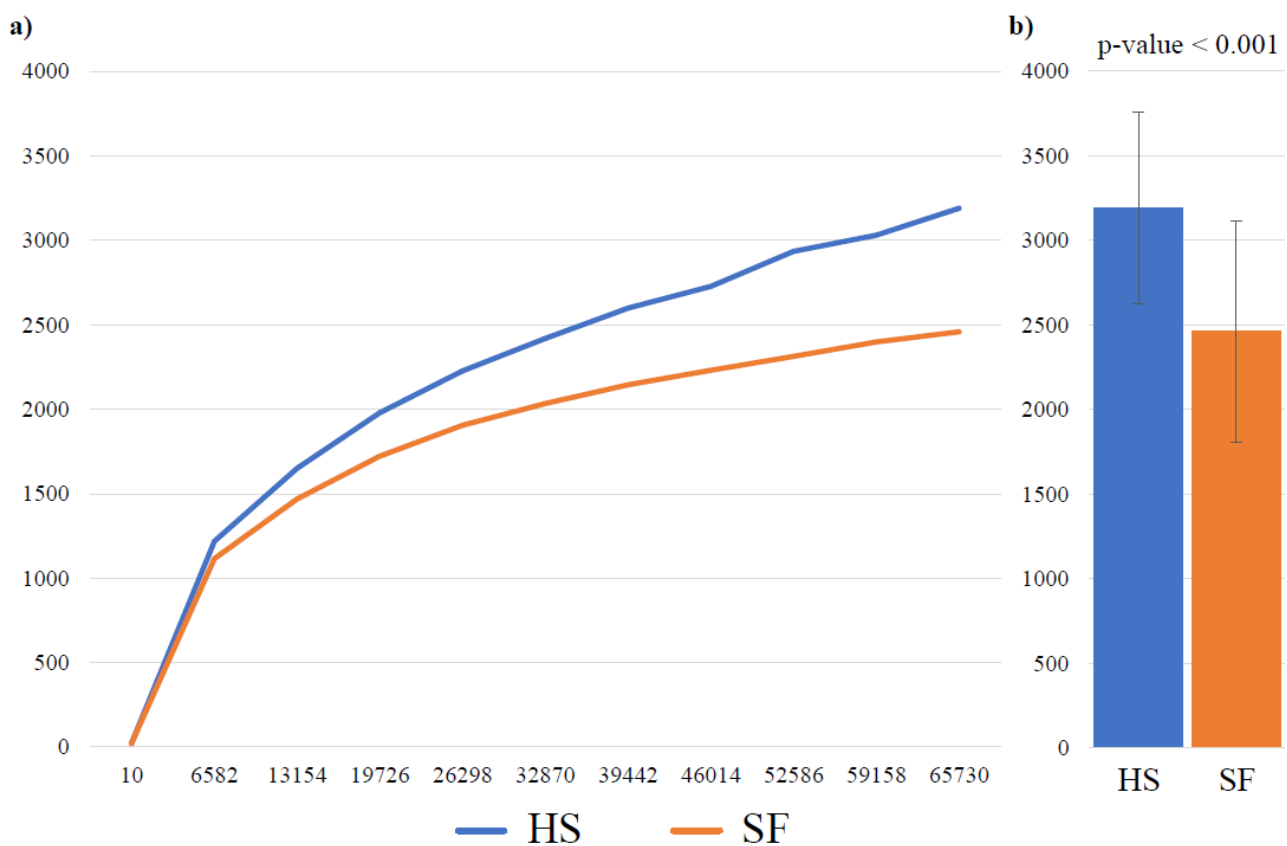


FIGURA 4

Analisi di beta-diversità, o variabilità inter-individuale, del microbiota fecale nei 100 campioni considerati (52 calcolotici, SF, raffigurati in rosso, e 48 controlli, HS, raffigurati in blu). L'analisi è stata condotta mediante Principal Coordinate Analysis basata sulle matrici UniFrac. Ogni punto, rappresentato su assi cartesiani tridimensionali, rappresenta un campione fecale e una specifica tipologia globale di composizione del microbiota.

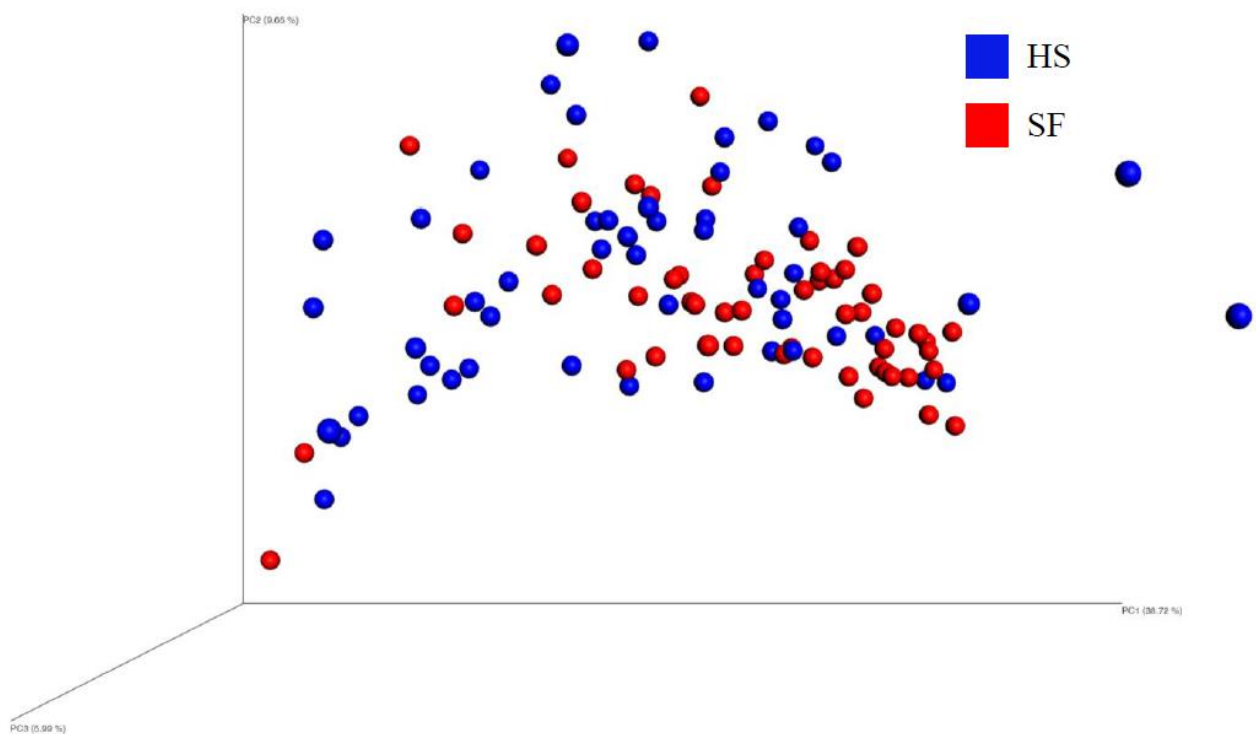


FIGURA 5

Sintesi grafica della composizione del microbiota fecale a livello di genere, campione per campione, nei 52 calcolotici e 48 controlli considerati nello studio.

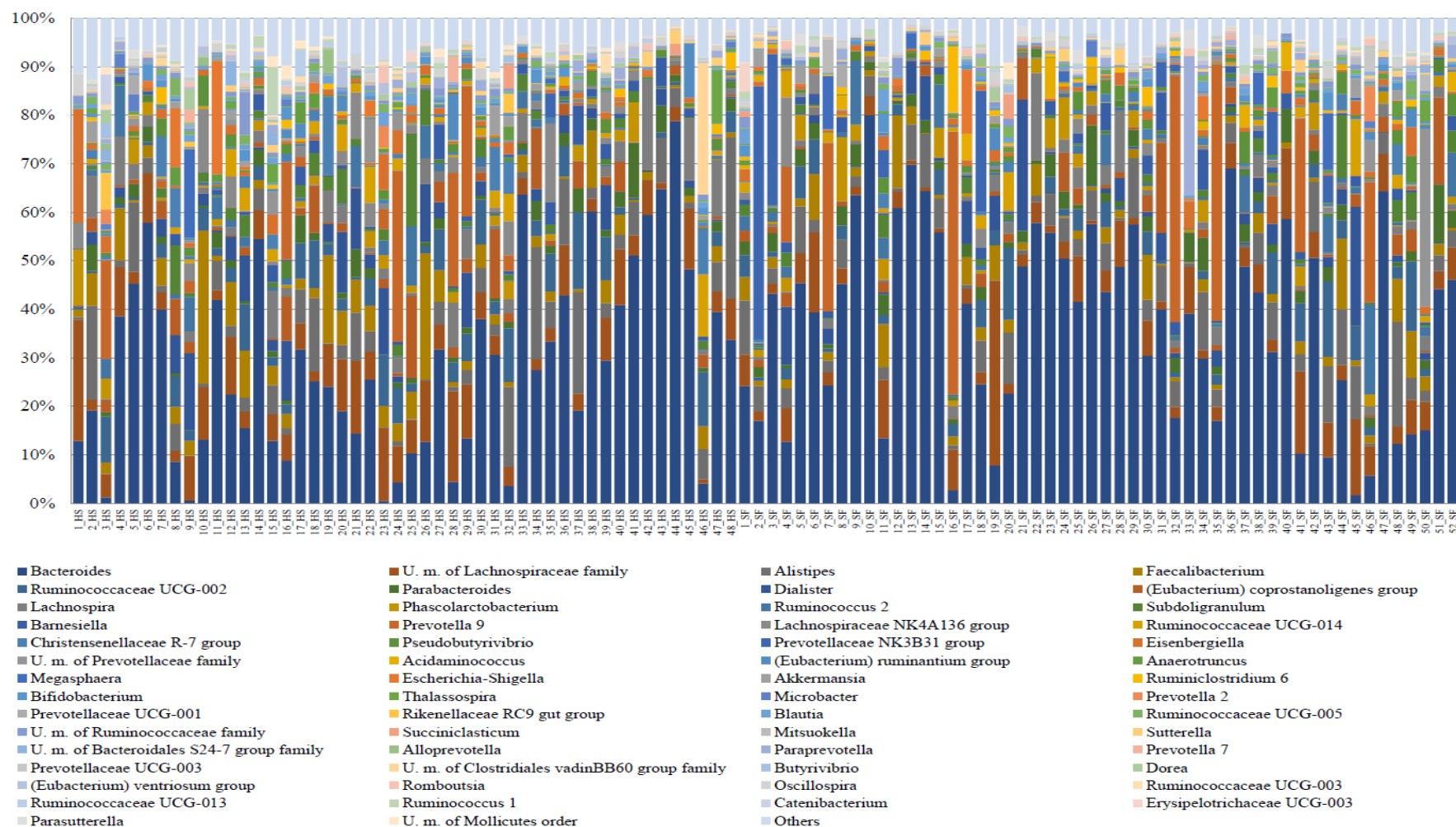


FIGURA 6

Elenco dei principali phyla, famiglie, generi e specie con abbondanza relativa media differente nel microbiota intestinale di calcolotici (n=52) e controlli (n=48). Dati ottenuti attraverso analisi di covarianza.

Variazioni a livello di Phylum con p-value < 0.05

	Sign.	Abbondanza media			Prevalenza	
		HS	SF	% variazione dei taxa in HS rispetto ad SF	HS	SF
Tenericutes	.043	0.33%	0.10%	238.37%	62.50%	36.54%
Firmicutes	.002	51.26%	39.15%	30.94%	100.00%	100.00%
Bacteroidetes	.001	44.16%	57.72%	-23.50%	100.00%	100.00%

Variazioni a livello di Famiglia con p-value < 0.05

	Sign.	Abbondanza media			Prevalenza	
		HS	SF	% variazione dei taxa in HS rispetto ad SF	HS	SF
Enterococcaceae	.041	0.00564%	0.00109%	416.73%	43.75%	19.23%
U. m. of NB1-n order	.048	0.01324%	0.00377%	250.88%	33.33%	15.38%
Christensenellaceae	.026	1.71879%	0.61328%	180.26%	97.92%	96.15%
Micrococcaceae	.030	0.00311%	0.00137%	126.03%	58.33%	36.54%
Coriobacteriaceae	.009	0.37818%	0.18312%	106.52%	100.00%	100.00%
Lachnospiraceae	.014	18.63313%	13.37101%	39.35%	100.00%	100.00%
Ruminococcaceae	.016	23.24086%	17.64663%	31.70%	100.00%	100.00%
Bacteroidaceae	.034	28.72602%	37.38872%	-23.17%	100.00%	100.00%
Promicromonosporaceae	.040	0.00000%	0.00076%	Absent in HS	0.00%	15.38%

Variazioni a livello di Genere con p-value < 0.05

	Sign.	Abbondanza media			Prevalenza	
		HS	SF	% variazione dei taxa in HS rispetto ad SF	HS	SF
<i>Klebsiella</i>	.031	0.05869%	0.00053%	10882.51%	45.83%	9.62%
<i>Enterobacter</i>	.049	0.00827%	0.00047%	1648.34%	29.17%	11.54%
<i>Enterorhabdus</i>	.017	0.04317%	0.00340%	1170.39%	60.42%	36.54%
<i>Enterococcus</i>	.041	0.00564%	0.00109%	416.73%	43.75%	19.23%
U. m. of NB1-n order	.048	0.01324%	0.00377%	250.88%	33.33%	15.38%
<i>Veillonella</i>	.026	0.08306%	0.02408%	244.95%	87.50%	75.00%
Christensenellaceae R-7 group	.027	1.65768%	0.57089%	190.37%	93.75%	90.38%
<i>Oribacterium</i>	.032	0.00207%	0.00085%	144.50%	52.08%	30.77%
Ruminococcaceae UCG-003	.044	0.32016%	0.13151%	143.45%	81.25%	67.31%
Lachnospiraceae NK4A136 group	.046	1.98478%	0.85770%	131.41%	97.92%	96.15%
<i>Rothia</i>	.030	0.00311%	0.00137%	126.03%	58.33%	36.54%
Family XIII UCG-001	.021	0.03912%	0.02182%	79.28%	83.33%	76.92%
Lachnospiraceae ND3007 group	.045	0.11696%	0.07121%	64.24%	95.83%	92.31%
<i>Ruminiclostridium 5</i>	.023	0.44458%	0.27884%	59.44%	100.00%	100.00%
<i>Bacteroides</i>	.034	28.72602%	37.38872%	-23.17%	100.00%	100.00%
<i>Acidaminococcus</i>	.008	0.10605%	0.81985%	-87.07%	22.92%	57.69%
<i>Cellulosimicrobium</i>	.040	0.00000%	0.00076%	Absent in HS	0.00%	15.38%

Variazioni a livello di Specie con p-value < 0.05

	Sign.	Abbondanza media			Prevalenza	
		HS	SF	% variazione dei taxa in HS rispetto ad SF	HS	SF
<i>Klebsiella variicola</i>	.041	0.02615%	0.00035%	7300.04%	39.58%	3.85%
<i>Enterococcus faecalis</i>	.031	0.00229%	0.00010%	2203.88%	27.08%	5.77%
<i>Bifidobacterium breve</i>	.018	0.03656%	0.00192%	1800.67%	43.75%	17.31%
U. m. of <i>Enterorhabdus</i> genus	.017	0.04317%	0.00340%	1170.39%	60.42%	36.54%
<i>Citrobacter koseri</i>	.011	0.00151%	0.00021%	621.04%	31.25%	9.62%
U. m. of <i>Holdemanella</i> genus	.038	0.03945%	0.01002%	293.81%	79.17%	51.92%
U. m. of <i>Veillonella</i> genus	.026	0.07557%	0.02094%	260.91%	85.42%	73.08%
U. m. of Tenericutes phylum	.048	0.01324%	0.00377%	250.88%	33.33%	15.38%
U. m. of Peptostreptococcaceae family	.044	0.00131%	0.00041%	218.75%	33.33%	25.00%
U. m. of Lachnospiraceae UCG-010 genus	.009	0.30778%	0.09768%	215.08%	91.67%	86.54%
U. m. of Christensenellaceae R-7 group genus	.027	1.65768%	0.57089%	190.37%	93.75%	90.38%
<i>Oribacterium parvum</i>	.020	0.00207%	0.00076%	173.29%	52.08%	28.85%
U. m. of <i>Rothia</i> genus	.024	0.00264%	0.00104%	154.14%	50.00%	25.00%
U. m. of Ruminococcaceae UCG-003 genus	.044	0.32016%	0.13151%	143.45%	81.25%	67.31%
U. m. of Lachnospiraceae NK4A136 group genus	.046	1.98479%	0.85770%	131.41%	97.92%	96.15%
U. m. of <i>Faecalibacterium</i> genus	.020	3.93264%	1.95299%	101.37%	100.00%	100.00%
U. m. of Family XIII UCG-001 genus	.021	0.03912%	0.02182%	79.28%	83.33%	76.92%
U. m. of Lachnospiraceae ND3007 group genus	.045	0.11696%	0.07121%	64.24%	95.83%	92.31%
U. m. of <i>Ruminiclostridium 5</i> genus	.046	0.30083%	0.20069%	49.90%	100.00%	100.00%
<i>Bacteroides uniformis</i>	.011	4.65309%	8.21113%	-43.33%	100.00%	100.00%
U. m. of <i>Acidaminococcus</i> genus	.008	0.09232%	0.80558%	-88.54%	22.92%	55.77%
<i>Acidaminococcus intestini</i>	.003	0.00050%	0.00729%	-93.15%	6.25%	26.92%
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	.040	0.00000%	0.00076%	Absent in HS	0.00%	15.38%

FIGURA 7

Famiglie di geni batterici del Cluster of Orthologous Genes per le quali esiste una differenza statisticamente significativa nell'espressione a livello del microbiota intestinale, verificata tramite deep shotgun metagenomics sequencing, tra 5 soggetti calcolotici (SF) e 5 soggetti non calcolotici (HS).

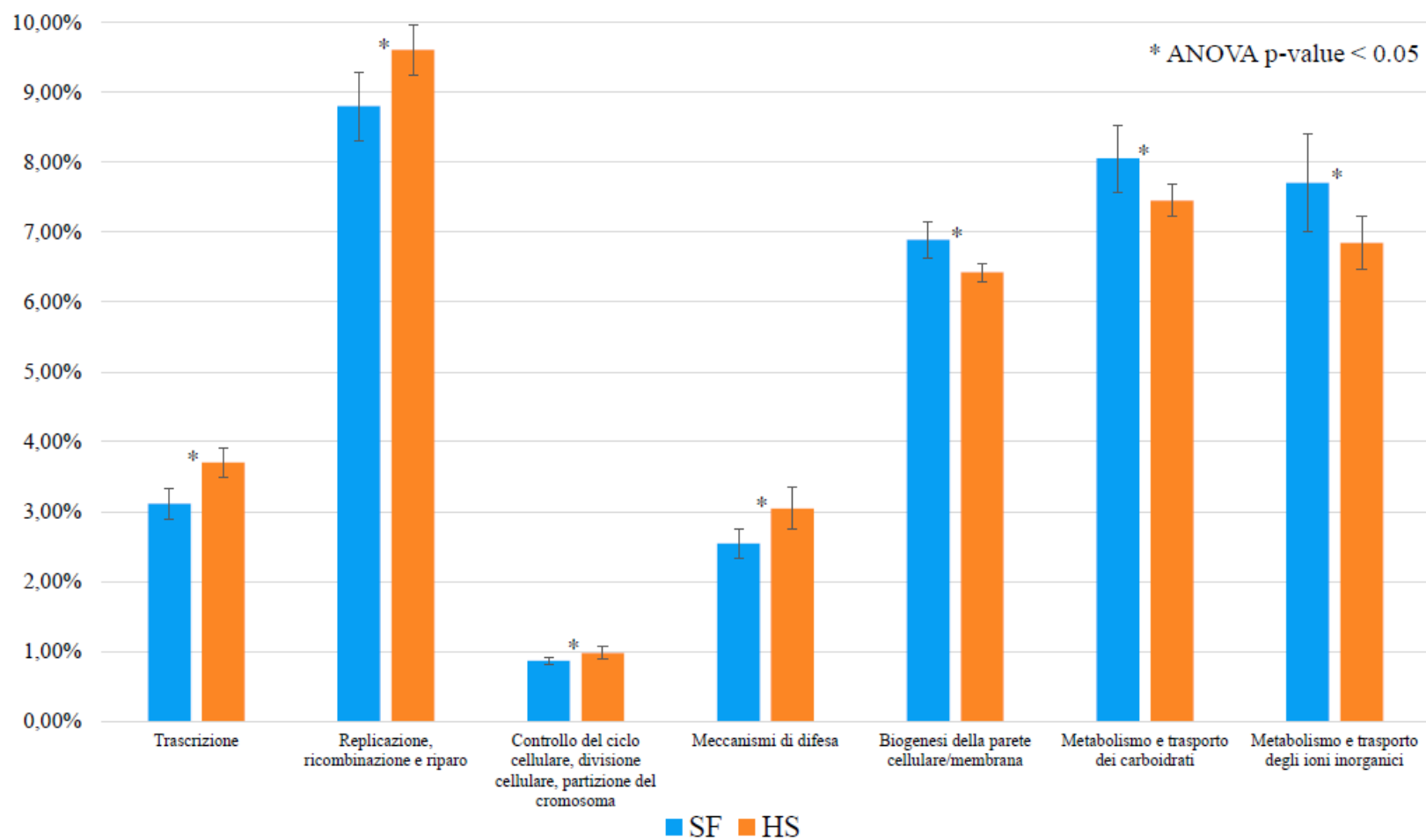


FIGURA 8

Espressione a livello del microbiota intestinale di 5 soggetti calcolotici (SF) e 5 controlli non calcolotici (HS) di geni coinvolti nel metabolismo dell'ossalato (formil-CoA transferasi e ossalil-CoA decarbossilasi), verificata tramite deep shotgun metagenomics sequencing.

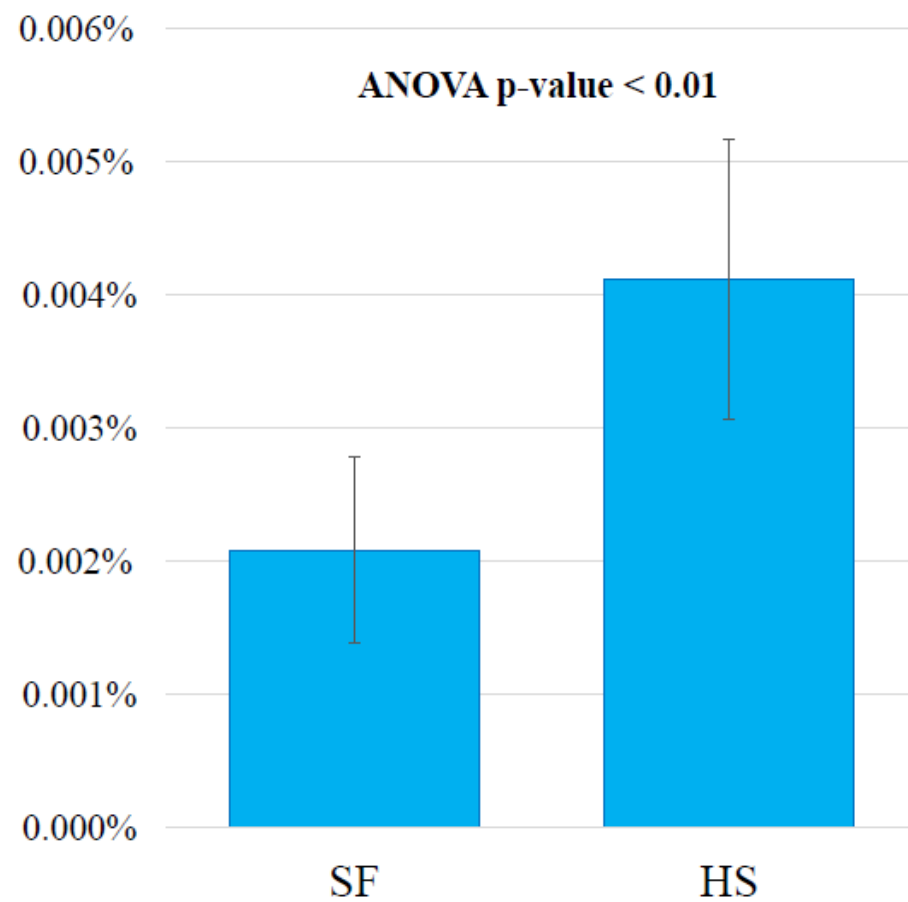


FIGURA 9

Prevalenza a livello del microbiota intestinale di 10 soggetti (5 calcolotici, SF, e 5 controlli, HS) di Archaea e batteri esprimenti geni coinvolti nella degradazione dell'ossalato (formil-CoA transferasi e ossalil-CoA decarbossilasi), verificata tramite deep shotgun metagenomics sequencing.

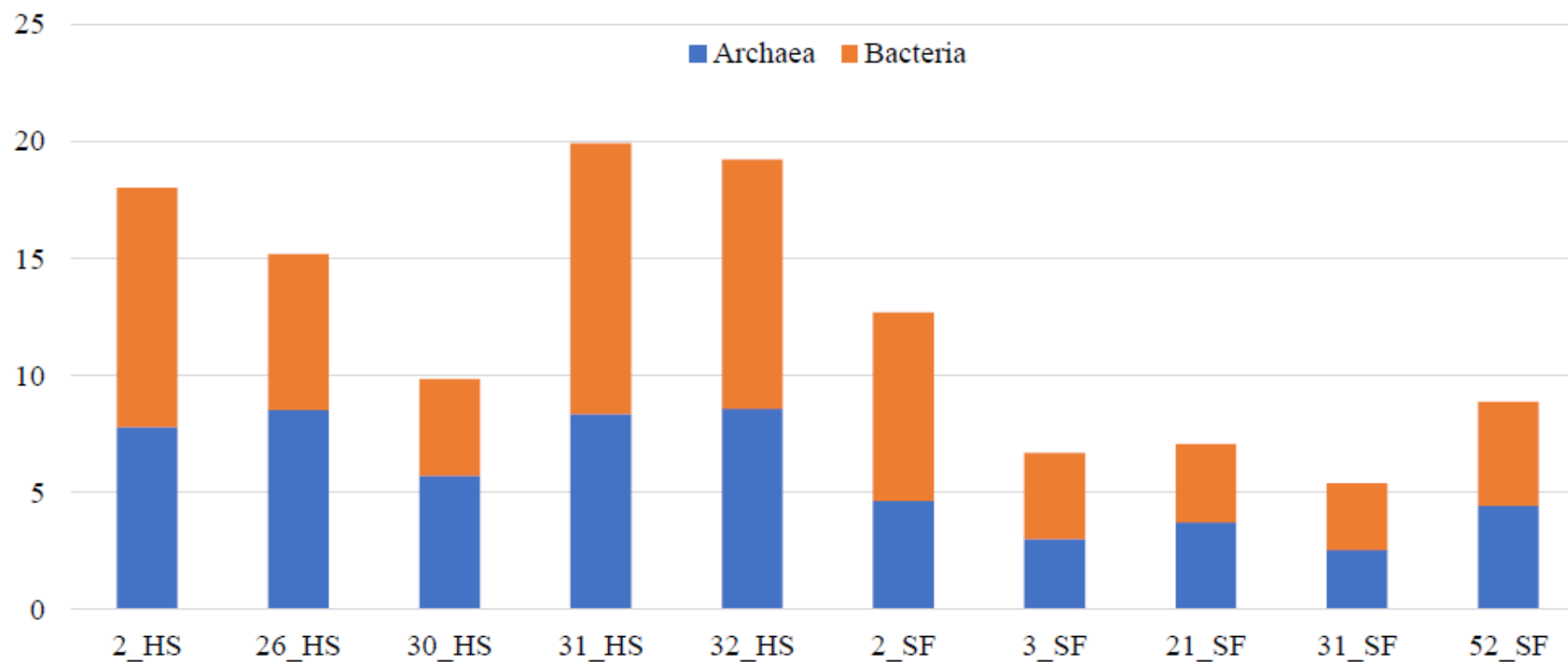
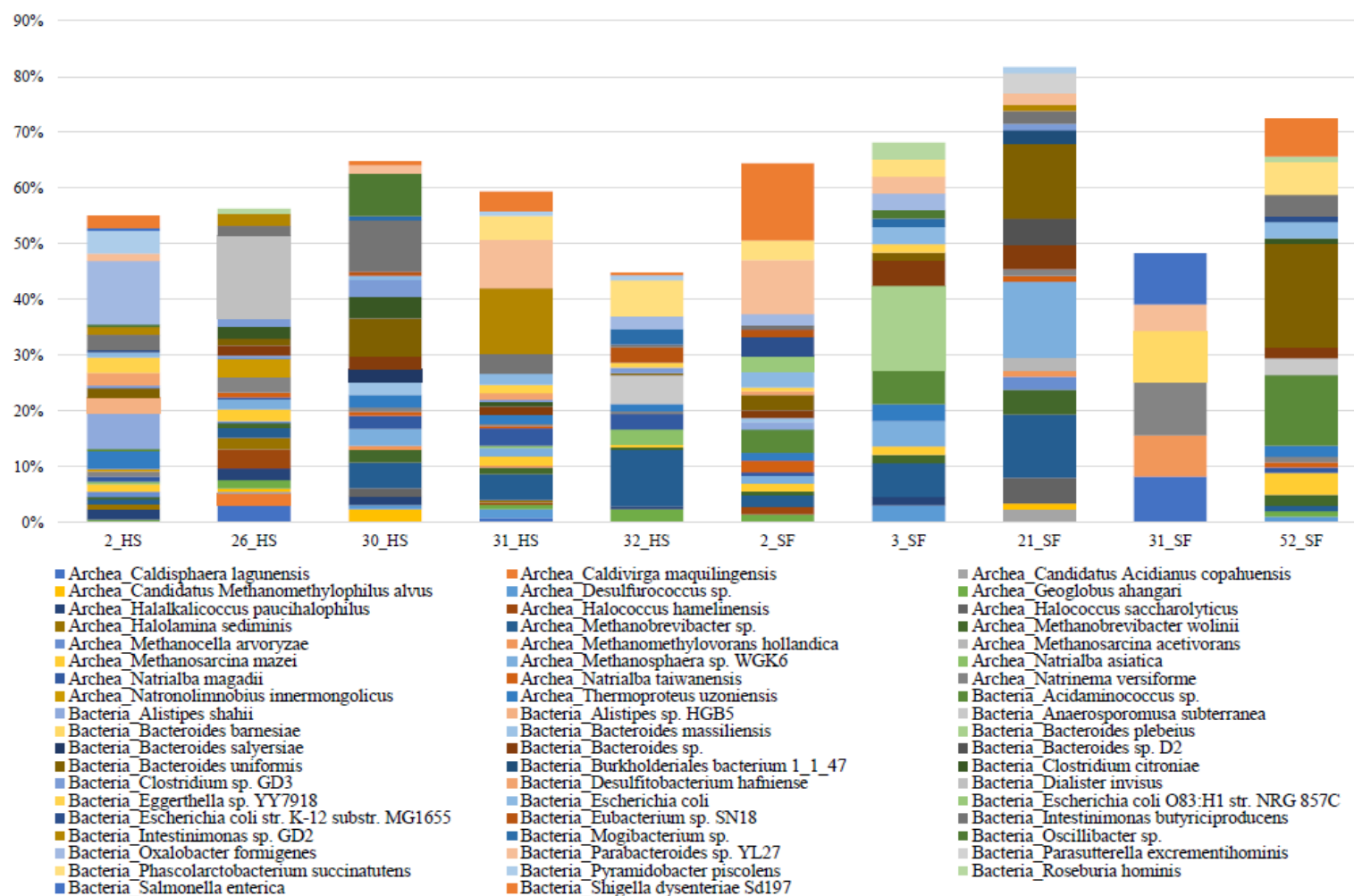


FIGURA 10

Classificazione tassonomica degli Archaea e batteri esprimanti geni coinvolti nella degradazione dell'ossalato a livello del microbiota intestinale di 10 soggetti (5 calcolotici, SF, e 5 controlli, HS), verificata tramite deep shotgun metagenomics sequencing.



BIBLIOGRAFIA

- 1) Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519.
- 2) Ianiro G, Tilg H, Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut* 2016; 65: 1906-1915.
- 3) Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124: 837-848.
- 4) Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009; 136: 65-80.
- 5) Hill MJ, Drasar BS. The normal colonic bacterial flora. *Gut* 1975; 16: 318-323.
- 6) Shanahan ER, Zhong L, Talley NJ, et al. Characterisation of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota: a novel technique to prevent cross-contamination during endoscopic procedures. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 43: 1186-1196.
- 7) Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human intestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 36: 996-1047.
- 8) Scanlan PD, Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *ISME J* 2008; 2: 1183-1193.
- 9) Ventura M, Turrone F, Canchaya C, et al. Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Front Biosci* 2009; 14: 3214-3221.
- 10) Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016; 65: 330-339.
- 11) Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genetics* 2012; 13: 260-270.
- 12) Patel R, DuPont HL. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis* 2015; 60: S108-S121.
- 13) Drekonja D, Reich J, Gezahegn S, et al. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *Ann Intern Med* 2015; 162: 630-638.
- 14) The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486: 207-214.
- 15) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174-180.
- 16) Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; 486: 222-227.
- 17) David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505: 559-563.
- 18) Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 2014; 63: 1913-1920.
- 19) Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334: 105-108.
- 20) Milani C, Ferrario C, Turrone F, et al. The human gut microbiota and its interactive connections to diet. *J Hum Nutr Diet* 2016; 29: 539-546.
- 21) Walker AW, Ince J, Duncan SH, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 2011; 5: 220-230.

- 22) Costabile A, Kolida S, Klinder A, et al. A double-blind, placebo-controlled, cross-over study to establish the bifidogenic effect of a very-long-chain inulin extracted from globe artichoke (*Cynara Scolymus*) in healthy human subjects. *Br J Nutr* 2010; 104: 1007-1017.
- 23) Turrone F, Ozcan F, Milani C, et al. Glycan cross-feeding activities between *Bifidobacteria* under in vitro conditions. *Front Microbiol* 2015; 6: 1030.
- 24) Cani PD, Neyrinck AM, Tuohy KM, et al. Changes in gut microflora are responsible for high-fat diet-induced diabetes through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007; 50: S68-S69.
- 25) Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; 500: 541-546.
- 26) Estaki M, Pither J, Baumeister P, et al. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomics functions. *Microbiome* 2016; 4: 42.
- 27) Welly RJ, Liu TW, Zidon TM, et al. Comparison of diet versus exercise on metabolic function and gut microbiota in obese rats. *Med Sci Sports Exerc* 2016; 48: 1688-1698.
- 28) Denou E, Marcinko K, Surette MG, et al. High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 310: E982-E993.
- 29) Campbell SC, Wisniewski PJ, Noji M, et al. The effect of diet and exercise on intestinal integrity and microbial diversity in mice. *PLoS One* 2016; 11: e0150502.
- 30) Cerdà B, Perez M, Perez-Santiago JD, et al. Gut microbiota modification: another piece in the puzzle of the benefits of physical exercise and health? *Front Physiol* 2016; 7: 51.
- 31) Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 11971-11975.
- 32) Milani C, Mancabelli L, Lugli GA, et al. Exploring vertical transmission of *bifidobacteria* from mother to child. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81: 7078-7087.
- 33) Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 4578-4585.
- 34) Arboleya S, Sanchez B, Solis G, et al. Impact of prematurity and perinatal antibiotics on the developing intestinal microbiota: a functional inference study. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 649.
- 35) Martin R, Makino H, Yavuz AC, et al. Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PLoS One* 2016; 11: e0158498.
- 36) Nermes M, Endo A, Aarnio J, et al. Furry pets modulate gut microbiota composition in infants at risk for allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136: 1688-1690.
- 37) Song SJ, Lauber C, Costello EK, et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife* 2013; 2: e00458.
- 38) Bonder MJ, Kurilshikov A, Tigchelaar EF, et al. The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nat Genetics* 2016; 48: 1407-1412.
- 39) Zapata HJ, Quagliarello VJ. The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. *J Am Geriatr Soc* 2015; 63: 776-781.
- 40) Blaser MJ, Kirschner D. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature* 2007; 449: 843-849.

- 41) Gibson MK, Pesesky MW, Dantas G. The yin and yang of bacterial resilience in the human gut microbiota. *J Mol Biol* 2014; 426: 3866-3876.
- 42) Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, et al. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environ Microbiol* 2016; 18: 2103-2116.
- 43) Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012; 488: 178-184.
- 44) O'Toole PW, Jeffery IB. Gut microbiota and aging. *Science* 2015; 350: 1214-1215.
- 45) Clegg A, Young J, Iliffe S, et al. Frailty in elderly people. *Lancet* 2013; 381: 752-762.
- 46) Jeffery IB, Lynch DB, O'Toole PW. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *ISME J* 2016; 10: 170-182.
- 47) Jackson MA, Jeffery IB, Beaumont M, et al. Signatures of early frailty in the gut microbiota. *Genome Med* 2016; 8: 8.
- 48) Ventura M, O'Flaherty S, Claesson MJ, et al. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 61-71.
- 49) Arbolea S, Watkins C, Stanton C, et al. Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Front Microbiol* 2016; 7: 1204.
- 50) Zhang D, Chen G, Manwani D, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 2015; 525: 528-532.
- 51) Biagi E, Nylund L, Candela M, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 2010; 5: e10667.
- 52) Rampelli S, Candela M, Turroni S, et al. Functional metagenomics profiling of intestinal microbiome in extreme ageing. *Aging* 2013; 5: 902-912.
- 53) Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, et al. Gut microbiota and extreme longevity. *Curr Biol* 2016; 26: 1480-1485.
- 54) Chang C, Lin H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2016; 30: 3-15.
- 55) Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front Microbiol* 2016; 7: 455.
- 56) Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, et al. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to clostridium difficile-induced colitis. *Infect Immun* 2012; 80: 62-73.
- 57) Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, et al. The pervasive effect of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008; 6: e280.
- 58) Perez-Cobas AE, Artacho A, Knecht H, et al. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS One* 2013; 8: e80201.
- 59) Zhao J, Murray S, LiPuma JJ. Modeling the impact of antibiotic exposure on human microbiota. *Sci Rep* 2014; 4: 4345.
- 60) Perez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut* 2013; 62: 1591-1601.
- 61) Martinez I, Stegen JC, Maldonado-Gomez MX, et al. The gut microbiota of rural Papua New Guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Rep* 2015; 11: 527-538.

- 62) Weber D, Oefner PJ, Dettmer K, et al. Rifaximin preserves intestinal microbiota balance in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51: 1087-1092.
- 63) Ponziani FR, Scaldaferri F, Petito V, et al. The role of antibiotics in gut microbiota modulation: the eubiotic effects of rifaximin. *Dig Dis* 2016; 34: 269-278.
- 64) Panda S, El Khader I, Casellas F, et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One* 2014; 9: e95476.
- 65) Knecht H, Neulinger SC, Heinsen FA, et al. Effect of β -lactam antibiotics and fluoroquinolones on human gut microbiota in relation to *Clostridium difficile* associated diarrhea. *PLoS One* 2014; 9: e89417.
- 66) Milani C, Ticinesi A, Gerritsen J, et al. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomics study. *Sci Rep* 2016; 6: 25945.
- 67) Yin J, Prabhakar M, Wang S, et al. Different dynamic patterns of β -lactams, quinolones, glycopeptides and macrolides on mouse gut microbial diversity. *PLoS One* 2015; 10: e0126712.
- 68) Zwielehner J, Lassl C, Hippe B, et al. Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting. *PLoS One* 2011; 6: e28654.
- 69) Montassier E, Gastinne T, Vangay P, et al. Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 42: 515-528.
- 70) Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol* 2013; 14: 660-667.
- 71) Petnicki-Ochwieja T, Hrnčir T, Liu YJ, et al. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 15813-15819.
- 72) Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, et al. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn disease. *Gut* 2008; 57: 903-910.
- 73) Stecher B, Maier L, Hardt WD. “Blooming” in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev* 2013; 11: 277-284.
- 74) Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 2013; 502: 96-99.
- 75) Sonnenburg JL, Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 2016; 535: 56-64.
- 76) Schroeder BO, Backhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med* 2016; 22: 1079-1089.
- 77) Hersoug LG, Moller P, Loft S. Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implication for inflammation and obesity. *Obes Rev* 2016; 17: 297-312.
- 78) Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 2013; 39: 372-385.
- 79) De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 2014; 156: 84-96.

- 80) Sayin SI, Wahlstrom A, Felin J, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 2013; 17: 225-235.
- 81) Peterson DA, Frank DN, Pace NR, et al. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe* 2008; 3: 417-427.
- 82) Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, et al. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3380-3389.
- 83) Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2007; 2: 204.
- 84) Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012; 13: R79.
- 85) Tursi A, Brandimarte G, Papa A, et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2218-2227.
- 86) 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: 102-109.
- 87) Marasco G, Di Biase AR, Schiumerini R, et al. Gut microbiota and celiac disease. *Dig Dis Sci* 2016; 61: 1461-1472.
- 88) Perez-Cobas AE, Artacho A, Ott SJ, et al. Structural and functional changes in the gut microbiota associated to Clostridium difficile infection. *Front Microbiol* 2014; 5: 335.
- 89) Antharam VC, Li EC, Ishmael A, et al. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in Clostridium difficile infection and nosocomial diarrhea. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2884-2892.
- 90) Wang X, Yang Y, Huycke MM. Commensal bacteria drive endogenous transformation and tumour stem cell marker expression through a bystander effect. *Gut* 2015; 64: 459-468.
- 91) Lu R, Wu S, Zhang YG, et al. Enteric bacterial protein AvrA promotes colonic tumorigenesis and activates colonic beta-catenin signaling pathway. *Oncogenesis* 2014; 3: e105.
- 92) Wu N, Yang X, Zhang R, et al. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microb Ecol* 2013; 66: 462-470.
- 93) O'Keefe SJ, Li JV, Lahti L, et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nature Commun* 2015; 6: 6342.
- 94) Tilg H, Cani PD, Mayer EA. Gut microbiome and liver disease. *Gut* 2016; 65: 2035-2044.
- 95) Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772.
- 96) Qin N, Yang F, Li A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 2014; 513: 59-64.
- 97) Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444: 1022-1023.

- 98) Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 2016; 535: 376-381.
- 99) Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 2015; 528: 262-266.
- 100) Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky 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: 26-36.
- 101) Lobo LA, Benjamin CF, Oliveira AC. The interplay between microbiota and inflammation: lessons from peritonitis and sepsis. *Clin Transl Immunol* 2016; 5: e90.
- 102) Vervoort J, Xavier BB, Stewardson A, et al. Metagenomic analysis of the impact of nitrofurantoin treatment on the human fecal microbiota. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1989-1992.
- 103) Dickson R. The microbioma and critical illness. *Lancet Respir Med* 2016; 4: 59-72.
- 104) Deshmukh HS, Liu Y, Menkiti OR, et al. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med* 2014; 20: 524-530.
- 105) Baumler AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 2016; 535: 85-93.
- 106) Rosser EC, Mauri C. A clinical update on the significance of the gut microbiota in systemic autoimmunity. *J Autoimmun* 2016; 74: 85-93.
- 107) Hevia A, Milani C, Lopez C, et al. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. *mBio* 2014; 5: e01548.
- 108) Blazquez AB, Berin MC. Microbiome and food allergy. *Transl Res* 2016; ahead of print.
- 109) Hauptmann M, Schaible UE. Linking microbiota and respiratory disease. *FEBS Lett* 2016; 590: 3721-3728.
- 110) Cerdà B, Perez M, Perez-Santiago JD, et al. Gut microbiota modification: another piece in the puzzle of the benefits of physical exercise in health? *Front Physiol* 2016; 7: 51.
- 111) Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, et al. The central nervous system and gut microbiome. *Cell* 2016; 167: 915-932.
- 112) Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, et al. Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PLoS One* 2015; 10: e0142164.
- 113) Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015; 30: 350-358.
- 114) Chen J, Chia N, Kalari KR, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep* 2016; 6: 28484.
- 115) Zheng P, Zeng B, Zhou C, et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 786-796.
- 116) Vaziri NR, Wong J, Pahl M, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int* 2013; 83: 308-315.
- 117) Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int* 2013; 83: 1010-1016.
- 118) Pluznick JL. Gut microbiota in renal physiology: focus on short-chain fatty acids and their receptors. *Kidney Int* 2016, ahead of print.

- 119) Worcester EM, Coe FL. Clinical practice: calcium kidney stones. *N Engl J Med* 2010; 353: 964-973.
- 120) Daller JE, Chandhoke PS. Epidemiology and incidence of stone disease. In: Stoller ML, Meng MV. Urinary stone disease – The practical guide to medical and surgical management. Humana Press, Totowa, New Jersey, Stati Uniti 2012, pp. 27-34.
- 121) Croppi E, Ferraro PM, Taddei L, et al. Prevalence of renal stones in an Italian urban population: a general practice-based study. *Urol Res* 2012; 40: 517-522.
- 122) Gambaro G, Croppi E, Coe F, et al. Metabolic diagnosis and medical prevention of calcium nephrolithiasis and its systemic manifestations: a consensus statement. *J Nephrol* 2016; 29: 715-734.
- 123) Coe FL, Evan A, Worcester E. Patophysiology-based treatment of idiopathic calcium kidney stones. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 2083-2092.
- 124) Ticinesi A, Nouvenne A, Borghi L, et al. Water and other fluids in nephrolithiasis: state of the art and future challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57: 963-974.
- 125) Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 1847-1870.
- 126) Pak CY, Sakhaee K, Moe OW, et al. Defining hypercalciuria in nephrolithiasis. *Kidney Int* 2011; 80: 777-782.
- 127) Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, et al. Twenty-four hour urine chemistries and the risk of kidney stones among women and men. *Kidney Int* 2001; 59: 2290-2298.
- 128) Ticinesi A, Nouvenne A, Maalouf NM, et al. Salt and nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31: 39-45.
- 129) Borghi L, Schianchi T, Meschi T, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med* 2002; 346: 77-84.
- 130) Nouvenne A, Meschi T, Prati B, et al. Effect of a low-salt diet on idiopathic hypercalciuria in calcium-oxalate stone formers: a 3-mo randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 565-570.
- 131) Laminski NA, Meyers AM, Kruger M, et al. Hyperoxaluria in patients with recurrent calcium oxalate calculi: dietary and other risk factors. *Br J Urol* 1991; 68: 454-458.
- 132) Nouvenne A, Meschi T, Guerra A, et al. Diet to reduce mild hyperoxaluria in patients with idiopathic calcium oxalate stone formation: a pilot study. *Urology* 2009; 73: 725-730.
- 133) Robijn S, Hoppe B, Vervaeke BA, et al. Hyperoxaluria: a gut-kidney axis? *Kidney Int* 2011; 80: 1146-1158.
- 134) Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG. Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney Int* 2001; 59: 270-276.
- 135) Massey LK. Food oxalate: factors affecting measurement, biological variation, and bioavailability. *J Am Diet Assoc* 2007; 107: 1191-1194.
- 136) Holmes RP, Kennedy M. Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake. *Kidney Int* 2000; 57: 1662-1667.
- 137) Taylor EN, Curhan GC. Determinants of 24-hour urinary oxalate excretion. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 1453-1460.
- 138) Taylor EN, Curhan GC. Oxalate intake and the risk for nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2198-2204.

- 139) Robertson DS. The function of oxalic acid in the human metabolism. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 1405-1412.
- 140) Khan SR, Glenton PA, Byer KJ. Dietary oxalate and calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* 2007; 178: 2191-2196.
- 141) Knight J, Jiang J, Assimos DG, et al. Hydroxyproline ingestion and urinary oxalate and glycolate excretion. *Kidney Int* 2006; 70: 1929-1934.
- 142) Knight J, Madduma-Liyanage K, Mobley JA, et al. Ascorbic acid intake and oxalate synthesis. *Urolithiasis* 2016; 44: 289-297.
- 143) Lemann jr J, Pleuss JA, Worcester EM, et al. Urinary oxalate excretion increases with body size and decreases with increasing dietary calcium intake among healthy adults. *Kidney Int* 1996; 49: 200-208.
- 144) Siener R, Egbert D, Nicolay C, et al. Dietary factors for hyperoxaluria in calcium oxalate stone formers. *Kidney Int* 2003; 63: 1037-1043.
- 145) Thomas E, von Unruh GE, Hesse A. Influence of a low- and a high-oxalate vegetarian diet on intestinal oxalate absorption and urinary excretion. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 1090-1097.
- 146) Prezioso D, Strazzullo P, Lotti T, et al. Dietary treatment of urinary risk factors for renal stone formation. A review of CLU working group. *Arch Ital Urol Androl* 2015; 87: 105-120.
- 147) Matsumoto ED, Heller HJ, Adams-Huet B, et al. Effect of high and low calcium diets on stone forming risk during liberal oxalate intake. *J Urol* 2006; 176: 132-136.
- 148) Marengo SR, Romani AMP. Oxalate in renal stone disease: the terminal metabolite that just won't go away. *Nat Clin Pract* 2008; 4: 368-377.
- 149) Bergsland KJ, Zisman AL, Asplin JR, et al. Evidence for net renal tubule oxalate secretion in patients with calcium kidney stones. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300: F311-F318.
- 150) Levy FL, Adams-Huet B, Pak CY. Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol. *Am J Med* 1995; 98: 50-59.
- 151) Nouvenne A, Ticinesi A, Allegri F, et al. Twenty-five years of idiopathic calcium nephrolithiasis: has anything changed? *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 337-344.
- 152) Werness PG, Brown CM, Smith LH, et al. Equil2: a basic computer program for the calculation of urinary saturation. *J Urol* 1985; 134: 1242-1244.
- 153) Fink HA, Wilt TJ, Eidman KE, et al. Medical management to prevent recurrent nephrolithiasis in adults: a systematic review for an American College of Physicians Clinical Guideline. *Ann Intern Med* 2013; 158: 535-543.
- 154) Qaseem A, Dallas P, Forciea MA, et al. Dietary and pharmacologic management to prevent recurrent nephrolithiasis in adults: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2014; 161: 659-667.
- 155) Parks JH, Asplin JR, Coe FL. Patient adherence to long-term medical treatment of kidney stones. *J Urol* 2001; 166: 2057-2060.
- 156) Dawson KA, Allison MJ, Hartman PA. Isolation and some characteristics of anaerobic oxalate-degrading bacteria from the rumen. *Appl Environ Microbiol* 1980; 40: 833-839.
- 157) Allison MJ, Dawson KA, Mayberry MR, et al. Oxalobacter formigenes gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch Microbiol* 1985; 141: 1-7.
- 158) Ellis ME, Mobley JA, Holmes RP, et al. Proteome dynamics of the specialist oxalate degrader Oxalobacter formigenes. *J Proteomics Bioinform* 2016; 9: 19-24.

- 159) Knight J, Deora R, Assimos DG, et al. The genetic composition of *Oxalobacter formigenes* and its relationship to colonization and calcium oxalate stone disease. *Urolithiasis* 2013; 41: 187-196.
- 160) Allison MJ, Cook HM, Milne DB, et al. Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans. *J Nutr* 1986; 116: 455-480.
- 161) Argenzio RA, Liacos JA, Allison MJ. Intestinal oxalate-degrading bacteria reduce oxalate absorption and toxicity in guinea pigs. *J Nutr* 1988; 118: 787-792.
- 162) Sidhu H, Holmes RP, Allison MJ, et al. Direct quantification of enteric bacterium *Oxalobacter formigenes* in human fecal samples by quantitative competitive-template PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1503-1509.
- 163) Stewart CS, Duncan SH, Cave DR. *Oxalobacter formigenes* and its role in oxalate metabolism in the human gut. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 230: 1-7.
- 164) Goldfarb DS. Microorganisms and calcium oxalate stone disease. *Nephron Physiol* 2004; 98: 48-54.
- 165) Mittal RD, Kumar R. Gut-inhabiting bacterium *Oxalobacter formigenes*: role in calcium oxalate urolithiasis. *J Endourol* 2004; 18: 418-424.
- 166) Sidhu H, Hoppe B, Hesse A, et al. Clinical significance of *Oxalobacter formigenes*: colonization studies in patients with cystic fibrosis, inflammatory bowel disease and calcium-oxalate urolithiasis. In: Rodgers AL, Hibbert BE, Hess B, Khan SR, Preminger GM (Eds). *Urolithiasis* 2000. University of Cape Town Press 2000, Città del Capo, Sudafrica.
- 167) Sidhu H, Schmidt ME, Cornelius JG, et al. Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible prevention by gut recolonization or enzyme replacement therapy. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: S334-S340.
- 168) Sidhu H, Hoppe B, Hesse A, et al. Absence of *Oxalobacter formigenes* in cystic fibrosis patients: a risk factor for hyperoxaluria. *Lancet* 1998; 352: 1026-1029.
- 169) Kaufman DW, Kelly JP, Curhan GC, et al. *Oxalobacter formigenes* may reduce the risk of calcium oxalate kidney stones. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1197-1203.
- 170) Siener R, Bangen U, Sidhu H, et al. The role of *Oxalobacter formigenes* colonization in calcium oxalate stone disease. *Kidney Int* 2013; 83: 1144-1149.
- 171) Hatch M, Cornelius J, Allison M, et al. *Oxalobacter* sp. reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. *Kidney Int* 2006; 69: 691-698.
- 172) Kumar R, Ghoshal UC, Singh G, et al. Infrequency of colonization with *Oxalobacter formigenes* in inflammatory bowel disease: possible role in renal stone formation. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1403-1409.
- 173) Duffey BG, Miyaoka R, Holmes R, et al. *Oxalobacter* colonization in the morbidly obese and correlation with urinary stone risk. *Urology* 2011; 78: 531-534.
- 174) Siener R, Ebert D, Hesse A. Urinary oxalate excretion in female calcium oxalate stone formers with and without a history of recurrent urinary tract infections. *Urol Res* 2001; 29: 245-248.
- 175) Milliner D. Treatment of the primary hyperoxalurias: a new chapter. *Kidney Int* 2006; 70: 1198-1200.
- 176) Sakhaee K. Recent advances in the pathophysiology of nephrolithiasis. *Kidney Int* 2009; 75: 585-595.

- 177) Hoesl CE, Altwein JE. The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *Eur Urol* 2005; 47: 288-296.
- 178) Sidhu H, Allison MJ, Chow MJ, et al. Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. *J Urol* 2001; 166: 1487-1491.
- 179) Duncan SH, Richardson AJ, Kaul P, et al. *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3841-3847.
- 180) Hoppe B, Groothoff JW, Hulton SA, et al. Efficacy and safety of *Oxalobacter formigenes* to reduce urinary oxalate in primary hyperoxaluria. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 3609-3615.
- 181) Murphy C, Murphy S, O'Brien F, et al. Metabolic activity of probiotics – Oxalate degradation. *Vet Microbiol* 2009; 136: 100-107.
- 182) Campieri C, Campieri M, Bertuzzi V, et al. Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration. *Kidney Int* 2001; 60: 1097-1105.
- 183) Lieske JC, Goldfarb DS, De Simone C, et al. Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria. *Kidney Int* 2005; 68: 1244-1249.
- 184) Okombo J, Liebman M. Probiotic-induced reduction of gastrointestinal oxalate absorption in healthy subjects. *Urol Res* 2010; 38: 169-178.
- 185) Al-Wahsh I, Wu Y, Liebman M. Acute probiotic ingestion reduces gastrointestinal oxalate absorption in healthy subjects. *Urol Res* 2012; 40: 191-196.
- 186) Goldfarb DS, Modersitzki F, Asplin JR. A randomized, controlled trial of lactic acid bacteria for idiopathic hyperoxaluria. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 745-749.
- 187) Siener R, Bade DJ, Hesse A, et al. Dietary hyperoxaluria is not reduced by treatment with lactic acid bacteria. *J Transl Med* 2013; 11: 306.
- 188) Giardina S, Scilironi C, Michelotti A, et al. In vitro anti-inflammatory activity of selected oxalate-degrading probiotic bacteria: potential applications in the prevention and treatment of hyperoxaluria. *J Food Sci* 2014; 79: M384-M390.
- 189) Hoppe B, von Unruh G, Laube N, et al. Oxalate degrading bacteria: new treatment option for patients with primary and secondary hyperoxaluria? *Urol Res* 2005; 33: 372-375.
- 190) Siva S, Barrack ER, Reddy GPV, et al. A critical analysis of the role of gut *Oxalobacter formigenes* in oxalate stone disease. *BJU Int* 2008; 103: 18-21.
- 191) Ellis ML, Shaw KJ, Jackson SB, et al. Analysis of commercial kidney stone probiotic supplements. *Urology* 2015; 85: 517-521.
- 192) Peck AB, Canales BK, Nguyen CQ. Oxalate-degrading microorganisms or oxalate-degrading enzymes: which is the future therapy for enzymatic dissolution of calcium-oxalate uroliths in recurrent stone disease? *Urolithiasis* 2016; 44: 45-50.
- 193) Lung H, Cornelius JG, Peck AB. Cloning and expression of the oxalyl-CoA decarboxylase gene from the bacterium, *Oxalobacter formigenes*: prospects for gene therapy to control Ca-Oxalate kidney stone formation. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 381-385.
- 194) Miller AW, Dearing D. The metabolic and ecological interactions of oxalate-degrading bacteria in the mammalian gut. *Pathogens* 2013; 2: 636-652.
- 195) Stern JM, Moazami S, Qiu Y, et al. Evidence for a distinct gut microbiome in kidney stone formers compared to non-stone formers. *Urolithiasis* 2016; 44: 399-407.
- 196) Ito H, Miura N, Masai M, et al. Reduction of oxalate content of foods by the oxalate degrading bacterium, *Eubacterium lentum* WYH-1. *Int J Urol* 1996; 3: 31-34.

- 197) Barnett C, Nazzal L, Goldfarb DS, et al. The presence of *Oxalobacter formigenes* in the microbiome of healthy young adults. *J Urol* 2016; 195: 499-506.
- 198) Milani C, Hevia A, Foroni E, et al. Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One* 2013; 8: e68739.
- 199) Pala V, Sieri S, Palli D, et al. Diet in the Italian EPIC cohorts: presentation of data and methodological issues. *Tumori* 2003; 89: 594-607.
- 200) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 7: 335-336.
- 201) Kuczynski J, Stombaugh J, Walter WA, et al. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Microbiol* 2012; 1: Unit 1.E5.
- 202) Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acid Res* 2013; 41: D590-D596.
- 203) Zhao Y, Tang H, Ye Y. RAPSearch2: a fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 2012; 28: 125-126.
- 204) Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, et al. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acid Res* 2016; 44: D286-D293.
- 205) Lugli GA, Milani C, Mancabelli L, et al. MEGAnnotator: a user-friendly pipeline for microbial genomes assembly and annotation. *FEMS Microbiol Lett* 2016; 363: fmw049.
- 206) Huang W, Zhu L, Guo H, et al. The role of short-chain fatty acids in kidney injury induced by gut-derived inflammatory response. *Metabolism* 2017; 68: 20-30.
- 207) Khan SR. Reactive oxygen species as the molecular modulators of calcium oxalate kidney stone formation: evidence from clinical and experimental investigations. *J Urol* 2013; 189: 803-811.
- 208) Holloch PA, Tracy PR. Antioxidants and self-reported history of kidney stones: the National Health and Nutrition Examination Survey. *J Endourol* 2011; 25: 1903-1908.
- 209) Mushtaq S, Siddiqui AA, Naqvi ZA, et al. Identification of myeloperoxidase, alpha-defensin and calgranulin in calcium oxalate renal stones. *Clin Chim Acta* 2007; 384: 41-47.
- 210) Jiang S, Xie S, Lv D, et al. Alteration of the gut microbiota in Chinese population with chronic kidney disease. *Sci Rep* 2017; 7: 2870.
- 211) Gambaro G, Croppi E, Bushinsky D, et al. The risk of chronic kidney disease associated with urolithiasis and its urological treatments: a review. *J Urol* 2017; 198: 268-273.
- 212) Hokama S, Honma Y, Toma C, et al. Oxalate-degrading *Enterococcus faecalis*. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 235-240.
- 213) Hervé V, Junier T, Bindschedler S, et al. Diversity and ecology of oxalotrophic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2016; 32: 28.
- 214) Meschi T, Nouvenne A, Ticinesi A, et al. Dietary habits in women with recurrent idiopathic calcium nephrolithiasis. *J Transl Med* 2012; 10: 63.
- 215) Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, et al. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* 1993; 328: 833-838.
- 216) Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, et al. Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med* 1997; 126: 497-504.